

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES - ED222

Laboratoire d'Innovation Thérapeutique - UMR 7200

THÈSE présentée par :
Lorène GOURGUILLON

Soutenue le : **03 Juillet 2017**

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

Discipline/ Spécialité : **Pharmacognosie**

Etude de deux halophytes, *Armeria maritima* (Mill.) Willd. et *Helichrysum stoechas* (L.) Moench : exploration phytochimique, approche biotechnologique et valorisation dermo-cosmétique.

THÈSE dirigée par :

Pr. Annelise Lobstein

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr. Robert Verpoorte

Professeur, Université de Leiden

Pr. Claire Elfakir

Professeur, Université d'Orléans

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr. Léandros Skaltsounis

Professeur, Université d'Athènes

Pr. Marcel Hibert

Professeur, Université de Strasbourg

Dr Laurence Gondet

Maître de conférences, Université de Strasbourg

MEMBRE INVITE:

Dr Philippe Msika

Directeur de l'Innovation, Groupe SEPPIC

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES - ED222

Laboratoire d'Innovation Thérapeutique - UMR 7200

THÈSE présentée par :
Lorène GOURGUILLON

soutenue le : **03 Juillet 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Pharmacognosie**

Etude de deux halophytes, *Armeria maritima* (Mill.) Willd. et *Helichrysum stoechas* (L.) Moench : exploration phytochimique, approche biotechnologique et valorisation dermo-cosmétique.

THÈSE dirigée par :

Pr. Annelise Lobstein

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr. Robert Verpoorte

Professeur, Université de Leiden

Pr. Claire Elfakir

Professeur, Université d'Orléans

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr. Léandros Skaltsounis

Professeur, Université d'Athènes

Pr. Marcel Hibert

Professeur, Université de Strasbourg

Dr Laurence Gondet

Maître de conférences, Université de Strasbourg

MEMBRE INVITE:

Dr Philippe Msika

Directeur de l'Innovation, Groupe SEPPIC

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury: le Pr. Claire Elfakir de l'Institut de Chimie Organique et Analytique d'Orléans, le Pr. Robert Verpoorte de l'Université de Leiden et le Pr. Léandros Skaltsounis de l'Université d'Athènes pour l'intérêt, la lecture et l'évaluation de ce travail de thèse.

Je remercie également le Pr. Marcel Hibert d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Merci pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire d'Innovation Thérapeutique. Merci de m'avoir largement soutenue dans les moments chaotiques! Grazie mille aussi pour le goût de la liberté qu'il m'a inculqué ! *"Celui qui désespère des événements est un lâche, mais celui qui espère en la condition humaine est un fou."*

Je tiens à remercier le Pr. Annelise Lobstein pour m'avoir confié ce sujet de thèse et m'avoir accordé sa confiance. Merci de m'avoir laissé la possibilité de faire évoluer ce sujet comme je le souhaitais. Merci également pour votre écoute. Que le chemin qui vous mènera à la guérison soit le plus bref et le plus doux possible.

Je remercie chaleureusement et infiniment le Dr Laurence Gondet alias *l'œil de lynx* pour s'être impliquée dans mon travail. Son enthousiasme, sa motivation et sa confiance m'ont permis de mener à bien toutes les études biotechnologiques, mais pas seulement. Merci pour tous les services rendus, les conseils donnés, les mains tendues et les délicates attentions. Merci pour l'encadrement et la relecture de cette thèse que l'on a ensemble souhaitée pluridisciplinaire. Merci aussi de m'avoir fait confiance pour les enseignements. Même si tu as failli m'achever avec tes milliers de "réfs et de publis pas mal" et tes "je verrais bien un beau schéma", je ne te remercierai jamais assez pour ton indéfectible soutien. Quel plaisir de travailler avec toi !

Je remercie chaleureusement le Dr Philippe Msika, ex-directeur Innovation du groupe Seppic pour m'avoir soutenue pendant ce travail de thèse, sa disponibilité, ses encouragements et sa confiance me sont allés droits au cœur. Merci aussi pour son objectivité, sa franchise, son humour, denrées rares et précieuses !

Je remercie vivement le Pr. Catherine Lavaud qui m'est venue en aide pour le travail d'élucidation structurale et de relecture du manuscrit. Merci pour votre gentillesse, votre patience, votre tolérance. Je vous suis infiniment reconnaissante. Merci pour ces longues

journées passées devant TopSpin. Sans vous, ce travail n'aurait pas pu être mené à bien. Merci au reste de l'équipe de l'ICMR pour m'avoir accueillie aux repas d'équipe et autres galettes.

Je tiens également à remercier les Dr Eric Lesellier et Dr Emilie Destandau qui ont permis mon intégration dans mon "laboratoire d'adoption" qu'est l'ICOA d'Orléans. Merci aussi de m'avoir fait partager votre passion pour la recherche, pour toutes les mains tendues. Merci de vous être souciés de moi au delà de l'ICOA. Merci aussi de m'avoir ouvert vos maisons respectives, tissant ainsi de véritables liens d'amitié, j'en profite aussi pour remercier le Dr Caroline West pour sa gentillesse et sa bienveillance. Je tiens également à remercier les autres membres de l'ICOA pour m'avoir ouvert leurs bureaux pour les pauses déjeuner et café et plus particulièrement Ludivine, Elise, Laetitia, Zaineb et David qui m'ont fait me sentir chez moi. Un très grand merci au Dr Cyril Colas responsable de la plateforme de spectrométrie de masse de cet institut pour m'avoir appris tant de choses en si peu de temps !

Toutes les études phytochimiques n'auraient pas pu être menées à bien sans tous les magiciens des plateformes analytiques des facultés de pharmacie et chimie de Strasbourg. Mes remerciements iront tout particulièrement à Maurice Coppé pour son dévouement à l'analyse RMN des 0,5 mg de molécules, à Pauline Meyer pour son sourire et son sens pratique. Mon plus grand merci s'adresse à Patrick Wehrung qui est parti beaucoup trop tôt. Merci pour toutes ces choses que tu m'as apprises sur la spectrométrie de masse, la chimie et la vie, merci pour ton dévouement et merci de m'avoir aidée jusqu'au bout.

Je remercie également le binôme de PCBIS Adeline Obrecht et Pascal Villa pour les tests biologiques. Leur rigueur et leur disponibilité ont été très précieuses pour mener à bien ce travail de thèse.

Je remercie vivement la société BiotechMarine-Seppic pour avoir financé intégralement mon travail de thèse. Merci à son directeur, Guénolé Le Calvez pour sa confiance et sa bienveillance. Merci au Dr Christine Garcia responsable de l'Unité d'Innovation et de Développement "principes actifs" de chez Seppic pour son dynamisme effréné. Merci au Dr Rémi Laville pour avoir insufflé une nouvelle vision à la R&D de BiotechMarine. Je tiens également à remercier chaleureusement Laetitia Cattuzzato, pour les tests d'activités biologiques réalisés dans les laboratoires de Castres, merci pour ton écoute, ta réactivité et ton goût du travail bien fait, merci d'avoir contribué à ce travail de thèse et merci pour ton amitié qui perdurera. Un très très grand merci à Erwan Le Gélébart, *The Water Lover*, pour ses précieux conseils sur la culture *in vitro*, pour m'avoir transmis sa passion pour la recherche, m'avoir appris tant de choses sur les algues et la Bretagne. Merci pour avoir passé des heures

et des heures à refaire le monde avec moi et pour avoir partagé tant de moments de complicité. Merci pour cette amitié née dans le monde professionnel, sans toi tout aurait été différent et beaucoup moins fun. Merci à Guy Tabacchi pour sa réactivité et sa transmission de connaissance sur la propriété intellectuelle. Merci également au Dr Sandy Dumont pour son aide dans la relecture de mes écrits et à Elodie Goncalves pour les tests réalisés sur mes échantillons. Je tiens aussi à remercier tous les autres membres de l'équipe innovation pour les bons moments partagés qu'ils soient professionnels ou qu'ils le soient moins Julien, Coralie, Maëva, Sandrine, Elodie, Joëlle et Christian. Merci à Armelle d'avoir été un rayon de soleil pendant ces derniers mois. Merci aussi à Céline Lethorey pour son aide administrative. Je ne pourrais pas ne pas remercier le Dr Patrick Choisy pour ces quelques mois partagés au sein de BiotechMarine, merci pour ta vision innovante de la recherche en industrie, pour ton honnêteté et ton amitié.

Merci également au Dr Camille Rustenholz pour la réalisation des analyses statistiques et les bons moments partagés en TP. Pour R comme pour la SOD, je laisse faire les experts !

Je remercie les botanistes de l'Université de Strasbourg et du Conservatoire Botanique de Brest qui ont partagé avec moi leurs connaissances ou qui ont récolté pour moi des spécimens, les Dr Michel Hoff, Gisèle Haan-Archipoff, Sylvie Magnanon et Marion Hardegen.

Merci aussi au Pr Philippe André pour nous avoir apporté son aide dans nos folies sur le microbiome... Merci pour ce partage de connaissance et pour m'avoir laissé manipuler dans votre laboratoire.

Merci aux personnes qui nous facilitent le quotidien : Valérie pour les autoclaves, Bruno ("SOS détresse informatique", les fraises tagada, la balance, ...), Marianne, Françoise et plus récemment David pour la gestion des innombrables commandes et déplacements.

Merci aux stagiaires bénévoles qui m'ont aidée dans ce travail de thèse, Michaël, Maëva et Damien. Et un très grand merci à Cécile Zumbiehl pour son investissement durant 7 mois sur ce projet, quel bonheur de partager la même vision du travail, c'était vraiment "style genre cool". Merci aussi aux autres personnes qui sont passées dans le laboratoire et qui m'ont donné le sourire et/ou appris des choses, comme Marianne, Dia, Joshua et Olivier.

Je tiens également à remercier l'ensemble de membres de l'UMR 7200 avec une mention spéciale pour le trio masculin *d'en face*, Ludo, Patrick et Yann, qui a toujours résolu mes problèmes qu'ils soient de bonbonne de gaz, de roi lion, de nourriture, de lyophilisateur... Merci également au Dr Mélanie Bourjot pour son écoute et ses nombreux conseils échangés

autour d'une bonne pizza ou d'un bon thé. Merci pour le temps que tu m'as consacré et l'aide que tu m'as apportée, merci pour ton soutien et ta belle amitié. Merci aux gens de l'*aquarium* qui ont écouté pendant 3 ans mes éternelles doléances plus ou moins légitimes, plus ou moins politiquement correctes. Je remercie également Amélie Leick pour avoir pris soin de moi pendant ce temps passé au labo, merci pour sa bienveillance, son calme à toute épreuve qui m'a souvent apaisé, sa profonde gentillesse, où que j'aille, tu me manqueras, tu es une collègue en or.

Un immense merci à Michaelis Tsoukalas pour m'avoir appris les bases de la pharmacognosie, pour sa patience devant mes débuts en RMN (alors que ce n'était pas gagné ...), pour son écoute, pour m'avoir invitée à ses pauses "clopes", pour l'initiation à la LH20 sous vide, à la sonication des tasses à café, merci d'être venu faire du ski sous la pluie. Merci à Florence Auberon pour son humour infailible, sa disponibilité sur Messenger H24 (bon peut être pas le matin), la découverte de Peter, sa confiance... L'union fait la force !!!! Merci à vous deux pour toutes ces bonnes bouteilles et toute cette bonne nourriture ~~healthy~~ engloutie, merci pour tout ces fous rires et cet amour partagé. Vous m'avez apporté la douceur et la légèreté nécessaire pour en venir à bout ...

Ma survie pendant ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans mes proches, Cyrielle et Perrine pour les histoires de l'industrie cosmétique, les questionnements sur la chromatographie et la spectroscopie de masse à toute heure du jour et de la nuit, ainsi que le SAV Agilent en québécois ! Pauline pour sa patience, ses encouragements et surtout son soutien dans ce domaine pourtant si loin du sien. Un immense merci à mes parents qui m'ont permis de faire des études (très) longues, qui m'ont toujours soutenue et qui ont toujours cru en moi. Egalement un très grand merci à ma sœur Mathilde pour son écoute, ses encouragements, pour m'avoir supportée pendant ces années difficiles et m'avoir apporté Sacha, rayon de soleil de la dernière année. Merci à vous pour votre amour. Merci également à ceux qui ont cru en moi dans l'ombre.

Si j'y suis parvenue c'est grâce à vous tous ...

Et si le ciel s'obscurcit ... le soleil finira toujours par revenir ...

Liste des communications	1
Liste des abréviations	3
Introduction générale	7
Chapitre 1 : Introduction.....	11
I. Les plantes du littoral	13
A. Caractéristiques de la végétation du littoral : Exemple de la flore bretonne ..	13
1. Faciès rocheux	13
2. Faciès sableux	14
3. Les cordons de galets	16
4. Faciès vaseux.....	16
B. Le cas des halophytes	17
1. Stress salin et halophytes.....	17
2. Les différents modes de tolérance au stress salin.....	20
a. Adaptations physiologiques.....	20
b. Exemples d'adaptations morphologiques et anatomiques	20
c. Adaptations métaboliques.....	22
c.1 Métabolisme photosynthétique.....	22
c.2 Les osmolytes protecteurs	23
c.3 Les antioxydants.....	25
d. Le microbiome.....	27
C. Conclusion sur les plantes du littoral	29
II. Les cibles biologiques dermo-cosmétiques	30
A. La peau	30
1. Structure de la peau	30
a. L'épiderme	31
b. Le derme	32
b.1 Les types cellulaires	33

b.2	La matrice extracellulaire	34
c.	L'hypoderme	36
d.	La vascularisation cutanée.....	36
e.	L'innervation cutanée.....	37
f.	Les annexes cutanées.....	37
2.	Fonctions et propriétés de la peau	38
a.	Propriétés mécaniques	38
b.	Barrière cutanée	38
c.	Thermorégulation	39
B.	Choix des cibles biologiques	39
1.	Le vieillissement cutané	39
a.	Stress oxydant.....	41
b.	Les métalloprotéinases matricielles.....	43
2.	L'inflammation	43
a.	Généralités et étapes de l'inflammation.....	43
b.	Les médiateurs de l'inflammation.....	45
c.	Le cas du monoxyde d'azote.....	48
d.	Actifs dermo-cosmétiques anti-inflammatoires.....	49
3.	La cicatrisation	50
C.	Conclusion sur les cibles biologiques dermo-cosmétiques.....	51
III.	Les biotechnologies végétales.....	52
A.	Culture <i>in vitro</i> de cellules et tissus végétaux.....	52
1.	Introduction	52
2.	Historique de la culture végétale <i>in vitro</i>	52
3.	Les différentes techniques de CVIV	53
a.	Généralités	53
b.	Culture de cellules dédifférenciées.....	57

c.	Régénération d'un vitroplant.....	58
d.	Cultures racinaires	59
d.1	Les <i>hairy roots</i>	60
d.2	Les racines adventives.....	61
B.	Production de molécules d'intérêt par CVIV	62
1.	Généralités.....	62
2.	Les stratégies utilisées pour augmenter la production de métabolites secondaires	65
a.	Choix d'une lignée	66
b.	Elicitation.....	66
b.1	Le méthyl jasmonate.....	68
b.2	L'acide salicylique	69
b.3	Le chitosan.....	70
b.4	La coronatine	71
b.5	Autres exemples d'éliciteurs.....	71
c.	Addition de précurseurs.....	71
d.	Ingénierie métabolique	72
e.	Autres paramètres influant sur la production de métabolites secondaires.....	72
f.	Stratégies combinées	73
3.	Limites de la production de métabolites par CVIV	74
C.	Conclusion sur les biotechnologies végétales	75
	Chapitre 2 : Etude d'<i>Armeria maritima</i> (Mill.) Willd.	77
I.	Etude bibliographique	80
A.	La famille des Plumbaginaceae	81
1.	Taxonomie.....	81
2.	Distribution.....	83
3.	Description botanique	83
4.	Phytochimie.....	84
5.	Activités biologiques.....	86

6.	Cultures <i>in vitro</i>	88
B.	L'espèce <i>Armeria maritima</i> (Mill.) Willd.....	89
1.	Répartition géographique	89
2.	Description botanique	90
3.	Etudes phytochimiques antérieures	92
4.	Activités biologiques.....	93
5.	Cultures <i>in vitro</i>	94
C.	Conclusion de l'étude bibliographique d'<i>A. maritima</i>.....	96
II.	Investigation phytochimique des parties aériennes d'<i>A. maritima</i> .	97
A.	Stratégie d'extraction et de purification des composés.....	97
1.	Extractions.....	97
2.	Fractionnement de l'extrait AmB	99
3.	Fractionnement de l'extrait AmA	102
4.	Fractionnement de l'extrait AmD	104
B.	Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes.....	107
C.	Détermination structurale des molécules isolées	108
1.	Phénols & acides phénoliques.....	108
a.	Biosynthèse.....	108
b.	Elucidation structurale.....	110
c.	Conclusion	118
2.	Les hétérosides de flavonols	118
a.	Biosynthèse.....	118
b.	Elucidation structurale	119
b.1	Hétérosides flavoniques mono-glycosylés	120
b.1.1	Myricétine monoglycosylée	120
b.1.2	Kaempférol monoglycosylé.....	129
b.1.3	Quercétine monoglycosylée	134
b.2	Hétérosides flavoniques di-glycosylés	137

b.2.1	Détermination structurale des génines.....	137
b.2.2	Détermination de l'enchaînement α -L-rhamnopyranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranose (rutinose) et structure des composés B2, B3, B4, B11.....	140
b.2.3	Détermination de l'enchaînement α -L-arabinopyranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranose (vicianose) et structure de B5, B6 et B7.....	144
b.2.4	Détermination de l'enchaînement α -L-arabinofuranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranose, et structures de B8, B9 et B10.....	148
c.	Conclusion.....	156
3.	Les lignanes.....	157
a.	Biosynthèse.....	157
b.	Elucidations structurales.....	157
c.	Conclusion.....	163
4.	Les megastigmanes.....	164
a.	Biosynthèse.....	164
b.	Elucidations structurales.....	164
c.	Conclusion.....	168
5.	Les lipides et terpènes.....	169
D.	Conclusion de l'investigation phytochimique d'<i>A. maritima</i>.....	170
III.	Evaluation des activités biologiques d'<i>A. maritima</i>.....	174
A.	Activité anti-oxydante.....	174
1.	Neutralisation de la formation du radical DPPH.....	174
2.	Test ORAC.....	175
B.	Evaluation de la toxicité des extraits.....	177
1.	Evaluation de la cytotoxicité des extraits sur des macrophages murins.....	177
2.	Evaluation de la cytotoxicité des extraits sur des cellules mononucléées humaines.....	178
3.	Evaluation de la phototoxicité des extraits sur des fibroblastes humains.....	179
4.	Conclusion des essais de toxicité.....	180
C.	Activité anti-MMP.....	180
1.	Activité anti-élastase.....	180

2.	Activité anti-collagénase	182
a.	Activité des extraits	182
b.	Activité des molécules pures	183
D.	Activité anti-inflammatoire	187
1.	Inhibition de la production de NO.....	187
2.	Inhibition de la sécrétion de cytokines	188
a.	Activité des extraits	188
b.	Activité des acides phénoliques et phénols	191
c.	Activité des flavonols monoglycosylés	192
d.	Activité des flavonols diglycosylés	194
e.	Activités des lignanes et mégastigmanes.....	195
f.	Conclusion sur l'inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.....	196
	
E.	Activité cicatrisante	197
F.	Conclusion sur les activités biologiques d'<i>A. maritima</i>	201
IV.	Culture <i>in vitro</i> d'<i>A. maritima</i>.....	202
A.	Mise en place d'un protocole de callogénèse.....	202
1.	Essais préliminaires	202
2.	Influence de la nature de l'explant sur la callogénèse.....	203
3.	Influence des hormones sur la callogénèse	207
4.	Autres mises au point réalisées pour l'optimisation de la callogénèse.....	208
5.	Conclusion.....	209
B.	Initiation de suspensions cellulaires.....	210
C.	Conclusion de l'étude biotechnologique d'<i>A. maritima</i>	211
V.	Bilan et perspectives de l'étude d'<i>A. maritima</i>.....	213
	Chapitre 3 Etude d'<i>Helichrysum stoechas</i> (L.) Moench.	215
I.	Etude bibliographique d'<i>H. stoechas</i>	218

A. La famille des Asteraceae	218
B. Le genre <i>Helichrysum</i>.....	220
1. Répartition géographique	220
2. Description botanique	221
3. Etudes phytochimiques antérieures	222
4. Activités biologiques.....	224
5. Culture <i>in vitro</i>	226
C. L'espèce <i>H. stoechas</i> (L.) Moench.....	228
1. Répartition géographique et écologie.....	228
2. Description botanique	228
3. Réglementation.....	230
4. Etudes phytochimiques antérieures	231
5. Activités biologiques déjà décrites.....	233
6. Protocoles de culture <i>in vitro</i>	235
D. Conclusion de l'étude bibliographique d'<i>H. stoechas</i>	235
II. Etude phytochimique d'<i>H. stoechas</i>.....	236
A. Profil phytochimique.....	236
1. Contexte & Stratégie analytique	236
2. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes	238
3. Caractérisation par déréplication des composés majoritaires des suspensions cellulaires	238
4. Comparaison des profils phytochimiques des suspensions cellulaires et de la plante	247
5. Conclusion des analyses phytochimiques d' <i>H. stoechas</i>	252
B. Comparaison de différentes méthodes d'extraction du 3,5-diCQA à partir des parties aériennes d'<i>H. stoechas</i>	254
1. Contexte	254
2. Extraction assistée par micro-ondes (MAE)	257

3.	Extraction par solvant pressurisé (PFE)	259
4.	Extraction par fluide supercritique (SFE)	260
5.	Praticité des méthodes	263
6.	Conclusion de la comparaison de techniques d'extraction	265
III.	Evaluation des activités biologiques d'<i>H. stoechas</i>	266
A.	Activité antioxydante	266
B.	Evaluation de la cytotoxicité.....	267
1.	Evaluation de la cytotoxicité des extraits sur des macrophages murins	267
2.	Evaluation de la cytotoxicité des extraits sur des cellules mononucléées humaines.....	268
C.	Activité anti-inflammatoire	269
1.	Inhibition de la production de NO.....	269
2.	Inhibition de la sécrétion de cytokines	270
D.	Conclusion sur les activités biologiques d'<i>H. stoechas</i>	272
IV.	Elicitation des cellules d'<i>H. stoechas</i>.....	273
A.	Contexte.....	273
B.	Caractérisation de la suspension.....	273
C.	Elicitations.....	274
1.	Elicitation par le chlorure de sodium	275
2.	Elicitation par le chitosan	278
3.	Elicitation par le méthyl jasmonate	281
4.	Elicitation par l'acide salicylique.....	283
5.	Elicitation par la coronatine	284
6.	Elicitations combinées.....	285
a.	Elicitation méthyl jasmonate / chitosan	285
b.	Elicitation méthyl jasmonate / acide salicylique	287
c.	Elicitation chitosan / acide salicylique	288

d.	Elicitation MeJa / SA / chitosan	290
D.	Conclusion des tests d'élicitation d'<i>H. stoechas</i>	291
V.	Bilan & perspectives de l'étude d'<i>H. stoechas</i>	292
	Conclusion générale.....	293
	Chapitre 4 : Partie expérimentale.....	297
I.	Matériel végétal	299
A.	<i>Armeria maritima</i>	299
1.	Matériel végétal utilisé pour l'étude phytochimique.....	299
2.	Matériel végétal utilisé pour la culture in vitro (CIV)	299
B.	<i>Helichrysum stoechas</i>.....	299
1.	Matériel végétal utilisé pour les criblages phytochimique et biologique.....	299
2.	Suspensions cellulaires.....	299
II.	Analyse phytochimique : procédures générales	300
A.	Solvants et réactifs.....	300
B.	Techniques d'extraction	300
1.	<i>Armeria maritima</i>	300
2.	<i>Helichrysum stoechas</i>	300
a.	Extraction assistée par ultra-sons	300
b.	Extraction assistée par micro-ondes (MAE).....	301
c.	Extraction accélérée par solvant (ASE).....	301
d.	Extraction par fluide supercritique (SFE).....	302
C.	Méthodes chromatographiques.....	302
1.	Chromatographie sur couche mince (CCM)	302
2.	Chromatographie liquide haute performance (HPLC-DAD).....	303
3.	Chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse (HPLC-DAD-HRMS).....	304
4.	Chromatographie en phase gazeuse (GC-MS).....	305

D. Méthodes de fractionnement et purification.....	305
1. Partages liquide-liquide.....	305
2. Chromatographie liquide sous vide (VLC).....	306
3. Chromatographie d'exclusion.....	307
4. Chromatographie liquide haute performance semi-préparative.....	307
E. Méthodes physiques et spectrales	308
1. Spectrométrie de masse (MS).....	308
2. Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	309
3. Pouvoir rotatoire.....	310
III. Purifications des composés d'<i>A. maritima</i>	310
IV. Caractéristiques physiques et spectrales des molécules isolées dans les parties aériennes <i>A. maritima</i>	314
V. Essais biologiques.....	345
A. Activités anti-oxydantes.....	345
1. Test de réduction du radical DPPH.....	345
2. Test de capacité d'absorption des radicaux oxygénés (ORAC).....	346
B. Activité anti-métalloproéinases matricielles (MMP)	347
1. Test anti-élastase.....	347
2. Test anti-collagénase.....	348
C. Activité anti-inflammatoire	350
1. Dosage de la sécrétion de monoxyde d'azote par des macrophages murins	350
2. Dosage de la sécrétion de cytokines par des cellules mononuclées humaines.	351
D. Activité cicatrisante.....	353
E. Evaluation de la photo-toxicité.....	354
VI. Dosages de métabolites secondaires.....	355
A. Dosage des polyphénols totaux.....	355
B. Dosage des flavonoïdes.....	356

C. Dosage des acides dicaféoylquiniques.....	356
1. Conditions chromatographiques.....	356
2. Validation de la méthode pour chaque isomère	357
VII. Culture végétale <i>in vitro</i>	359
A. <i>Armeria maritima</i>	359
1. Conditions de culture	359
2. Préparation des explants.....	359
3. Composition des milieux de culture.....	360
4. Initiation de suspensions cellulaires	362
B. <i>Helichrysum stoechas</i>.....	363
1. Conditions de culture	363
2. Composition du milieu de culture	363
3. Repiquage des suspensions	364
4. Elicitation	364
a. Méthyl jasmonate	365
b. Acide salicylique	365
c. Chlorure de sodium	365
d. Chitosan.....	365
e. Coronatine	365
C. Analyses statistiques.....	366
Bibliographie.....	367

Liste des communications

Publications & brevets :

Gourguillon L., Rustenholz C., Lobstein A., Gondet L., Callus induction and establishment of cell suspension cultures of the halophyte *Armeria maritima* (Mill.) Willd. *Scientia Horticulturae* - *soumise le 13/05/17*.

Gourguillon L. & Cattuzzato L., Procédé d'obtention d'un extrait d'*Armeria maritima*. (demande de brevet N°1655868 déposée le 23/06/16)

Gourguillon L., Destandau E., Lobstein A., Lesellier E., Evaluation of different ways to extract dicaffeoylquinic acids from a halophytic plant. *Comptes Rendus Chimie*, 19 (9), 1133-1141, 2016.

Communications des congrès internationaux :

Gourguillon L., Lobstein A., Gondet L., Effect of explant type, culture media, growth regulators for callus induction of a bioactive halophyte *Armeria maritima*. Joint Natural Products Conference, Copenhagen - Danemark (23 - 27 juillet 2016) *poster*

Gourguillon L., Lobstein A., Gondet L., Biological properties and phytochemical analysis of the halophyte *Armeria maritima* Willd. (Plumbaginaceae). Joint Natural Products Conference, Copenhagen - Danemark (23 - 27 juillet 2016) *poster*

Gourguillon L., Lavaud C., Lobstein A., Gondet L., Anti-aging activity and phenolic compounds of *Armeria maritima* ; setting up a cell culture protocole. Cosm'ing, Saint-Malo - France (29 juin - 1er juillet 2016) *poster*

Gourguillon L., Zumbiehl C., Antheaume C., Lobstein A., First isolation and identification of polyphenols from the halophyte *Armeria maritima* Willd. International congress and annual meeting of the society for medicinal plant research, Budapest - Hongrie (23 - 27 août 2015) *poster*

Gourguillon L., Lobstein A., Lesellier E., Optimization of bioactive phenolic compounds extraction by modified supercritical fluid. International congress and annual meeting of the society for medicinal plant research, Budapest - Hongrie (23 - 27 août 2015) *poster*

Communications à des congrès nationaux

Gourguillon L., Cattuzzato L., Lavaud C., Lobstein A., Gondet L., Phytochimie et biotechnologies, des approches complémentaires dans la valorisation d'une halophyte bioactive. Symposium Phytoday, Nancy (24 juin 2016). *communication orale*

Gourguillon L., Destandau E., Lobstein A., Lesellier E., Comparaison de méthodes d'extraction à partir d'une plante halophile. Congrès de l'association francophone des sciences séparatives, Paris (31 mars - 2 avril 2015) *poster*

Liste des abréviations

AA	Acide acétique
AAPH	2,2'-azobis(2-amidino-propane)dihydrochlorure
AcOEt	Acétate d'éthyle
ACN	Acétonitrile
AGP	Angiosperm group phylogeny (classification phylogénétique)
AIA	Acide indole 3-acétique
AIB	Acide β -indole butyrique
AmA	Extrait acétate d'éthyle d' <i>A. maritima</i>
AmB	Extrait butanolique d' <i>A. maritima</i>
AmC	Extrait cyclohexanique d' <i>A. maritima</i>
AmD	Extrait dichlorométhanique d' <i>A. maritima</i>
ANA	Acide Naphtalène Acétique
BAP	6-benzylaminopurine
BPC	Base peak chromatogram
C°	Concentration
cHex	Cyclohexane
CI 50	Concentration inhibitrice 50
CIV	Culture <i>in vitro</i>
CQA	Acide caféoylquinique
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CVIV	Culture végétale <i>in vitro</i>
2,4-D	Acide 2,4-dichlorophenoxyacétique
DAD	Diod array detector
DEDL	Détecteur évaporatif à diffusion de lumière
diCQA	Acide dicaféoylquinique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNP	Dictionary of natural products
DPPH	1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle
EGF	Facteur de croissance épidermique
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector (DEDL)
ESI	Electrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
FA	Acide formique

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	Spectromètre de masse haute résolution
HsC	Extrait hydro-alcoolique de cellules dédifférenciées d' <i>H. stoechas</i>
HsP	Extrait hydro-alcoolique de parties aériennes d' <i>H. stoechas</i>
IFN	Interféron
IL	Interleukine
KIN	Kinétine
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
LPS	Lipopolysaccharides
MAE	Extraction assistée par micro-ondes
MEC	Matrice extra-cellulaire
MeJa	Méthyl-jasmonate
MeOH <i>d</i>₄	Méthanol deutéré
MeOH	Méthanol
MM	Masse molaire
MMP	Matrix metalloproteinases
MS	Murashige & Skoog (medium)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Neu-PEG	2-aminoéthyl-diphénylborate de sodium - Polyéthylène glycol
NHEK	Normal Human Epidermal Keratinocytes
NMAAPVCK	N-méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Prop-Val-chlorométhyl cétone
ORAC	Capacité d'absorption des radicaux oxygénés
PAL	Phénylalanine ammonia lyase
PBMC	Cellules mononuclées de sang périphérique
PF	Poids frais
PFE	Extraction par solvant pressurisé
PIF	Facteur de photo-irradiation
PPM	Plant Preservative Mixture
PS	Poids sec
QTOF	Quadripôle-Temps de Vol
ROS	Reactive oxygen species
SA	Acide salicylique
SFE	Extraction par fluide supercritique
TAC	Total absorbance chromatogramme

TDZ	Thidiazuron
TIC	Total Ion Courant
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TOPO	<i>meta</i> -topoline
VLC	Chromatographie liquide sous vide
WPM	Woody Plant Medium
WST	Water Soluble Tetrazolium salts
ZEA	Zéatine

Introduction générale

Ce travail de thèse a été réalisé grâce au soutien scientifique, technologique et financier de la société bretonne BiotechMarine, spécialisée dans la fabrication et la commercialisation d'actifs cosmétiques issus d'algues et de plantes du littoral. Cette société est également experte en biotechnologies végétales, avec une activité de culture de cellules différenciées de plantes du littoral breton et de gamétophytes de macro-algues. Elle fait partie depuis 2014 du groupe Seppic (www.seppic.com), filiale de Air Liquide, spécialisé dans les actifs et les excipients pour les industries cosmétique, pharmaceutique et vétérinaire. BiotechMarine est en quête perpétuelle de nouvelles matières premières végétales, extraits, cellules, molécules, pouvant être valorisées dans l'industrie cosmétique. C'est dans ce souci d'innovation que mes travaux de thèse ont été menés en collaboration avec l'équipe de Pharmacognosie et Substances Naturelles Bioactives, au sein du Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (UMR 7200) de la Faculté de Pharmacie Strasbourg, avec des objectifs conjoints en recherche fondamentale et appliquée.

Dans ce travail de thèse pluridisciplinaire, deux halophytes, *Helichrysum stoechas* (L.) Moench (Asteraceae) et *Armeria maritima* Mill. Willd. (Plumbaginaceae), ont fait l'objet d'études phytochimiques, biologiques et biotechnologiques. Dans les deux cas, une exploration phytochimique a été conduite afin d'identifier des extraits et/ou des molécules susceptibles de porter une activité biologique intéressante pour une valorisation potentielle comme actif dermo-cosmétique. En parallèle, un travail biotechnologique a été mené afin de cultiver des suspensions cellulaires de ces deux plantes pour la production de molécules bioactives, et étudier l'influence d'éliciteurs. *Armeria maritima* est une espèce peu étudiée et pour laquelle nous ne disposons que de plantes, alors qu'*Helichrysum stoechas* est une espèce ayant déjà fait l'objet de travaux, et pour laquelle la société BiotechMarine nous a fourni des suspensions cellulaires déjà établies. Ainsi les stratégies et techniques mises en œuvre pour étudier ces deux espèces sont complémentaires ; elles se situent à différents niveaux dans la progression méthodologique que nous avons mise en place.

Tableau : Présentation des objectifs pour les deux espèces végétales étudiées

	<i>Armeria maritima</i> (Mill). Willd.	<i>Helichrysum stoechas</i> (L.) Moench
Phytochimie	Explorer les métabolites secondaires majoritaires synthétisés dans les parties aériennes de la plante afin de définir de potentiels bio-marqueurs.	<p>Etudier les métabolites secondaires synthétisés par des cellules dédifférenciées afin de choisir un bio-marqueur.</p> <p>Comparer ces métabolites à ceux synthétisés par la plante.</p> <p>Etudier différentes techniques pour l'extraction des bio-marqueurs.</p>
Biologie	Evaluer les activités biologiques des extraits et des molécules isolées sur des cibles dermo-cosmétiques.	Evaluer les activités biologiques sur des cibles dermo-cosmétiques d'un extrait de cellules <i>versus</i> un extrait de plante, et du marqueur mis en évidence dans l'étude phytochimique
Biotechnologie	Développer un protocole de callogénèse efficace et obtenir des suspensions cellulaires en vue d'une future production biotechnologique des molécules d'intérêt.	Cribler différents éliciteurs afin de trouver lequel est le plus prometteur pour augmenter la teneur en bio-marqueur dans les suspensions cellulaires.

Ce mémoire de thèse s'articule autour de quatre chapitres :

- **Le premier chapitre** est une étude bibliographique introductive. Il présente la végétation du littoral et discute les stratégies d'adaptation des halophytes en montrant le potentiel en dermo-cosmétique de ces plantes. La seconde partie est une introduction à la dermo-cosmétique, elle apporte des informations sur la biologie cutanée nécessaires à la compréhension du choix des cibles biologiques de notre étude (vieillesse cutané, inflammation et cicatrisation). Enfin la dernière partie est consacrée à la présentation de la culture végétale *in vitro* et l'intérêt qu'elle peut présenter pour la production de molécules à haute valeur ajoutée.

- **Le second chapitre** est dédié à l'étude d'*Armeria maritima* sous différents aspects : étude bibliographique (famille et espèce), exploration phytochimique (isolement et élucidation structurale), tests d'activité biologique (antioxydant, anti-métalloprotéinase matricielle, anti-inflammatoire et cicatrisant) et culture *in vitro* (mise en place d'un protocole de callogénèse et obtention de suspensions).
- **Le troisième chapitre** est dédié à l'étude d'*Helichrysum stoechas* sous différents aspects : étude bibliographique, étude phytochimique (caractérisation *online* et techniques d'extraction), tests d'activité biologique (antioxydante et anti-inflammatoire) et culture *in vitro* (élicitations).
- **Le quatrième chapitre** présente l'ensemble du matériel et des méthodes utilisés pour l'étude d'*Armeria maritima* et *Helichrysum stoechas*. Il reprend également la stratégie de fractionnement et de purification des molécules d'*A. maritima*, ainsi que la description de chacune d'entre elles sous forme de fiches produits.

Chapitre 1 : Introduction

I. Les plantes du littoral

Les plantes du littoral sont adaptées pour résister au stress salin. Le sol sur lequel ces végétaux se développent est spécifique, il peut s'agir par exemple de zones humides ou de zones dunaires. De plus, il existe plusieurs types de littoraux en fonction des climats, et donc différents types de cortèges phytogéographiques (Philippon et al., 2006). Par exemple, la flore du littoral méditerranéen n'est pas la même que celle du littoral atlantique, qui elle-même est différente des mangroves.

A. Caractéristiques de la végétation du littoral : Exemple de la flore bretonne (Philippon et al., 2006)

En Bretagne, le climat est océanique tempéré. L'humidité y est importante, mais les températures sont douces. Les courants et vents marins adoucissent les variations de températures diurnes et saisonnières. Contrairement à la flore méditerranéenne, la flore atlantique tolère mal la sécheresse. Elle tolère également mal le froid. Le sol breton est majoritairement acide, ce qui est illustré par la présence de landes de bruyères. Cependant, le calcaire qui provient des débris coquilliers permet le développement de quelques plantes calcicoles en Bretagne comme les orchidées *Anacamptis pyramidalis* et *Ophrys apifera*, des hélianthèmes et des clématites.

La végétation est répartie de la façon suivante : les algues dans les zones immergées (ou immergées ponctuellement avec les marées), les lichens et ensuite les phanérogames (parfois retrouvés aussi dans les zones immergées). Ces dernières, de par leur proximité à l'océan, sont soumises aux embruns.

Le littoral est constitué de plusieurs zones (faciès rocheux, faciès sableux, cordons de galets et faciès vaseux); la végétation de chacune d'entre elles est détaillée ci-dessous.

1. Faciès rocheux

Dans les fissures des rochers, on retrouve essentiellement deux espèces, réparties en touffes, *Armeria maritima* (Plumbaginacées) et *Crithmum maritimum* (Apiacées) (Figure 1.1 A-B). D'autres espèces peuvent les accompagner comme *Cochlearia danica*, *Daucus carota*,

Spercularia rupicola, *Inula crithmoides* ou *Limonium binervosum* (Figure 1.1 C-D). Dans tous les cas il s'agit d'espèces spécifiques du littoral.

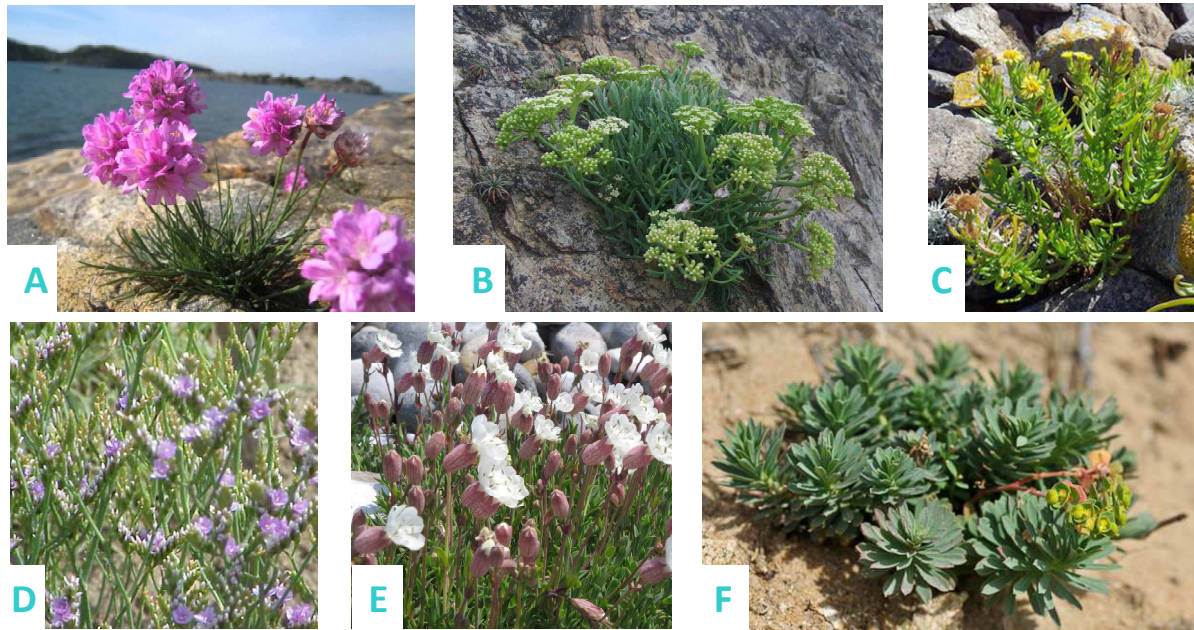


Figure 1.1 : Plantes présentes sur le faciès rocheux de Bretagne

A. *Armeria maritima*, B. *Crithmum maritimum*, C. *Inula crithmoides*, D. *Limonium binervosum*, E. *Silene uniflora*, F. *Euphorbia portlandica*

A.D www.wikipedia.fr, B. www.jardinage.ooreka.fr, C. www.nature22.com E. www.commonswikimedia.org F. <http://www.florealpes.com>

Sur le sommet des falaises, on retrouve généralement une pelouse. Cette pelouse est qualifiée d'aérohaline, ce qui signifie qu'elle tolère la salinité de l'air. Néanmoins, la végétation y est assez diversifiée et on peut y trouver des espèces qui ne sont pas spécifiques du littoral. Les espèces toujours présentes sur ces pelouses sont *Festuca rubra*, *Silene uniflora*, *Euphorbia portlandica* (Figure 1.1 E-F). En fonction de la nature du sol de ces pelouses, on peut aussi retrouver des Crassulacées, ou des espèces calcicoles.

Au-delà des prairies aérohalines, on retrouve la végétation continentale classique.

2. Faciès sableux

On parle de végétation du littoral sableux pour les plantes qui se développent sur les dunes. A noter que les dunes sont des biotopes très fragiles et menacés (Ciccarelli and Bacaro, 2016; www.bretagne-environnement.org). Les espèces qui poussent sur les dunes sont qualifiées de **psammophiles** (du grec *psammos* : sable) ou **arénophiles** (du latin *arena* : sable) et peuvent

être appelées par extension psammophytes. Sur les dunes, on peut également retrouver des espèces **xérophytes** (du grec *xeros* : sec) qui sont capables de résister à la sécheresse. C'est le cas d' *Helichrysum stoechas* et d'*H. italicum* qui ne sont pas citées ici car elles ne sont pas prépondérantes dans les Côtes-d'Armor.

Sur les plages le sable, qui est très mobile, n'est pas capable de retenir l'eau. Il n'y a donc que quelques espèces pionnières capables de s'y développer, ces espèces sont **halo-nitrophiles**, c'est à dire qu'elles supportent ou ont besoin de sel et d'azote. Il s'agit de *Cakile maritima*, *Salsola kali*, *Atriplex laciniata*, *Atriplex glabriuscula*, *Glaucium flavum* et *Matricaria maritima* (Figure 1.2 A-D).

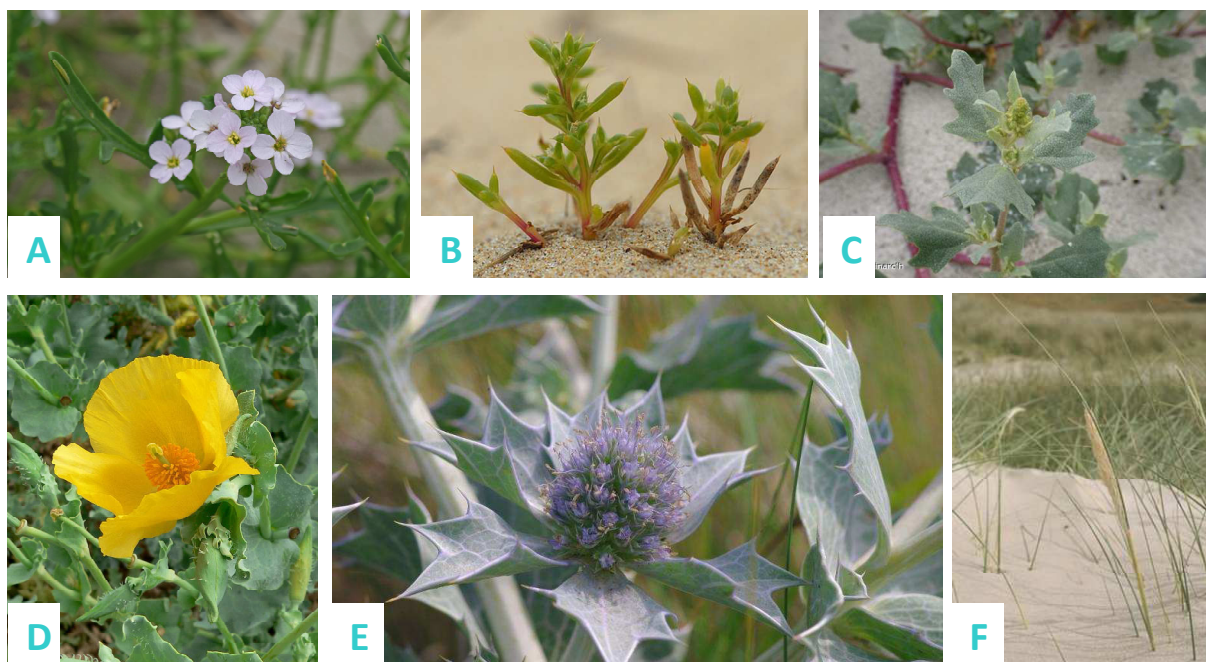


Figure 1.2: Plantes présentes sur le faciès sableux de Bretagne

A. *Cakile maritima*, B. *Salsola kali*, C. *Atriplex laciniata*, D. *Glaucium flavum*, E. *Eryngium maritimum*, F. *Ammophila arenaria*

A. www.plantis.info ; B. www.florealpes.com ; C, E, F. www.inpn.mnhn.fr; D. www.commonswikimedia.org

Ensuite, sur la dune embryonnaire, des graminées apparaissent comme *Elymus farctus* et *Festuca arenaria* dont le système racinaire commence à fixer le sable. La dune embryonnaire est suivie par les dunes mobiles (ou dunes blanches), où les contraintes écologiques restent fortes malgré l'éloignement de la mer. On y retrouve un petit nombre d'espèces parmi lesquelles : *Ammophila arenaria*, *Carex arenaria* ou encore *Eryngium maritimum* (Figure 1.2 E-F).

Les dunes mobiles sont suivies par les dunes fixées (ou dunes grises), un très grand nombre d'espèces est capable de s'y développer, elles ne sont généralement pas spécifiques du littoral. Puis on retrouve une végétation dite d'arrière-dune, qui devient plus continentale.

3. Les cordons de galets

Les cordons de galets constituent un milieu très hostile au développement des végétaux, seules deux espèces sont capables de s'y développer : *Crambe maritima* et *Solanum dulcamara* var. *marinium*. Si les galets sont colmatés par des matériaux plus fins, d'autres espèces parviendront à s'y développer, comme par exemple celles des milieux rocheux ou sableux, mais aussi des espèces nitrophiles comme *Beta vulgaris* subsp. *maritima*.

4. Faciès vaseux

Les vasières, zones distribuées le long des estuaires ou au fond des baies qui résultent d'une accumulation de sédiments extrêmement fins, sont également des biotopes hostiles.

La slikke est la partie inférieure de l'estran qui est soumise aux marées deux fois par jour. Elle est le premier niveau de végétation. On y retrouve les *Salicornia* sp., qui sont des plantes capables de résister à des immersions fréquentes et donc à un stress salin très important ainsi que les *Spartinas* sp.

Après la slikke, on retrouve le schorre ou pré-salé, zone supérieure de l'estran, immergée seulement lors des grandes marées. La plante la plus fréquente dans cette zone est *Halimione portulacoides*, qui est un sous-arbrisseau. On y retrouve également une végétation plus diversifiée comme par exemple *Armeria maritima*, *Limonium vulgare*, *Aster tripolium* et des salicornes. A la limite haute du schorre, les plantes ne sont plus immergées, mais il s'agit toujours d'halophiles comme *Beta vulgaris* subsp. *maritima* ou *Atriplex prostrata*.

B. Le cas des halophytes

1. Stress salin et halophytes

Les **halophytes** (du grec *halos* : sel, *phyton* : plante) sont les plantes qui se développent sur des sols halomorphes. Le terme halophyte n'est pas strictement synonyme de plantes halophiles (du grec *halos* : sel, *philein* : aimer) qui sont des plantes qui aiment le sel et qui se développent mieux en présence de sel, comme *Thellungiella halophila* (Figure 1.3). Mais une confusion perdure entre les deux terminologies. Les plantes halophiles sont opposées aux glycophytes qui poussent sur des sols non salés, comme *Arabidopsis thaliana* (Figure 1.3)(CEVA, Universalis). Plusieurs définitions existent pour les halophytes (Grigore et al., 2014), on les définit généralement sur la base de leur tolérance à des concentrations de 200 mM à 400 mM de NaCl (Alhdad et al., 2013; Flowers and Colmer, 2008).

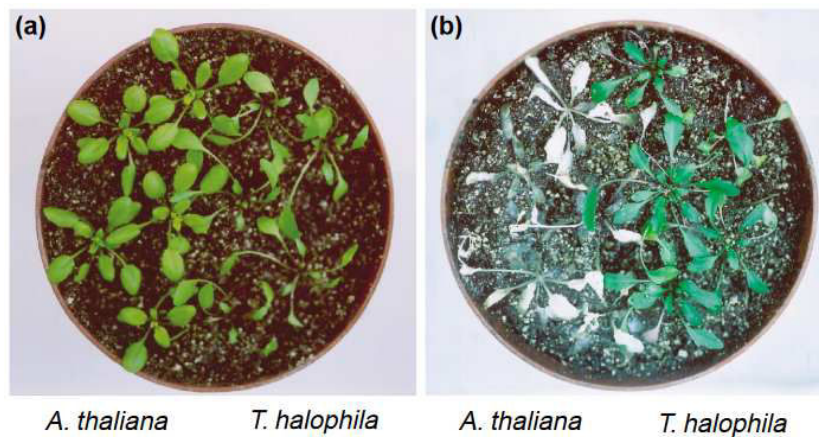


Figure 1.3 : La résistance au sel de *Thellungiella halophila*, une halophyte, comparée à *Arabidopsis thaliana*, une glycophyte.

(a) Plantes contrôles. (b) Plantes traitées avec 500 mM de NaCl pendant 10 jours. (Zhu, 2001)

Une plante évacue environ 750 g d'eau pour fixer 1g de CO₂. Si l'eau puisée par la plante est de l'eau de mer (~40 g/L de NaCl), cela résulte en la précipitation au niveau des feuilles d'1 mole de NaCl pour 9g d'eau prélevés. Un apport trop important en NaCl engendre chez les plantes un déficit hydrique important, une perturbation des membranes cytoplasmiques, une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), une diminution de l'efficacité photosynthétique, des difficultés dans l'assimilation de l'azote (Slama et al., 2015).

Les sols comportant des teneurs en NaCl anormalement élevées, sur lesquels se développent les halophytes, peuvent être soit des littoraux (cf. § I), soit des sols salés continentaux comme les chotts, qui sont des étendues d'eau permanentes dans des zones semi-arides où l'évaporation de l'eau est supérieure à sa percolation.

Les halophytes sont réparties en deux catégories, les halophytes strictes et les halophytes facultatives. Les premières ont besoin de sel pour se développer, alors que les secondes le tolèrent mais peuvent aussi se développer sur des sols non salés (Figure 1.4). Par exemple *Thellungiella halophila* supporte 200 mM de NaCl mais sa croissance est impactée alors que *Suaeda maritima* se développe mieux en présence de NaCl (Flowers and Colmer, 2008). On peut aussi trouver des plantes qui cumulent deux spécificités comme les **xéro-halophytes** comme par exemple *Helichrysum italicum* (Tela Botanica) ou les halo-nitrophiles comme *Cakile maritima* par exemple (Philippon et al., 2006).

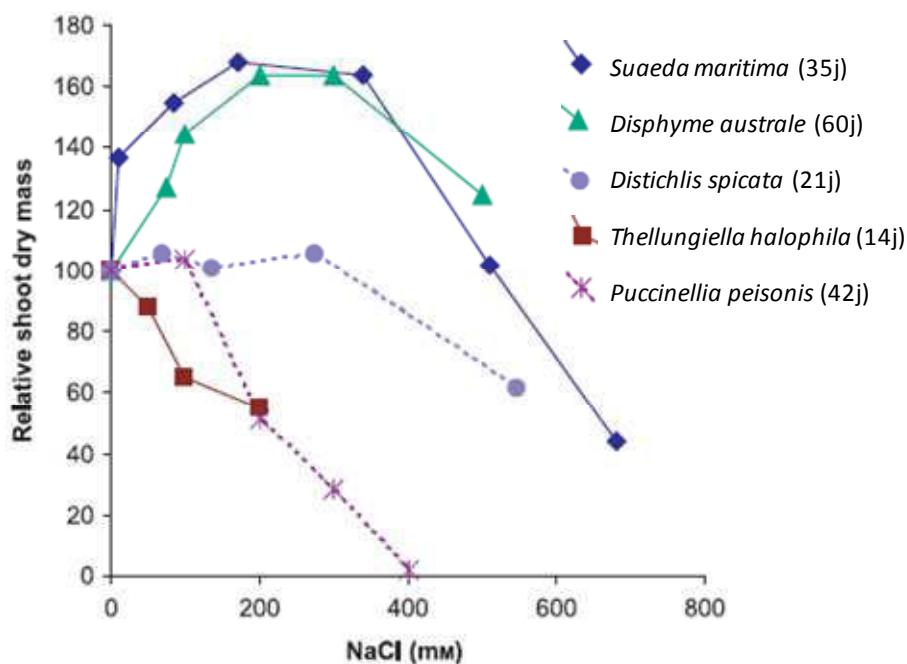


Figure 1.4 : Effet d'une salinité croissante sur la croissance des parties aériennes de différentes halophytes.

(Le temps d'exposition au NaCl est précisé entre parenthèse)

(Flowers and Colmer, 2008)

La figure 1.5, illustre l'effet du NaCl sur la croissance de l'halophyte *Limonium delicatulum*. Jusqu'à 200 mM, le NaCl stimule la croissance des plants, mais au delà de 200 mM, le NaCl devient phytotoxique.

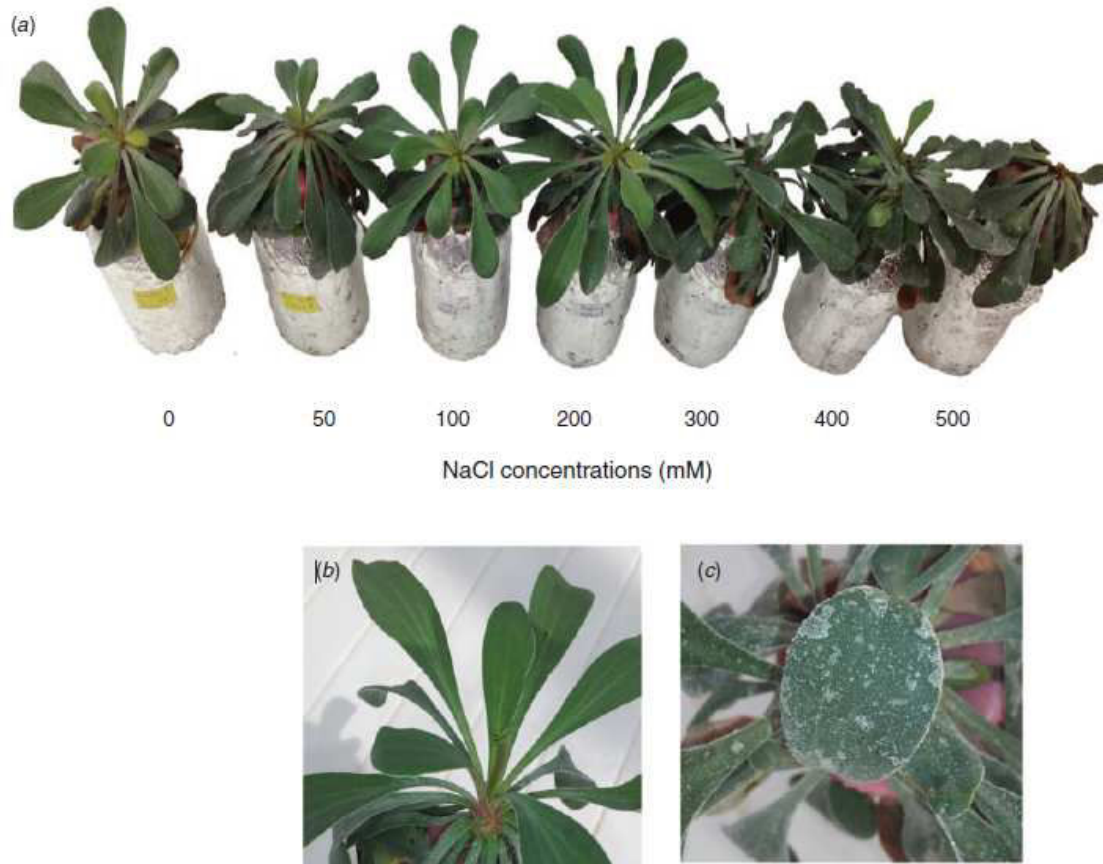


Figure 1.5 : a. Aspect morphologique de plants de *Limonium delicatulum* cultivés en hydroponie et soumis à différentes concentrations de NaCl ; Excrétion du sel sur la face abaxiale des feuilles : b. Plant contrôle ; c. Plant traité avec 500 mM de NaCl (Souid et al., 2016)

Les halophytes ne représentent que 0,25% des angiospermes et constituent un groupe très hétérogène d'un point de vue phylogénétique (Bromham, 2015). En effet, il existe des halophytes dans de nombreuses familles botaniques parmi lesquelles les Apiacées (*Crithmum maritimum*), les Asteracées (*Artemisia santonica*), les Brassicacées (*Lepidium latifolium*), les Fabacées (*Lotus tenuis*), les Plumbaginacées (*Armeria maritima*) ... Mais la famille qui contient le plus d'halophytes est la famille des Chénopodiacées, avec notamment les genres *Salicornia*, *Atriplex* et *Suaeda*. Les *Salicornia sp.* sont des plantes emblématiques de l'halophilie (Panta et al., 2014; Patel, 2016). *Thellungiella sp.* est une plante modèle de la famille des Brassicacées utilisée pour l'étude des mécanismes de tolérance au sel, notamment en comparaison avec la glycophyte modèle *Arabidopsis thaliana* (Dassanayake et al., 2011; Thellungiella).

2. Les différents modes de tolérance au stress salin

a. Adaptations physiologiques (Zhu, 2003)

Le stress salin engendre une concentration anormalement élevée d'ions Na^+ toxiques pour la plante. En effet, les ions K^+ ont un rôle important en tant que co-facteurs enzymatiques au niveau du cytoplasme, donc s'ils sont remplacés par les ions Na^+ , un dysfonctionnement métabolique apparaîtra. Mais malgré le stress salin, les halophytes arrivent à maintenir une teneur importante en ions K^+ , car les ions sodium et chlorures sont séquestrés dans la vacuole (Figure 1.6). Cette compartimentation permet un métabolisme normal dans le cytoplasme et une protection des organites.

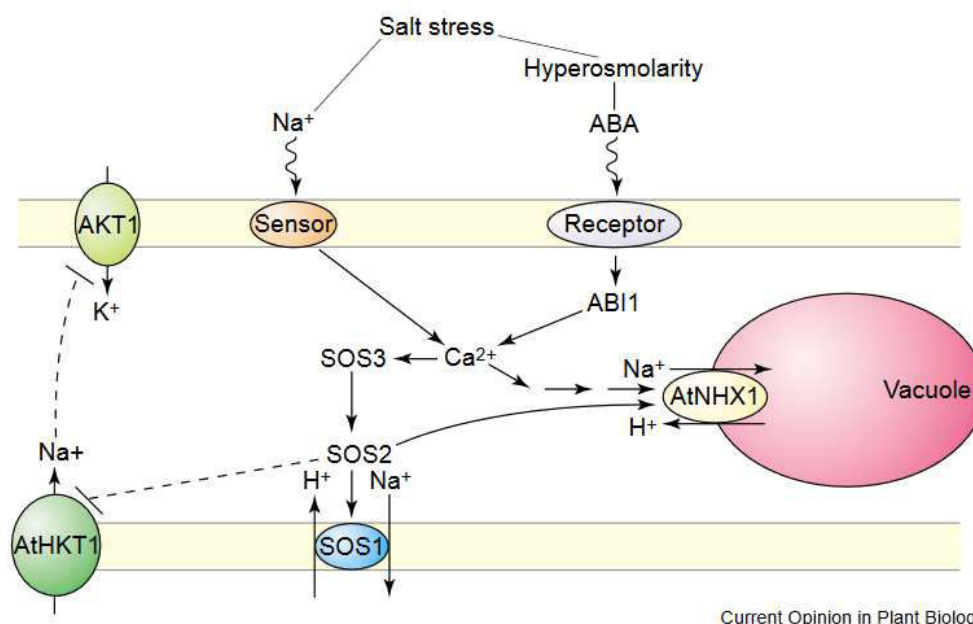


Figure 1.6 : Voies de signalisation qui régulent l'expression et l'activité des transporteurs ioniques pour le maintien d'une concentration faible en Na^+ en cas de stress salin.

(SOS : Salt overly sensitive (protéine) ; HKT : High affinity K^+ transporter ; NHX : Na^+/H^+ exchanger; ABA : Abscissic acid)

b. Exemples d'adaptations morphologiques et anatomiques (Grigore et al., 2014)

Certaines halophytes sont succulentes (*suculentus* : plein de suc). Les plantes sont alors charnues car les feuilles et/ou les tiges stockent de grandes quantités d'eau pour éviter le stress hydrique ; on parle alors de plantes xérophytes. C'est par exemple le cas de *Carpobrotus rossii* ou encore *Tecticornia verrucosa* (Figure 1.7 A-B) (Lieth and Mochtchenko, 2013).

Il existe des halophytes dont les parties aériennes sont cireuses. Les feuilles sont recouvertes de cires qui forment une pellicule mate et grasse. Cette pellicule permet de lutter contre le stress hydrique, elle peut parfois donner un effet blanchâtre aux feuilles, comme c'est le cas pour *Eryngium maritimum* et *Crambe maritima* (Figure 1.7 C-D).

Généralement les halophytes sont glabres, seules quelques espèces psammophiles possèdent un duvet comme *Helichrysum italicum* ou encore *Senecio candicans*.

Certaines espèces ont également des feuilles coriaces, notamment dans le genre *Rhizophora* (Figure 1.7 E-F) qui sont des espèces des mangroves ou encore *Limonium gmelini* et *Lepidium crassifolium*.

La lignification des halophytes est rare, exceptée chez les plantes des mangroves (Figure 1.7 F).



Figure 1.7 : Exemples d'adaptations morphologiques d'halophytes. A-B Halophytes succulentes (A. *Carpobrotus rossii* B. *Tecticornia verrucosa*), C-D Halophytes aux feuilles recouvertes d'une cire blanchâtre (C. *Eryngium maritimum* et D. *Crambe maritima*), E-F Feuilles charnues d'halophytes lignifiées (*Rhizophora* sp.)

(A. www.onlyfoods.net, B. www.anpsa.org.au, C. www.jardinage.ooreka.fr, D. <http://www.florealpes.com>, E. www.dreamstime.com, F. www.theconversation.com)

Certaines halophytes possèdent des structures (poils ou glandes) dédiées à la sécrétion de sel : on parle alors de **crynohalophytes**. On en retrouve dans les familles des Plumbaginaceae, des Tamaricaceae ou encore Frankeniaceae. Elles possèdent des trichomes spécialisés dans

l'excrétion de sels minéraux (Figure 1.8). La figure 1.5 c montre l'excrétion de sel par des feuilles de *Limonium delicatulum*.

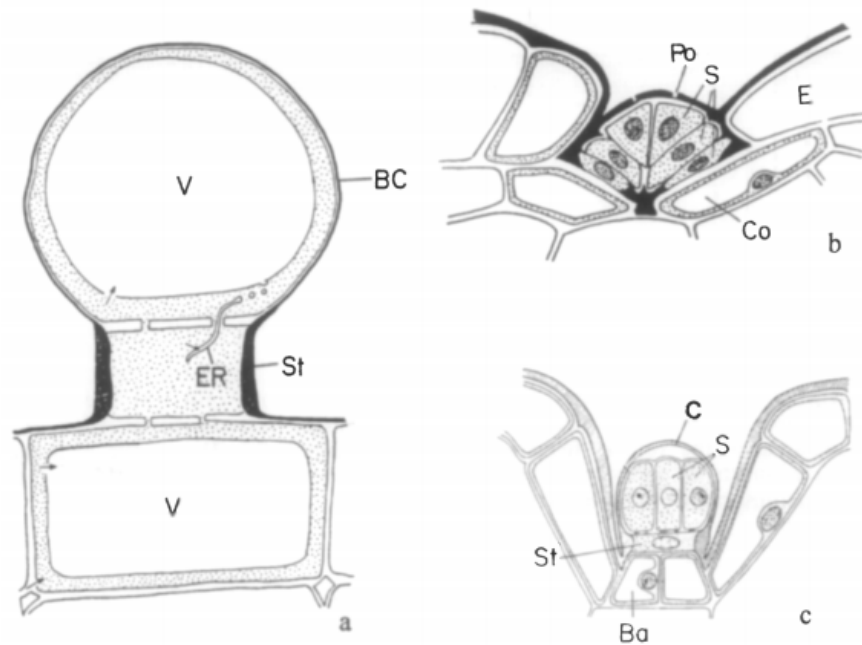


Figure 1.8 : Glandes sécrétrices de sel

a. Trichome d'*Atriplex*, b. *Tamarix aphylla*, c. *Avicennia marina*

(Ba : cellules basales, BC : cellules de réserves, C : cuticule, E : cellule épidermique, ER : Réticulum endoplasmique, Po : pore dans la cuticule, S : cellules sécrétrices, St : Stalk cells, V : vacuole, →transport membranaire)

(Fahn, 2000)

c. Adaptations métaboliques

c.1 Métabolisme photosynthétique

Il existe trois types de métabolisme photosynthétique chez les végétaux : C3, C4 et CAM (métabolisme acide crassulacéen). La majeure partie des plantes des régions tempérées possèdent un métabolisme en C3, le métabolisme CAM est présent chez les Crassulaceae et le métabolisme en C4 est caractéristique des plantes tropicales. La différence majeure entre les métabolismes C3 et C4 se situe au niveau de la molécule organique formée après fixation du CO₂, le 3-phosphoglycérate (3 atomes de carbone) pour le métabolisme en C3, l'oxaloacétate (4 atomes de carbone) pour le métabolisme en C4 (Mohr and Schopfer, 1995). Le métabolisme en C4, comme le métabolisme en CAM, permet de limiter l'évapotranspiration en fermant les stomates durant la journée par rapport à un métabolisme en C3, c'est-à-dire que

ce métabolisme consomme moins d'eau, ce qui confère aux plantes en C4 et CAM un avantage certain en cas de stress hydrique (Lüttge, 1993). De plus les plantes qui possèdent un métabolisme en C4 possèdent une adaptation morphologique appelée anatomie de Kranz, caractérisée par la présence d'une gaine périvasculaire très développée. Chez ces plantes, la photosynthèse est caractérisée par une répartition des réactions dans deux tissus différents que sont les cellules du mésophylle et celles de la gaine périvasculaire. (Figure 1.9).

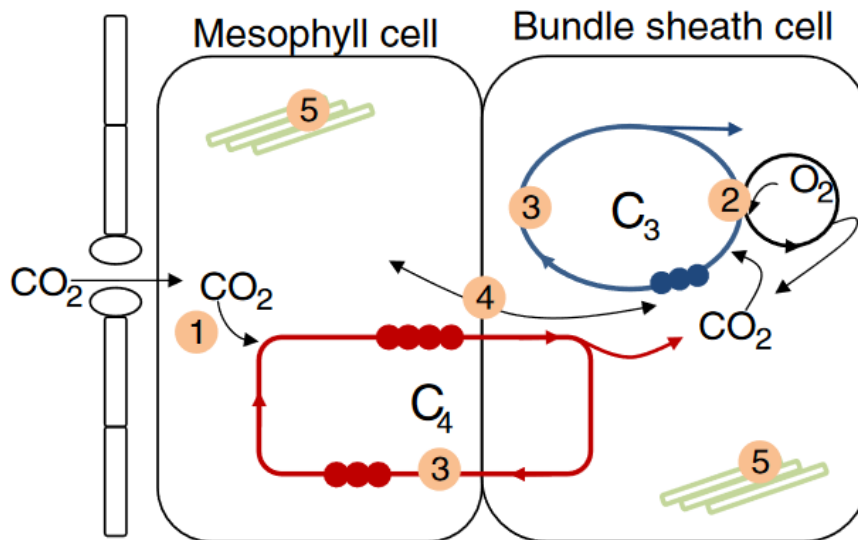


Figure 1.9 : Schéma de la photosynthèse en C4

1. Distribution du CO₂; 2. Fonctionnement de la RUBISCO ; 3. Régénération du substrat; 4. Echange de métabolite et CO₂/O₂; 5. Transport chloroplastique d'électrons

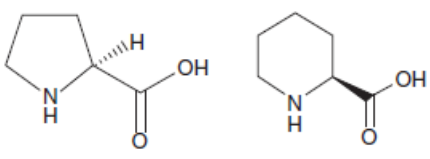
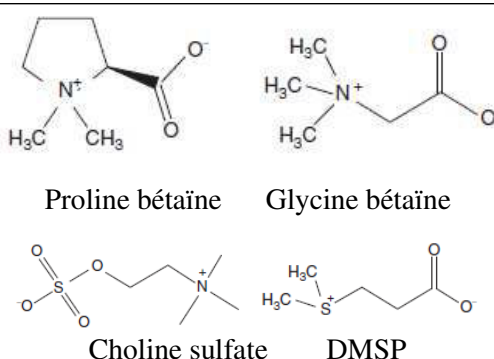
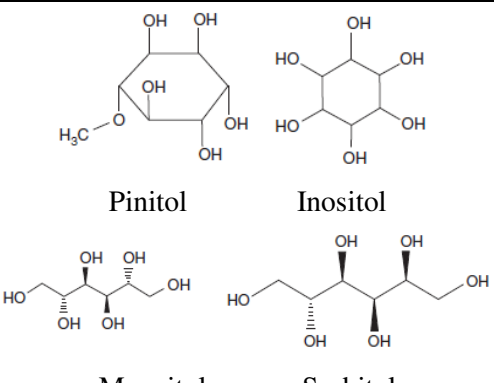
(von Caemmerer and Furbank, 2016)

c.2 Les osmolytes protecteurs (Slama et al., 2015)

Les osmolytes sont des solutés organiques de faible poids moléculaire, synthétisés en cas de stress osmotique. Ils sont non phytotoxiques, même à forte concentration. Leur rôle principal est de participer à l'ajustement osmotique pour contrecarrer le déséquilibre engendré par une teneur importante en ions Na⁺ et Cl⁻. Les osmolytes participent aussi à la stabilisation de la structure des macromolécules et des membranes, on parle alors de chaperons moléculaires. Par exemple la proline stabilise la lactate déshydrogénase et empêche l'agrégation des protéines. Les polyols peuvent remplacer l'eau dans l'établissement de liaisons hydrogène, c'est ainsi que le tréhalose stabilise très efficacement les membranes et les protéines en cas de sécheresse. Certains osmolytes sont également capables de piéger les radicaux libres. Par exemple, le mannitol et la proline peuvent piéger les radicaux hydroxyles. Ils permettent donc

d'éviter les dégâts causés par le stress oxydant. Il existe de nombreux osmolytes, regroupés selon leur structure chimique (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Les principaux osmolytes retrouvés dans les halophytes

Classe d'osmolytes	Molécules	Exemples de structure
Acides aminés	Proline, alanine, arginine, glycine, glutamine, asparagine Acide c-aminobutyrique, acide pipecolique, citrulline et ornithine	 Proline Ac. pipécolique
Ammoniums quaternaires & Sulfoniums tertiaires	Glycine bêtaïne, β -alanine bêtaïne, proline bêtaïne, choline-O-sulphate, hydroxyproline bêtaïne et pipecolate bêtaïne Dimethylsulphoniopropionate (DMSP)	 Proline bêtaïne Glycine bêtaïne Choline sulfate DMSP
Sucres et polyols	Saccharose, tréhalose Mannitol, pinitol, sorbitol, Inositol	 Pinitol Inositol Mannitol Sorbitol

Il existe des osmolytes dont le catabolisme est rapide comme la proline, d'autres comme les bêtaïnes sont accumulés pour des durées plus importantes. Comme dans le cas des métabolites secondaires, la saison, l'organe considéré et les paramètres environnementaux impactent aussi la teneur en osmolytes. Ils ne sont pas synthétisés qu'en cas de stress salin, mais aussi en cas de sécheresse, ou de températures excessives. Il y a aussi des spécificités selon les familles. Par exemple, chez les Plumbaginaceae, les osmolytes les plus abondants sont la β -alanine-bêtaïne et le choline-O-sulphate, alors que chez les Brassicaceae il s'agit de la proline et du saccharose.

Nous ne nous sommes pas intéressés à ces molécules dans le cadre de ce travail de thèse que nous avons choisi d'axer sur les métabolites secondaires. Néanmoins, les osmolytes peuvent présenter un intérêt certain. Ils peuvent par exemple être valorisés dans le domaine pharmaceutique pour traiter des pathologies causées par des problèmes de conformation protéique. Le tréhalose est aussi utilisé pour la stabilisation de vaccins et de liposomes, la conservation d'organes humains au froid. De plus, son utilisation dans le traitement des sécheresses cutanées et oculaires met en évidence un potentiel hydratant intéressant en dermo-cosmétique (Taieb et al., 2012). Les halophytes, par leur richesse en osmolytes aux propriétés hydratantes, constituent donc une source potentielle pour le développement de nouveaux actifs dermo-cosmétiques.

c.3 Les antioxydants

Le stress salin limite les échanges gazeux, agissant ainsi sur la photosynthèse. Il affecte la chaîne de transport des électrons, ce qui conduit à une production importante de ROS (espèces réactives de l'oxygène) (Figure 1.10).

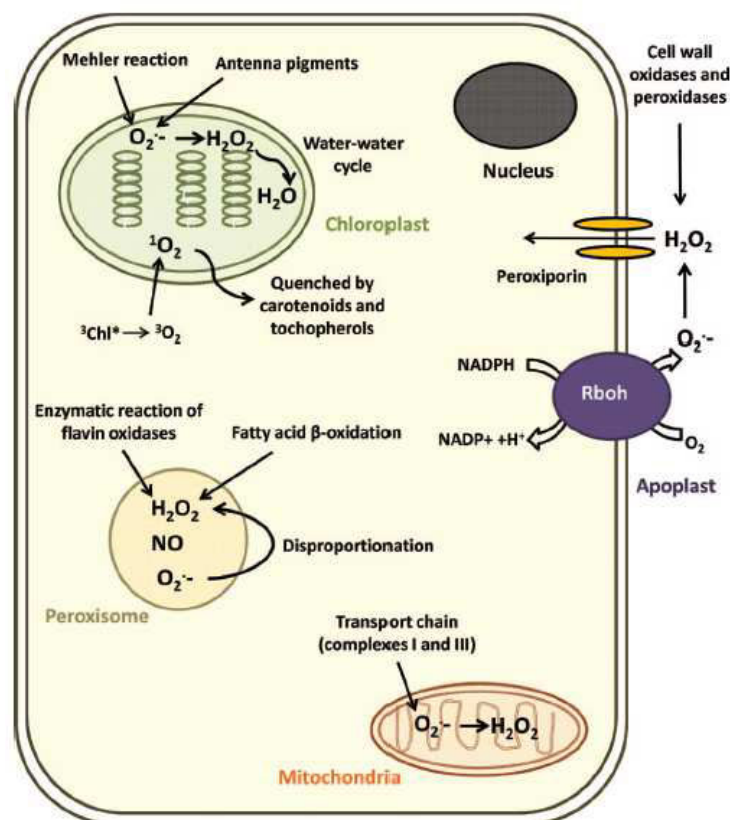


Figure 1.10 : Les principaux sites de production des ROS dans une cellule végétale et les moyens de contrôle de ces ROS

(Bose et al., 2014)

Les ROS ont un effet délétère sur le métabolisme, puisqu'ils conduisent à l'oxydation des protéines, des lipides membranaires ou encore des acides nucléiques. Les plantes possèdent deux types de systèmes antioxydants : enzymatique et non-enzymatique (Bose et al., 2014). Le système non-enzymatique met en jeu des métabolites primaires et secondaires, hydrophiles ou lipophiles. On peut par exemple citer l'acide ascorbique, le glutathion réduit, les tocophérols, les caroténoïdes, les polyphénols. Le système enzymatique fait appel à plusieurs enzymes de détoxification que sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la guaiacol peroxydase (GP), l'ascorbate peroxydase (APX), et d'autres enzymes du cycle ascorbate-glutathion. La corrélation entre la résistance au stress salin des halophytes et des systèmes antioxydants importants a été démontrée pour de nombreuses espèces dont *Crithmum maritimum* (Hamed et al., 2007), *Cakile maritima* (Amor et al., 2006; Ksouri et al., 2007), *Atriplex halimus* (Bouchenak et al., 2012), *Suaeda maritima* (Alhdad et al., 2013), *Limonium bicolor* (Wang et al., 2016b), *Suaeda salsa* (Qiu-Fang et al., 2005), *Limonium delicatulum* (Souid et al., 2016)

Les halophytes constituent donc une source importante d'antioxydants naturels et plus particulièrement de polyphénols, qui sont des molécules qui possèdent de nombreuses activités biologiques (Carocho and Ferreira, 2013; Kumar and Pandey, 2013; Zillich et al., 2015). Par exemple *Aster tripolium* et *Typha domigensis* sont très riches en polyphénols, *Halopeplis amplexicaulis*, *Cladium mariscus*, *Frankenia pulverulenta* et *Salsola vermiculata* sont très riches en flavonoïdes. Certaines molécules issues d'halophytes pourraient donner lieu à des valorisations potentielles dans le secteur pharmaceutique, notamment dans le traitement des maladies métaboliques. Par exemple les tannins de *Tamarix indica* sont anti-diarrhéiques ; les phénols d'*Artemisia capillaries* diminuent la production des produits terminaux de glycation, ce qui peut présenter un intérêt dans la prévention ou le traitement du diabète; la quercétine-3-*O*-glucoside extraite de *Salicornia europaea* réduit la différenciation des adipocytes, pouvant ainsi être utilisée comme actif anti-obésité. Certaines molécules présentent aussi un intérêt pour l'inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses comme par exemple les phénols de *Salicornia europaea* et les furanocoumarines de *Glehnia littoralis*. Certains composés phénoliques présentent également des activités antimicrobiennes qui peuvent être intéressantes en dermo-cosmétique comme par exemple l'acide syringique et l'acide cinnamique issus de *Cynara cardunculus*. D'autres extraits d'halophytes présentent des intérêts en dermo-cosmétique comme par exemple les extraits de *Pistacia lentiscus* et *Aster*

tripolium qui inhibent la tyrosinase, constituant ainsi de potentiels actifs blanchissants (Buhmann and Papenbrock, 2013; Lopes et al., 2016).

d. Le microbiome (Ruppel et al., 2013)

Le microbiote d'une plante correspond à l'ensemble des micro-organismes qui lui sont associés, l'environnement dans lequel il vit est appelé **microbiome** (Marchesi and Ravel, 2015). Le microbiote peut stimuler la croissance ou la germination de la plante en influant sur son métabolisme hormonal, mais aussi l'aider à lutter contre les maladies et participer à la résistance aux stress. Les métabolismes de la plante et du microbiote sont très connectés, il s'agit donc d'un méta-organisme encore appelé holobionte.

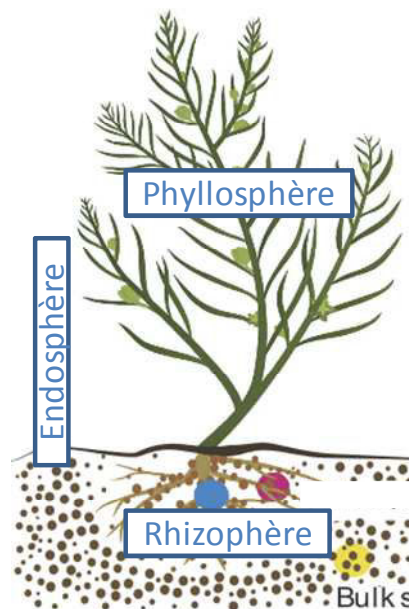


Figure 1.11 : Holobionte constitué d'une plante et de son microbiome

(adapté de Yuan et al., 2016)

Le microbiome peut être divisé en trois catégories selon la localisation des micro-organismes : la rhizosphère (parties souterraines), la phyllosphère (parties aériennes) et l'endosphère (dans les tissus végétaux) (Figure 1.11) (Berg et al., 2016). Lorsque les micro-organismes vivent dans les tissus végétaux, ils sont qualifiés d'endophytes et ils peuvent être impliqués dans la synthèse de molécules d'intérêt (Berg et al., 2016; Müller et al., 2016).

Parmi les résistances au stress conférées par le microbiote, on retrouve la tolérance au sel. Certaines bactéries et certains champignons sont capables de s'adapter à des pressions osmotiques importantes, comme par exemple les genres *Halobacteriaceae*, *Halomonas*, *Salinibacter* pour les bactéries ou le champignon *Hortaea werneckii*. Pour ce faire, les

micro-organismes sont dotés de membranes spécifiques (comme les archées et les cyanobactéries), ils rejettent également les ions dans le milieu extérieur et possèdent des osmolytes comme les plantes. La rhizosphère des halophytes est assez peu étudiée, et la phyllosphère encore moins. Des exemples de micro-organismes retrouvés dans le microbiome des halophytes sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1.2 : Exemples de micro-organismes retrouvés dans le microbiome des halophytes
(d'après Mora-Ruiz et al., 2015; Ruppel et al., 2013; Syranidou et al., 2017)

	Exemples de taxons	Végétaux associés
Bactéries halophiles	<i>Halococcus</i>	<i>Halocenum strobilaceum</i>
	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i>	<i>Halocenum strobilaceum</i> <i>Salicornia brachiata</i>
Bactéries halo-tolérantes (jusqu'à 4 M de NaCl)	<i>Halomonas sinaensis</i>	<i>Halocenum strobilaceum</i> <i>Salicornia brachiata</i>
	<i>Desulfovibrio sp.</i>	<i>Halocenum strobilaceum</i>
Mycètes	<i>Glomeromycota</i>	<i>Atriplex spp.</i> Rhizosphère des mangroves
Endophytes	<i>Chromohalobacter canadensis</i> <i>Proteobacteria</i> <i>Firmicutes</i> <i>Actinobacteria</i>	<i>Salicornioideae</i>
	<i>Aeromonas</i> <i>Yonghaparkia</i> <i>Hyphomicrobium</i> <i>Nocardioides</i> <i>Spingomonas</i>	<i>Juncus acutus</i>

La plante excrète dans le sol des sucres, des acides aminés et autres métabolites secondaires qui attirent les bactéries. Ainsi les plantes influent sur la composition en micro-organismes de la rhizosphère. Les bactéries présentes dans le microbiome des halophytes produisent des exopolysaccharides qui forment une gaine autour des racines favorisant le développement de bactéries fixatrices d'azote et créent une barrière protectrice, le biofilm. D'autres bactéries favorisent la solubilisation du phosphate, servant ainsi de fertilisant naturel. Ainsi les micro-organismes permettent aux halophytes de prélever des nutriments (azote et phosphate) alors que le prélèvement des minéraux est réduit en cas de stress salin. De plus, il déjà été démontré

que les plantes qui possèdent des mycorhizes sont plus riches en phosphore et régulent mieux l'équilibre K^+/Na^+ . Le microbiote des halophytes impacte également le métabolisme hormonal. Par exemple, les bactéries halotolérantes résidentes chez les halophytes possèdent un acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) désaminase qui convertit le précurseur de l'éthylène en α -cétobutyrate, diminuant ainsi la concentration en éthylène, qui inhibe habituellement la croissance de la plante. La présence d'ACC désaminase est un mécanisme important pour la tolérance au sel. Par ailleurs, les endophytes participent à la production de l'acide indole-3-acétique (AIA) qui est une auxine antagoniste de l'éthylène. Ainsi le microbiote contribue à la nutrition et à la croissance des halophytes en dépit d'une salinité élevée. Il est aussi capable de lutter contre le stress oxydant et de produire des antibiotiques.

C. Conclusion sur les plantes du littoral

Les plantes du littoral, qui sont considérées comme des **halophytes**, possèdent un métabolisme particulier pouvant être une source potentielle de **molécules bioactives**, comme les **osmolytes** ou les **antioxydants**, aux propriétés intéressantes dans les secteurs **pharmaceutique et cosmétique** (Buhmann and Papenbrock, 2013). A noter également que deux nouvelles voies de valorisation des halophytes se développent. La première consiste en l'agriculture des plantes halophiles pour pallier la salinisation des terres cultivables (Khan and Duke, 2001; Ladeiro, 2012; Rozema and Schat, 2013). La seconde concerne la capacité des halophytes à stocker les métaux lourds, en faisant des plantes de choix pour la phytoremédiation (Sruthi et al., 2016; Van Oosten and Maggio, 2015). Ainsi l'étude de ces plantes présente un très **grand intérêt scientifique et économique**.

II. Les cibles biologiques dermo-cosmétiques

Comme enveloppe vivante de notre corps, la peau exprime toutes les tensions qui s'exercent sur l'individu : joie, tristesse, stress, peur. Tout ce que l'être éprouve transparait à travers les réactions, les émotions de la peau. Ultime rempart par lequel le "soi" apparaît aux autres comme à soi-même à travers l'image que réfléchit le miroir, le "moi-peau" est un élément physique, sensible qui relie l'homme à la nature, aux êtres vivants et le soumet aux forces des éléments. C'est un instrument pour exercer une forme de pouvoir sur les autres, retenir leur intérêt, modifier leurs impressions, leur jugement, les séduire. Mais l'exigence première, qui conditionne tout le reste, est la relation à soi-même, vécue à travers la peau. L'acceptation de sa propre identité passe par la perception que l'individu a de son propre corps. Cette relation positive au corps, véritable pulsion de vie, détermine la relation aux autres (L'Oréal - Skin Science).

A. La peau

La peau, aussi appelée tégument, pèse 3 kg, mesure 1,8 m² chez un adulte de 70 kg. En plus d'être une enveloppe, la peau est un véritable organe possédant des fonctions de protection, thermorégulation, sensorialité, d'échanges et métaboliques.

Cette partie a été rédigée en s'appuyant sur deux ouvrages de référence : Martini, 2016; Méliopoulos and Levacher, 2012 et sur le site www.skin-science.fr

1. Structure de la peau

La peau est constituée de trois tissus superposés que sont, de l'extérieur vers l'intérieur, l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1.12).

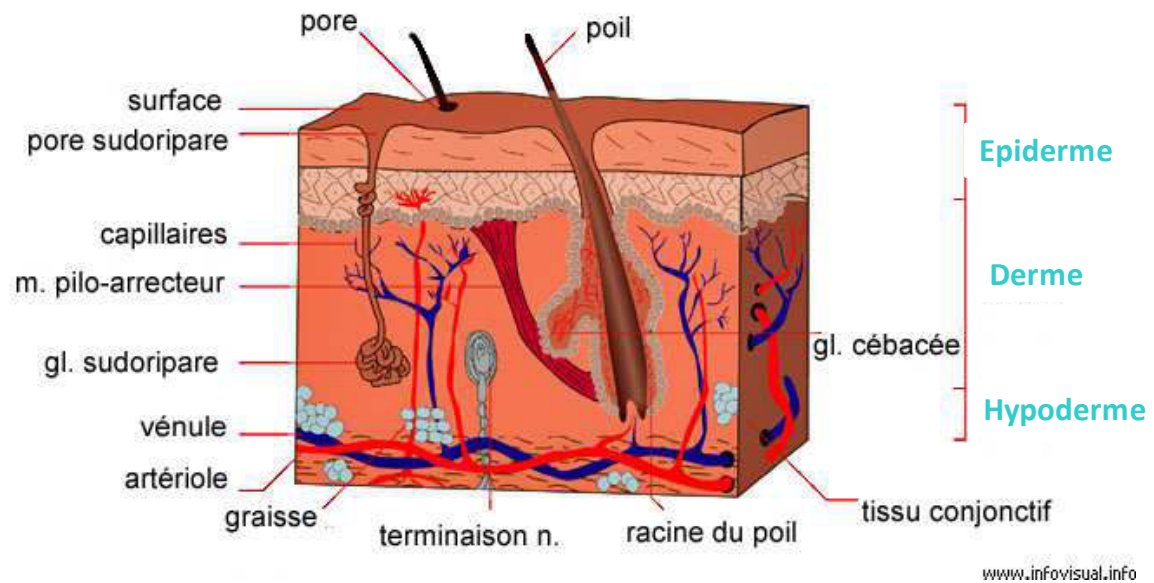


Figure 1.12 : Schéma de la structure de la peau

a. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium de recouvrement. Il est stratifié, car constitué de plusieurs assises cellulaires, pavimenteux, car les cellules de sa couche superficielle sont plates, et kératinisé, car il synthétise de la kératine.

L'épiderme est constitué de 4 couches distinctes, de l'extérieur vers l'intérieur, le *stratum corneum* ou couche cornée composée de cornéocytes, le *stratum granulosum* ou couche granuleuse, le *stratum spinosum* ou couche spinieuse (couche du corps muqueux de Malpighi) et la couche basale ou germinative (Figure 1.13).

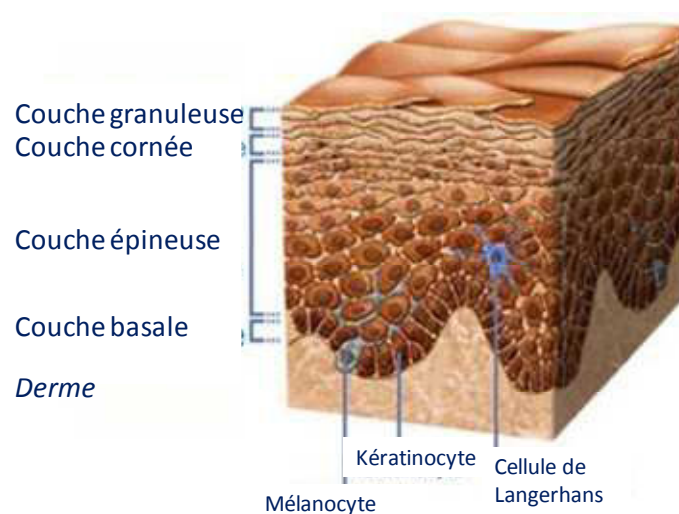


Figure 1.13 : Coupe transversale de l'épiderme humain

www.stopvieillesse.e-monsite.com

4 types de cellules constituent l'épiderme (Figure 1.14).

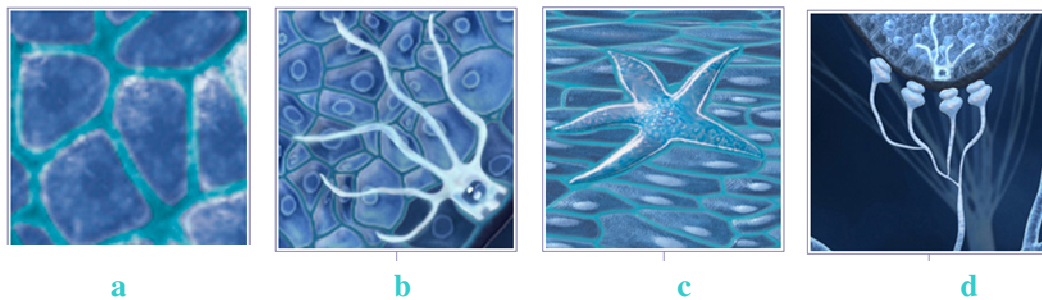


Figure 1.14 : Les différents types de cellules épidermiques

a- Kératinocytes, b- Mélanocytes, c- Cellules de Langerhans, d- Cellules de Merkel

(www.vichy.com)

80% des cellules sont des kératinocytes (du grec *keras* : corne) qui sont des cellules capables de produire de la kératine, protéine fibreuse non soluble dans l'eau. C'est cette dernière qui rend la peau semi-perméable à l'eau. Les kératinocytes naissent dans la couche basale de l'épiderme puis migrent vers la surface, c'est au cours de cette migration que se produit le phénomène de kératinisation.

Les mélanocytes, qui représentent environ 13% de l'épiderme, sont des cellules dendritiques particulières, elles sont capables de produire de la mélanine synthétisée dans des organites appelés mélanosomes. La mélanine est un pigment qui protège la peau des rayons UV, diminuant ainsi les dommages qu'ils causent à l'ADN. Ce pigment est également responsable de la coloration de la peau.

L'épiderme est également constitué de cellules de Langerhans (2 à 3%) qui assurent une fonction immunologique.

Les cellules de Merkel sont le dernier type cellulaire de l'épiderme. Elles sont d'origine nerveuse et portent des récepteurs sensitifs.

b. Le derme

Le derme est un tissu conjonctif, fibreux, élastique et très dense. Il est beaucoup plus épais que l'épiderme (Figure 1.12). Ces deux couches sont reliées par la jonction dermo-épidermique. Le derme est subdivisé en deux, le derme papillaire vers l'extérieur (~20%) et le

derme réticulaire, plus profond (~80%). Le derme assure le maintien des propriétés mécaniques de la peau et constitue notamment un réservoir hydrique.

b.1 Les types cellulaires

Comme dans le cas de l'épiderme, on retrouve différents types cellulaires dans ce tissu (Figure 1.15), parmi lesquels les leucocytes, les cellules dendritiques dermiques, les mastocytes et les macrophages. Néanmoins, les principales cellules du derme sont les fibroblastes.

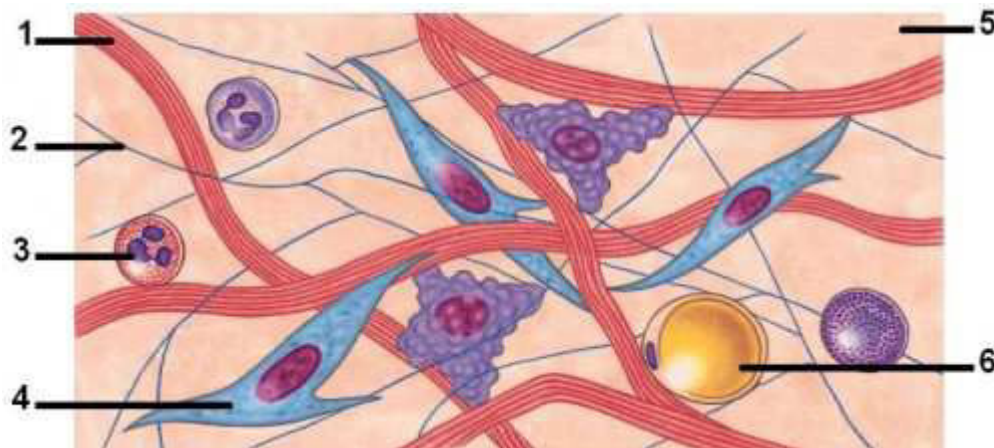


Figure 1.15 : Représentation schématique du derme et de ses principaux constituants

1 : fibre de collagène 2 : fibre d'élastine 3 : lymphocyte 4 : fibroblaste 5 : substance fondamentale 6 : adipocyte

www.esthetique-cosmetique.skynetblogs.be

Les fibroblastes ont pour fonction principale la synthèse du collagène, de l'élastine, de la substance fondamentale (ensemble de protéines sur lesquelles se fixent des sels minéraux) et des glycoprotéines de structure. C'est aussi eux qui sont capables de dégrader la matrice extracellulaire (composée notamment du collagène, de l'élastine et de la substance fondamentale) *via* la sécrétion de protéinases appelées MMP (Matrix Metalloproteinases). Malgré la présence de cellules dédiées à l'immunité dans le derme, les fibroblastes synthétisent aussi des cytokines participant à la défense antivirale et anti-infectieuse. La prolifération et le métabolisme des fibroblastes sont régulés essentiellement par des facteurs de croissance (FGF, facteur de croissance fibroblastique).

b.2 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est constituée essentiellement de substance fondamentale, de composants fibreux (collagène et élastine) et de glycoprotéines de structure. Elle constitue aussi un réservoir de facteurs de croissance et de cytokines, appelées matrikines.

La substance fondamentale est composée d'acide hyaluronique et d'autres glycosaminoglycanes, constituant l'ensemble des protéoglycanes. Ce sont des protéines liées à des glycosamines qui constituent un gel souple avec une turgescence importante, permettant une résistance aux forces de compression. L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane (hétéropolysaccharide) non sulphaté très abondant. Il joue un rôle très important dans la capture et la rétention de l'eau. D'autres glycosaminoglycanes comme le chondroïtine-sulfate, l'héparine ou encore le kératane sulfate servent à la biosynthèse des protéoglycanes.

Le collagène est la protéine la plus abondante de notre corps, de nature fibreuse, très riche en proline, hydroxyproline et glycine, elle a pour rôle principal de conférer une résistance mécanique à l'étirement. Elle confère à la peau sa résistance et sa tonicité (Figure 1.16 et 1.17). Le collagène constitue 70% du derme. Il existe différents types de collagène, numérotés de I à XIX en fonction de leurs propriétés (séquence peptidique, propriétés morphologiques et physiques) et de leur localisation. Les plus courants dans le derme sont les types I (60 à 80 %) et III (15 à 25%). Ils sont synthétisés par les fibroblastes puis excrétés dans le milieu extracellulaire sous forme de pro-collagènes, où ils seront clivés pour donner les molécules de collagène. Ces dernières ont une structure hélicoïdale rigide, triple hélice ou encore superhélice, constituée par 3 brins en hélice α (structure secondaire des protéines). Les superhélices s'associent via des liaisons covalentes pour donner des fibrilles de collagène, qui à leur tour s'associeront pour donner des fibres de collagène. (Figure 1.16)

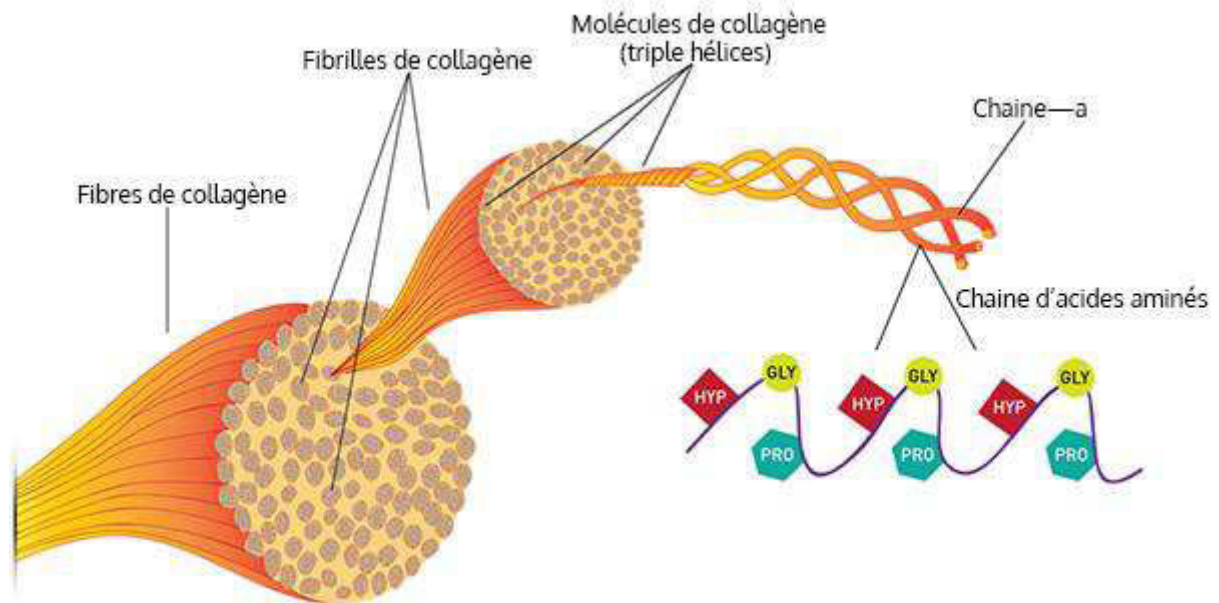


Figure 1.16 : Schéma d'une fibre, fibrille et molécule de collagène

(www.weightworld.fr)

L'élastine est une protéine qui confère à la peau son élasticité. Elle est structurée en fibres et en lames discontinues pour former les fibres élastiques de la peau (Figure 1.17). Comme le collagène, l'élastine est riche en glycine et proline et est synthétisée par les fibroblastes sous forme de précurseur. Ce précurseur est appelé tropoélastine, il permet la synthèse de l'élastine par polymérisation en présence d'une glycoprotéine appelée fibrilline.

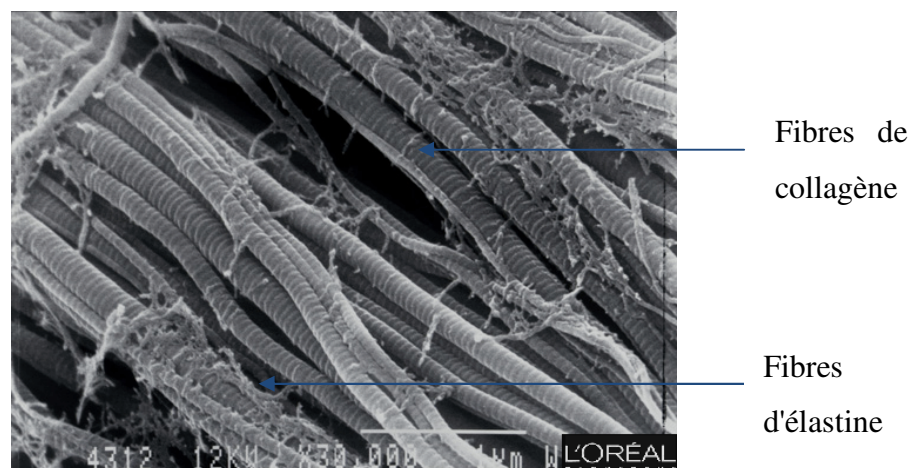


Figure 1.17 : Fibres de collagène et d'élastine observées au microscope électronique à balayage (x30000)

c. L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu conjonctif lâche qui possède une structure similaire à celle du derme, exceptée la présence d'élastine et de collagène. L'hypoderme possède en plus des adipocytes, qui sont des cellules sphériques avec une vacuole permettant de stocker les triglycérides. Ils entrent dans la composition du tissu adipeux blanc sous-cutané. Ce tissu renferme également des cellules progénitrices (cellules souches du tissu adipeux), des préadipocytes (adipocytes pré-matures), des cellules endothéliales (rôle dans la néovascularisation), des fibroblastes (qui sécrètent des protéines semblables à celles du derme), des lymphocytes et des macrophages (impliqués dans l'inflammation). L'hypoderme joue un rôle de réservoir énergétique. En effet, il est capable de stocker les lipides sous forme de triglycérides, mais aussi de les relarguer sous forme d'acides gras et de glycérol.

d. La vascularisation cutanée

Le derme et l'hypoderme sont vascularisés comme les autres organes du corps *via* un système artères/artérioles/capillaires qui apporte le sang chargé en oxygène aux cellules cutanées et capillaires/veinules/veines qui transportent le sang chargé en dioxyde de carbone (Figure 1.18). L'épiderme lui, n'est pas vascularisé mais il est nourri par le système papillaire du derme qui correspond à la surface en papilles qui forment des saillies alternant avec des prolongements épidermiques.

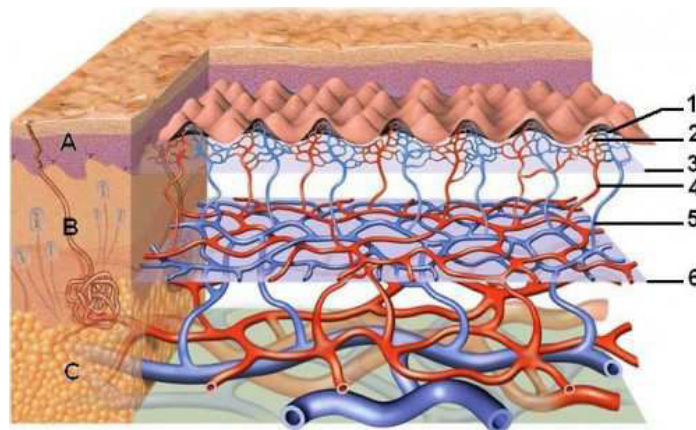


Figure 1.18 : La vascularisation cutanée

A : épiderme - B : derme - C : hypoderme - 1 : veinule - 2 : artériole - 3 : plexus sous-papillaire 4 : artère dermique - 5 : veine dermique 6 : plexus sous-dermique

<http://esthetique-cosmetique.skynetblogs.be>

Le système lymphatique est également présent et joue un rôle très important dans l'élimination des molécules de haut poids moléculaire, ne pouvant pas être éliminées par le système veineux.

e. L'innervation cutanée

La peau est innervée. Il s'agit d'un organe sensoriel, impliqué dans la perception de très nombreuses sensations telles que le chaud, le froid, la douleur, le toucher *via* des récepteurs de types mécaniques, thermiques ou nociceptifs. La peau est également dotée de fibres motrices qui appartiennent au système nerveux autonome ou végétatif. Elles innervent les glandes sudoripares, les muscles pilomoteurs, et permettent la vasomotricité. La structure de l'innervation cutanée est présentée sur la figure 1.19.

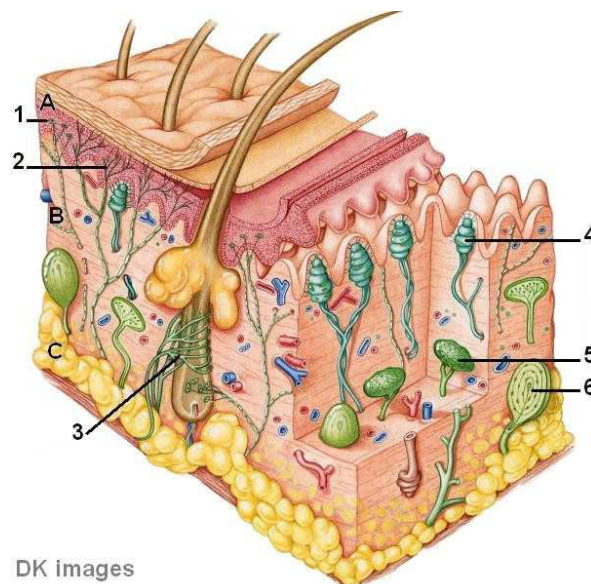


Figure 1.19 : L'innervation cutanée

A : épiderme - B : derme - C : hypoderme 1 : disque de Merckel - 2 : terminaison nerveuse libre 3 : collier tactile - 4 : corpuscule de Meissner 5 : corpuscule de Ruffini - 6 : corpuscule de Vater-Pacini

f. Les annexes cutanées

Les annexes cutanées sont constituées des glandes sudoripares, des glandes sébacées et des follicules pileux (Figure 1.12). Il existe deux types de glandes sudoripares : les eccrines, qui sont de petite taille et réparties sur l'ensemble du corps, et les apocrines, de taille plus importante et localisées uniquement dans certaines zones du corps comme les aisselles. Les glandes eccrines excrètent de l'eau et des minéraux, et leur glomérule (partie enroulée sur elle-

même de la glande) est situé dans le derme ou le tissu sous-cutané. Les glandes apocrines sécrètent des protéines et des lipides en plus de l'eau et des minéraux, et elles débouchent sur le follicule pileux. Les glandes sébacées quant à elles sont des glandes sécrétrices de sébum, lequel est une substance essentiellement composée de lipides, qui constitue une couche protectrice à la surface de l'épiderme. Le follicule pileux est à l'origine des poils et des cheveux. Chez les animaux, les poils ont une fonction protectrice et tactile, qui a été quelque peu perdue chez l'Homme. Les ongles font aussi parties des annexes cutanées.

2. Fonctions et propriétés de la peau

a. Propriétés mécaniques

La peau possède deux propriétés importantes et complémentaires que sont la souplesse et la fermeté, qui lui confèrent une résistance mécanique. L'épiderme, qui est le plus soumis à des stimuli, est à la fois résistant et extensible, grâce notamment à la kératine. Le derme est lui aussi résistant et extensible, mais plus élastique. Les fibres de collagène confèrent la résistance aux tensions et aux tractions. L'élasticité est assurée par les fibres élastiques constituées d'élastine. L'hypoderme joue quant à lui un rôle d'amortisseur en absorbant l'énergie mécanique.

b. Barrière cutanée

La peau empêche la pénétration de substances toxiques et l'évaporation des fluides corporels notamment grâce au sébum qui constitue un film hydrolipidique. Le derme est hydrophile, mais la couche cornée est responsable de l'imperméabilité de la peau car la kératine est hydrophobe. La richesse en kératine de la couche cornée lui permet aussi de résister aux agressions chimiques. En plus de cette imperméabilité, la peau possède un pH compris entre 4 et 5,5 et produit des molécules antimicrobiennes (dans le sébum et la sueur). Ainsi, la peau est une barrière pour les micro-organismes. A noter cependant qu'il existe une flore résidente appelée microbiote cutané, qui est d'ailleurs de plus en plus étudiée (Baldwin et al., 2017; Brüggemann, 2016; Seité et al., 2017). La peau n'est pas une barrière infranchissable : des agents extérieurs peuvent pénétrer soit par les annexes cutanées soit par voie trans-épidermique, ou alors être absorbés de façon passive.

c. Thermorégulation

L'homme est un homéotherme, comme tous les mammifères, c'est-à-dire qu'il maintient sa température corporelle de façon constante à 37°C, indépendamment de l'environnement dans lequel il se trouve. L'augmentation du métabolisme cellulaire et les frissons (contraction des muscles des poils) favorisent la production de chaleur appelée thermogénèse. La vasoconstriction permet aussi de lutter contre le froid. A contrario, pour lutter contre la chaleur, le corps augmente l'évapotranspiration.

B. Choix des cibles biologiques

La peau est en permanence soumise à des stress endogènes et exogènes. Ainsi il lui faut sans cesse s'adapter, se protéger, se réparer. Les actifs dermo-cosmétiques sont développés dans le but d'aider la peau dans ces processus. Parmi eux, on retrouve par exemple des actifs hydratants, cicatrisants ou encore apaisants. Mais il existe également des actifs dermo-cosmétiques dont le rôle principal est plutôt esthétique, comme dans le cas des actifs anti-âge. Les soins dermo-cosmétiques sont formulés pour préserver la santé et la beauté de la peau et des cheveux.

1. Le vieillissement cutané

Le vieillissement cutané est le fruit de processus génétiques et épigénétiques. L'environnement peut également jouer un rôle direct, notamment *via* le stress oxydant. Ceci signifie que le génome et l'environnement régulent ensemble le vieillissement. Ce processus physiologique est tout à fait normal, mais il peut être accéléré par une mauvaise hygiène de vie ou une exposition trop importante aux UV et à la pollution, et ralenti par l'utilisation d'actifs dermo-cosmétiques. Il se caractérise par une diminution de la prolifération cutanée, une dégradation de la machinerie cellulaire, une altération des systèmes de protection/réparation de l'ADN et une diminution de la production hormonale. Les facteurs extrinsèques qui accélèrent le vieillissement sont majoritairement les rayonnements UV qui induisent la sénescence cutanée actinique encore appelée photo-vieillescence, mais aussi le

tabac, l'alcool, le stress, la malnutrition ou encore la pollution. Selon qu'il soit d'origine intrinsèque ou extrinsèque, le vieillissement ne se manifeste pas de la même manière (Tableau 1.3), mais dans les deux cas, il y a une fragilisation globale de la peau, avec une répercussion esthétique.

Tableau 1.3 : Comparaison entre le vieillissement intrinsèque et le photo-vieillissement cutané

	Vieillissement intrinsèque (Physiologique)	Photo-vieillissement
Surface cutanée	Lisse	Surface rugueuse, taches cutanées, jaunissement
Epiderme	Amincissement Renouvellement cellulaire ralenti	Epaississement (acanthose), atypies cellulaires (kératoses)
Derme papillaire	Pas d'élastose (altération du tissu élastique) Diminution du tissu élastique	Elastose solaire Hyperplasie (augmentation du volume et ou du nombre) anarchique des fibres élastiques
Derme réticulaire	Fibroblastes avec activité diminuée, mastocytes normaux, aucune inflammation	Fibroblastes hyperactifs (synthèse de collagène III et fibronectine) Prolifération des mastocytes, infiltrat inflammatoire mixte
Collagène	Fibres plus fines et moins nombreuses mais faisceaux épais et désorientés	Destruction des faisceaux et des fibres
Microvascularisation	Diminution Epaississement de la paroi vasculaire	Dilatation des vaisseaux (télangiectasie) Epaississement de la paroi vasculaire

Les signes du vieillissement deviennent visibles dès l'âge de 25 ans. Le teint devient terne et brouillé, la peau est davantage déshydratée, la peau est plus relâchée, moins souple, moins élastique, moins tonique; les rides et les défauts pigmentaires apparaissent (Pensé-Lhéritier, 2016).

Dans nos travaux, nous nous sommes intéressés à deux cibles biologiques importantes liées au vieillissement cutané en cherchant des actifs qui diminuent le stress oxydant et l'activité des MMP.

a. Stress oxydant

Les ions superoxyde et hydroxyle, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène sont les principales espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ce sont des radicaux libres qui sont des espèces chimiques qui possèdent un électron non apparié, ce qui les rend particulièrement réactives et instables (Figure 1.20).

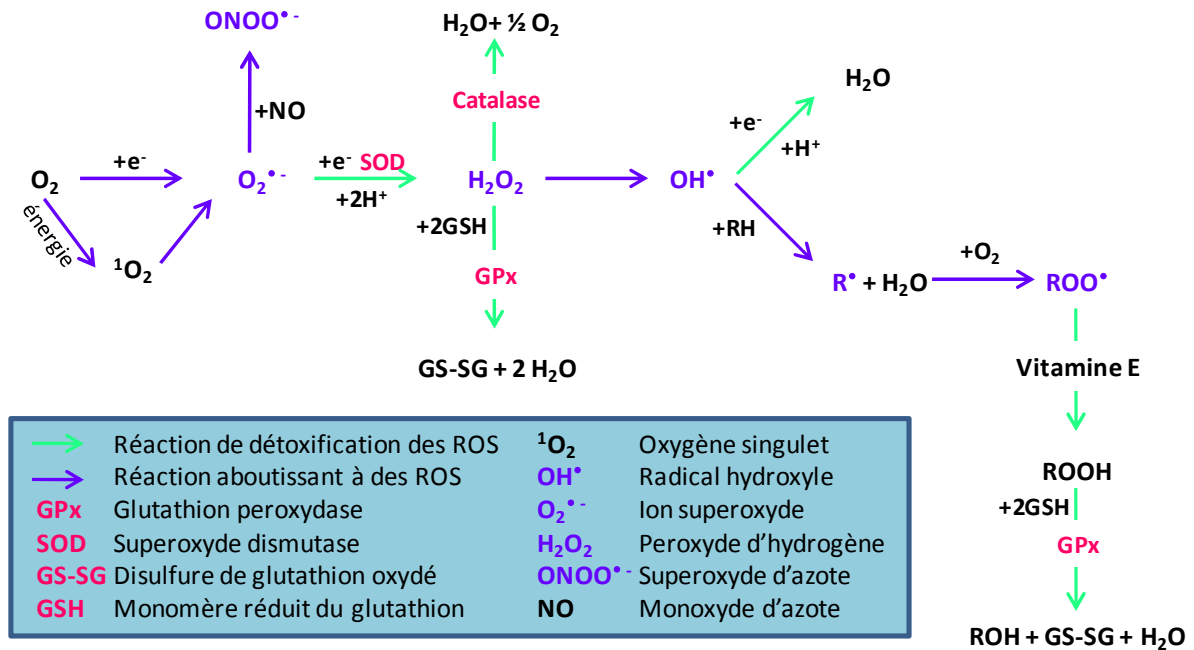


Figure 1.20 : Formation des ROS et systèmes de détoxification

(adapté de : Méliopoulos and Levacher, 2012)

Les ROS sont naturellement produites lors de la respiration mitochondriale et jouent un rôle dans le maintien de l'équilibre rédox (Schieber and Chandel, 2014). Cependant, lors de certains stress, tels que l'exposition aux UV ou encore au tabac, cette production est accrue. Ces radicaux libres en excès sont alors largement dommageables, de façon indirecte, notamment pour la peau (Figure 1.21). Les radicaux libres induisent par exemple la voie des MAPK (Protéines kinases nécessaires à l'activation de la mitose) qui induit à son tour la transcription des gènes codant pour les MMP (métalloprotéinases matricielles), diminue la synthèse de pro-collagène et favorise la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines vont avoir un rétrocontrôle positif sur ce système en activant les MMP et la production de ROS (Kammeyer and Luiten, 2015).

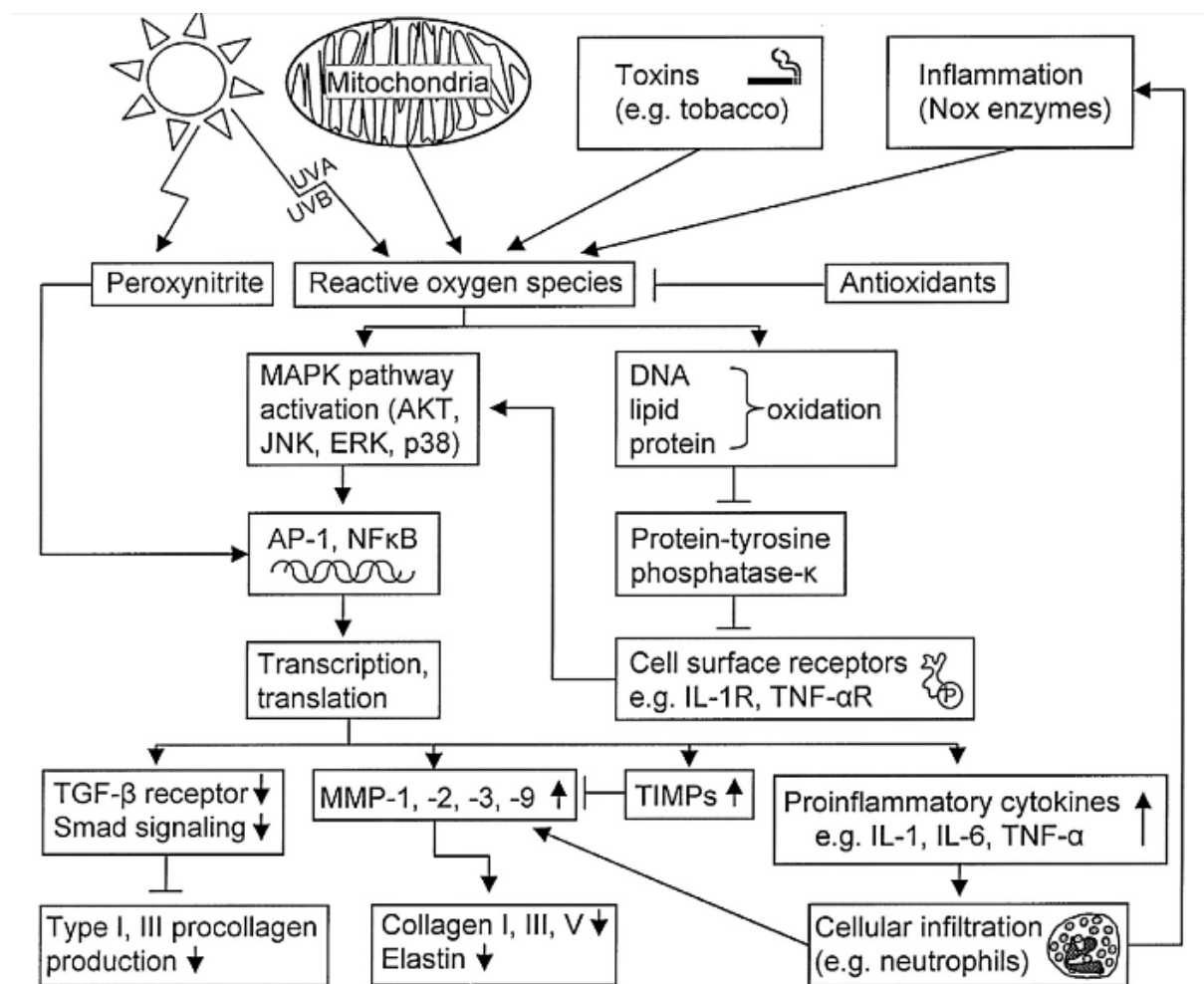


Figure 1.21 : Schéma de l'influence des ROS sur le vieillissement cutané.

(Sárdy, 2009)

Pour lutter contre cette oxydation néfaste, les cellules possèdent un arsenal antioxydant. Il existe un système antioxydant enzymatique constitué notamment de la superoxyde dismutase, la catalase et des peroxydases. Puis les vitamines (E, C, K, A) et le glutathion réduit jouent également un rôle antioxydant. Mais d'autres molécules exogènes peuvent jouer le rôle d'antioxydant comme les caroténoïdes qui neutralisent l'oxygène singulet. Les polyphénols sont également connus pour posséder un rôle antioxydant. Par exemple, l'administration *per os* d'épigallocatechine gallate diminue la sensibilité aux UV et améliore la fonction barrière de la peau (Jeon et al., 2009), cette molécule réduit également l'induction des MMP par les UV en agissant sur la voie des MAPK (Bae et al., 2008).

Les industries cosmétiques souhaitent développer des actifs de plus en plus respectueux de l'environnement; c'est pourquoi elles cherchent continuellement de nouveaux ingrédients antioxydants d'origine naturelle, pour remplacer les antioxydants d'origine synthétique

comme le BHT (hydroxytoluène butylé) ou le BHA (hydroxyanisole butylé), qui sont de potentiels perturbateurs endocriniens (L'observatoire des Cosmétiques). De plus, les antioxydants d'origine naturelle peuvent posséder des spectres d'actions plus larges.

b. Les métalloprotéinases matricielles

Les MMP sont des enzymes qui possèdent un ion métallique dans leur site actif (calcium ou zinc) : il s'agit de protéinases capables de dégrader les protéines de la matrice comme le collagène et l'élastine mais aussi des glycoprotéines. Il existe 28 classes de MMP, numérotées de MMP 1 à 28 selon leur substrat (Mukherjee et al., 2013). En conditions normales, il y a un équilibre entre la synthèse et la dégradation de la matrice. Lors du vieillissement, la dégradation devient excessive et engendre une perte de souplesse, d'hydratation et de fermeté de la peau, ce qui conduit aussi à l'apparition de rides (Wiegand et al., 2017). Lors du vieillissement, qu'il soit physiologique ou photo-induit, la production et l'activité des MMP augmentent (Figure 1.21) (Amano, 2017; Kammeyer and Luiten, 2015).

De nombreuses molécules naturelles ont montré une capacité à inhiber l'activité et/ou la synthèse de MMP. Par exemple, les procyanidines de *Vaccinium macrocarpon* inhibent la production de MMP1. Il en est de même pour la quercétine, l'apigénine et le kaempférol (Mukherjee et al., 2013). Des extraits de *Camellia sinensis* et de *Fucus vesiculosus* inhibent l'activité de la collagénase et de l'élastase (Thring et al., 2009).

Les MMP constituent donc une cible dermo-cosmétique importante pour lutter contre les causes du vieillissement cutané.

2. L'inflammation

a. Généralités et étapes de l'inflammation

L'immunité est l'ensemble des mécanismes réactionnels de défense par lesquels l'organisme reconnaît, détruit et élimine toutes les substances qui lui sont étrangères. D'un point de vue clinique, la réaction inflammatoire cutanée est caractérisée par plusieurs signes. Une rougeur et une chaleur surviennent, elles résultent d'une vasodilatation. De plus, un gonflement apparaît, il est dû à une fuite plasmatique engendrée par une perméabilité vasculaire. Cet

œdème comprime localement les fibres nerveuses, engendrant ainsi une douleur. La peau ne peut plus remplir son rôle de fonction barrière en cas de brèche cutanée (Figure 1.22).

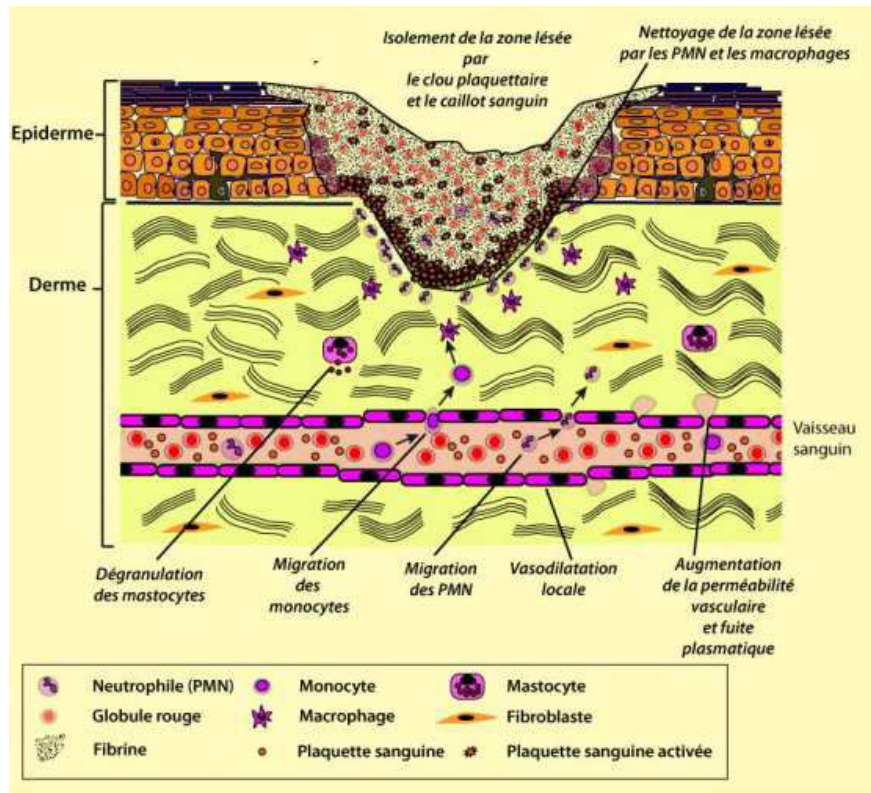


Figure 1.22 : Les principaux événements du processus inflammatoire lors de la cicatrisation de la peau

(www.biologiedelapeau.fr)

L'inflammation est un processus normal dans le cas d'une blessure. Dans un premier temps, les macrophages déjà présents dans la zone de la plaie vont phagocyter les organismes étrangers comme les bactéries pour limiter l'infection. Les mastocytes vont relarguer de l'histamine. Ce médiateur chimique va augmenter l'afflux sanguin tout en diminuant localement le débit pour augmenter la diapédèse (passage des leucocytes au travers de l'endothélium vasculaire), ainsi le nombre de leucocytes et de protéines va pouvoir augmenter au niveau du tissu atteint (Wilgus and Wulff, 2013). Les cellules endothéliales vasculaires vont se contracter, engendrant une plus grande perméabilité vasculaire, ce qui facilite également le passage de protéines plasmatiques dans le liquide interstitiel, participant ainsi à la formation d'un œdème. Un caillot de fibrine va se former dans la zone interstitielle pour isoler la zone blessée et limiter l'infection. Une croûte, mélange de fibrine déshydratée, de cellules dermiques et épidermiques, de cellules immunitaires et d'éventuels micro-organismes, va se former au bout de quelques heures. En parallèle, les cellules inflammatoires ne cessent

d'affluer : tout d'abord les neutrophiles qui détruisent les pathogènes (Wilgus et al., 2013), suivis des monocytes qui deviendront des macrophages. Les macrophages jouent d'abord un rôle pro-inflammatoire comme la présentation de l'antigène, la phagocytose et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, puis ils interviennent dans le processus de cicatrisation, en sécrétant par exemple des facteurs de croissance ou des substances chimiotactiques pour stimuler la migration des kératinocytes et fibroblastes. Les lymphocytes interviennent plus tardivement, au bout de 7 jours; généralement, attirés par les cytokines libérées par les macrophages.

b. Les médiateurs de l'inflammation

(Biologie de la peau)

De nombreuses molécules interviennent dans le processus inflammatoire, on les appelle médiateurs de l'inflammation, certains sont présentés dans le tableau 1.4. Ces molécules peuvent posséder des rôles agonistes ou antagonistes.

Tableau 1.4 : Exemple de médiateurs libérés par les cellules de l'infiltrat inflammatoire et les cellules de peau à la périphérie d'une lésion cutanée.

Type cellulaire	Médiateurs libérés	Fonctions
Mastocytes	Histamine Chymase, tryptase	Augmentation de la perméabilité vasculaire Modulation de l'afflux de neutrophiles Régulation du remodelage tissulaire
Neutrophiles	ROS, peptides cationiques, eicosanoïdes, protéases IL-1 β , IL-6, TNF α IL-8, VEGF	Nettoyage de la plaie par phagocytose des agents pathogènes et des débris cellulaires Activation des macrophages Amplification de la réponse inflammatoire Modulation de la réparation

Macrophages	IL-1 β , IL-6, TNF α TGF- β 1, IL-10 TGF- α , TNF α , EGF-HB TGF- β , PDGF, FGF- β VEGF	Nettoyage de la plaie par phagocytose des agents pathogènes et des débris cellulaires et des neutrophiles Amplification de la réponse inflammatoire Limitation de l'inflammation Activation de la ré-épidermisation Induction de la différenciation des myofibroblastes et stimulation de la fibroplasie (formation de tissu fibreux) Stimulation de l'angiogénèse
Kératinocytes	VEGF, PIGF	Stimulation de l'angiogénèse
Fibroblastes	CTGF VEGF, PIGF	Prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales et stimulation de l'angiogénèse Stimulation de l'angiogénèse

(CTGF : Facteur de croissance du tissu conjonctif ; EGF : Facteur de croissance épidermique ; IL : interleukine ; PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes ; PIGF : Facteur de croissance placentaire ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; TNF : Facteur de nécrose tumorale ; VEGF : facteur de croissance vasculaire de l'épithélium.)

Il existe d'autres médiateurs chimiques impliqués dans l'inflammation. C'est le cas de la thrombine, une enzyme qui catalyse la conversion de fibrinogène soluble en fibrine insoluble. Elle est aussi activatrice de facteurs de coagulation et agit comme agent mitogène des lymphocytes et des fibroblastes. Elle va aussi, indirectement, favoriser l'adhésion des leucocytes sur les cellules endothéliales. Les prostaglandines et les leucotriènes, qui sont des métabolites de l'acide arachidonique, agissent à différents niveaux de l'inflammation (Figure 1.23). Par exemple, certaines prostaglandines sont vasorelaxantes et elles augmentent la perméabilité vasculaire, alors que certains leucotriènes sont vasoconstricteurs.

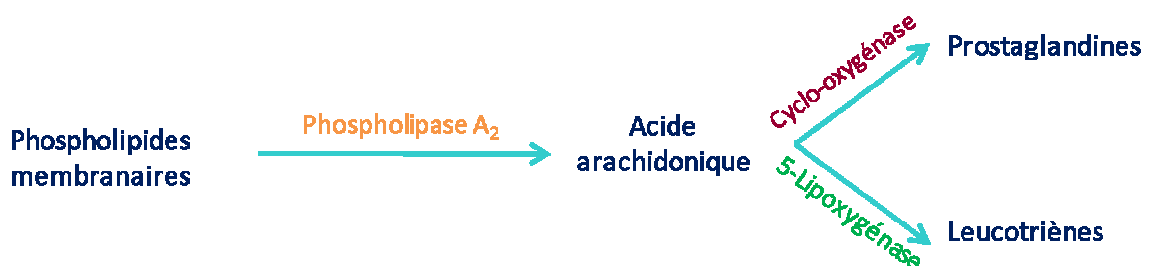


Figure 1.23 : Synthèse des prostaglandines et des leucotriènes

Les cytokines sont des glycoprotéines participant activement à la réponse inflammatoire (Barrientos et al., 2008). Les cytokines sont produites essentiellement par les macrophages, mais aussi par les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules endothéliales. Elles peuvent être autocrines, paracrines ou endocrines. Elles sont pléiotropes, mais une distinction est parfois faite entre cytokines pro- et anti-inflammatoires (Cavaillon, 1995). La première classe de cytokines, pro-inflammatoires, regroupe l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12, le TNF α et l'INF- γ . Elles participent au recrutement des cellules inflammatoires, favorisent leur dégranulation et augmentent la synthèse de prostacycline et le facteur d'activation plaquettaire. La seconde classe de cytokines, anti-inflammatoires, regroupe l'IL-1Ra, l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 et le TGF- β . Ces cytokines inhibent la production et l'action des cytokines pro-inflammatoires.

Tableau 1.5 : Exemple de cytokines, de leurs cellules sécrétrices et leurs fonctions (Claudy et al., 1996; Ngom, 2008)

Cytokines	Exemples de cellules sécrétrices	Fonctions
IL-1	Kératinocytes Macrophages	Recrutement des lymphocytes T Induction de la synthèse d'IL-2 Cytotoxique
IL-8	Cellules endothéliales Monocytes Macrophages Fibroblastes Kératinocytes	Recrutement et dégranulation des neutrophiles Facteur de croissance
TNF α	Macrophages Cellules de Langerhans Kératinocytes	Augmentation de la production d'histamine Immuno-modulateur Cytotoxique Propriétés anti-virales Stimule la production d'IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 et des chémokines Activateur des MMP
IL-10	Lymphocytes B Lymphocytes T Monocytes	Immunosuppression par inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires
IL-7	Kératinocytes	Prolifération des lymphocytes B et T Production d'IL-2
IL-6	Macrophages	Stimulation du développement et de la production des lymphocytes B
IL-12	Kératinocytes	Développement sélectif de cellules T
TGF α	Cellules tumorales Eosinophiles Macrophages	Facteur de croissance impliqué dans la différenciation des cellules épithéliales
TGF β	Macrophages	Implication dans le développement de la matrice extracellulaire Immunosuppression Cicatrisation
VEGF	Macrophages	Angiogenèse
INF γ	Lymphocytes T Cellules NK	Augmentation de l'activité des macrophages Prolifération des lymphocytes B

c. Le cas du monoxyde d'azote

Les macrophages et les cellules endothéliales produisent du monoxyde d'azote (NO) qui induit une vasodilatation lors de l'inflammation et joue alors un rôle pro-inflammatoire (Cals-Grierson and Ormerod, 2004). Il existe également une production basale de NO par différents types cellulaires comme les fibroblastes, les kératinocytes, les mélanocytes ou encore les cellules endothéliales. Le NO est une molécule polyfonctionnelle à la fois effectrice et régulatrice (Figure 1.24). Au sein de la peau, le NO a plusieurs fonctions, présentées dans la figure 1.25 .

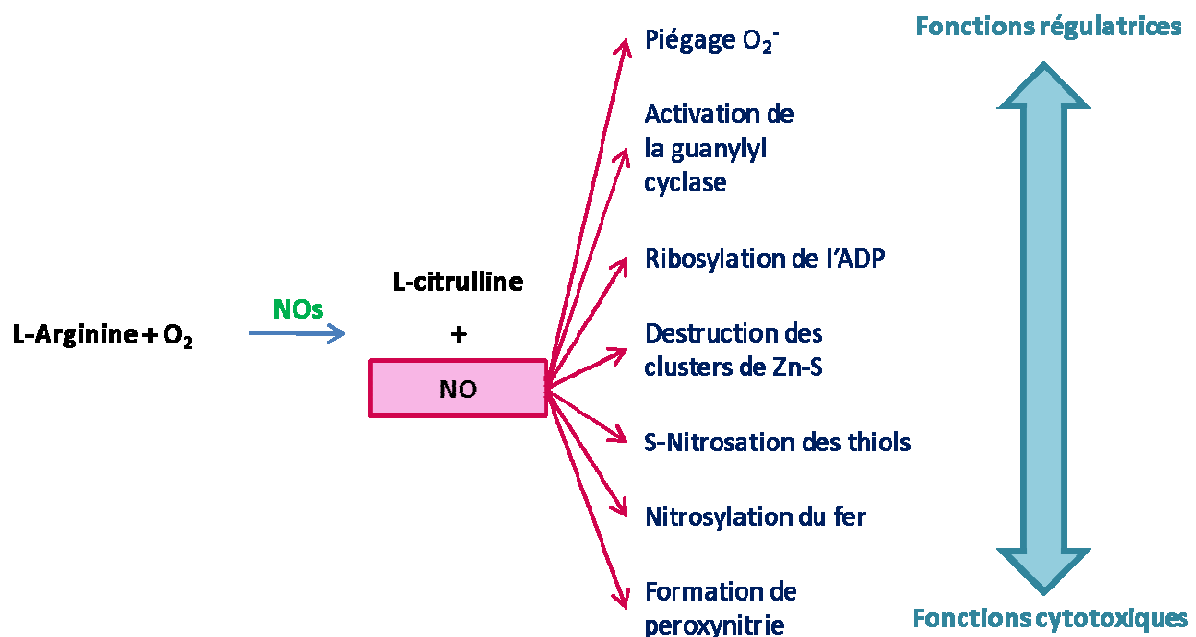


Figure 1.24 : Mécanismes d'action du NO (Daniela et al., 1998)

Le NO est produit lors de la transformation de l'arginine en citrulline par la NO synthase (NOs). Il existe des NOs constitutive et des NOs inductibles. L'induction peut se faire par des pathogènes ou des cytokines pro-inflammatoires comme le mélange IL-8 / $IFN\gamma$.

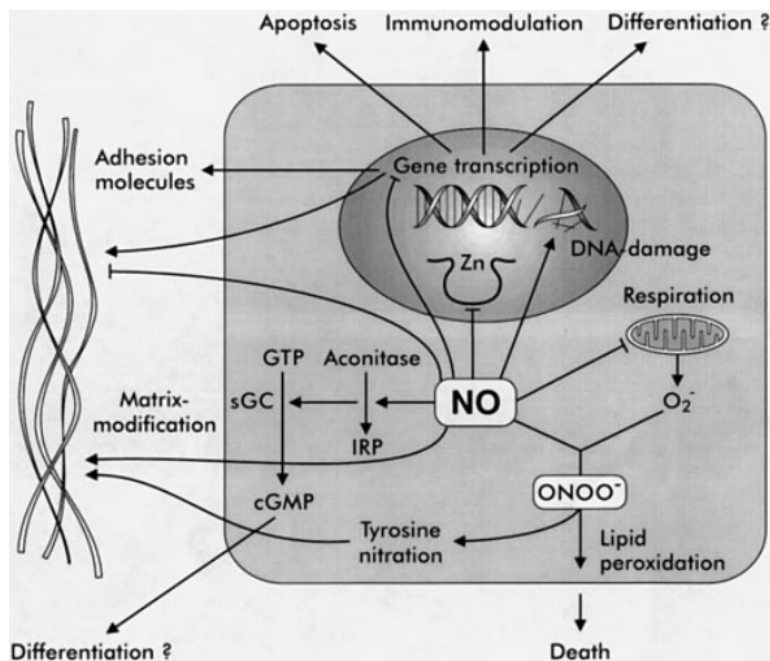


Figure 1.25 : Fonctions potentielles du NO dans une cellule de peau humaine
(Daniela et al., 1998)

d. Actifs dermo-cosmétiques anti-inflammatoires

Dans certains cas, l'inflammation cutanée ne survient pas en réponse à une agression, il s'agit alors d'un dysfonctionnement inflammatoire chronique. L'une des pathologies inflammatoires chroniques les plus connues est la dermatite atopique (Leung et al., 2004). Elle se développe chez les personnes ayant un terrain génétique propice, caractérisé notamment par un système immunitaire très réactif, et une sécheresse cutanée avancée (La Roche Posay). Elle se manifeste par des rougeurs, une rugosité, des démangeaisons et une sécheresse sévère. En dehors de ces pathologies, il existe également des sensibilités cutanées ou des peaux réactives, encore appelées dermatoses invisibles, qui se caractérisent par des sensations désagréables telles que les tiraillements et picotements (Martini, 2016), d'où la nécessité de développer des actifs dermo-cosmétiques qui possèdent un pouvoir anti-inflammatoire.

A titre d'exemple, des plantes comme la bardane (*Arctium lappa*) qui a des propriétés antiprurigineuses ou le bleuet (*Centaurea cyanus*) utilisé comme apaisant oculaire, sont des actifs déjà commercialisés pour leurs propriétés anti-inflammatoires (Martini, 2016).

3. La cicatrisation

Une plaie correspond à la rupture du tissu cutané, qu'il s'agisse de la peau ou des muqueuses. Elle peut survenir après une agression thermique (brûlure), physique (coupure) ou mécanique (frottement). Il existe différents types de plaie : chirurgicales, traumatiques, escarres, brûlures dans tous les cas, il s'agit d'une destruction tissulaire. Les plaies sont classées en deux catégories : les plaies superficielles et les plaies profondes. Dans le premier cas, la plaie n'atteint pas le derme profond, la réparation se fera donc uniquement par épidermisation. Dans le second cas, la totalité du derme est atteinte, la réparation sera donc plus complexe. Chirurgicalement, la cicatrisation est le rétablissement de la continuité épidermique, c'est à dire la jointure des deux berges d'une plaie.

La cicatrisation est le résultat de trois phases : une phase inflammatoire et vasculaire (cf § 2), une phase de réparation tissulaire et une phase de maturation (Tableau 1.6).

Tableau 1.6 : Les étapes de la cicatrisation (d'après Méliissopoulos and Levacher, 2012)

Temps de latence après la blessure	Durée	Etapes	Evénements
Quelques minutes	1 à 3 jours	Phase vasculaire (hémostase) et inflammatoire	<ul style="list-style-type: none"> - Arrêt du saignement: coagulation, adhésion & agrégation plaquettaire - Sécrétion et activation des médiateurs - Migration et activation des cellules inflammatoires (neutrophiles, macrophages) - Détersion (élimination des déchets) - Recrutement des fibroblastes et des cellules endothéliales
Quelques heures à quelques jours	1 à 3 semaines	Phase de réparation tissulaire: <ul style="list-style-type: none"> - Granulation - Epidermisation 	<ul style="list-style-type: none"> - Formation du tissu de granulation : prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales - Synthèse d'une nouvelle MEC - Angiogenèse - Epidermisation : transformation des fibroblastes en myofibroblastes, migration des kératinocytes à partir des berges, restauration de la jonction dermo-épidermique, restauration de la fonction barrière des kératinocytes
1 à 2 semaines	Quelques mois à quelques années	Phase de maturation: <ul style="list-style-type: none"> -Remodelage -Néo-vascularisation 	<ul style="list-style-type: none"> - Réorganisation de la MEC - Modification du collagène - Apoptose des myofibroblastes - Néo-vascularisation

La phase inflammatoire est absolument nécessaire mais elle doit ensuite être résolue. Ainsi, l'utilisation d'anti-inflammatoire n'est pas du tout souhaitable dans les premières phases de la cicatrisation.

Les actifs dermo-cosmétiques végétaux utilisés pour la cicatrisation ciblent majoritairement la phase de réparation tissulaire. Parmi eux, on retrouve l'extrait hydro-alcoolique de *Centella asiatica* dans le produit Madecassol® qui favorise la biosynthèse de collagène, ou alors l'allantoïne qui est extraite de *Symphytum officinale* et qui favorise la migration cellulaire (Martini, 2016). Lors de notre étude, nous avons travaillé sur la deuxième phase de la cicatrisation en cherchant des actifs susceptibles de stimuler la prolifération des kératinocytes.

C. Conclusion sur les cibles biologiques dermo-cosmétiques

La peau est un **organe très complexe** possédant de multiples fonctions. Il est donc crucial d'en préserver l'homéostasie, et lorsqu'elle est perturbée, de pouvoir la restaurer. C'est pourquoi le développement d'actifs dermo-cosmétiques est un enjeu majeur. Dans ce cadre, nous avons choisi de rechercher des actifs **anti-vieillessement cutané** (antioxydants, anti-MMP), **anti-inflammatoires** (inhibiteurs de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, inhibiteurs de la production de NO) et **cicatrisants** (stimulateurs de la migration des kératinocytes).

III. Les biotechnologies végétales

A. Culture *in vitro* de cellules et tissus végétaux

1. Introduction

La culture végétale *in vitro* (CVIV) correspond à la manipulation en conditions aseptiques de cellules ou d'organes végétaux placés sur un milieu de culture nutritif de synthèse et sous atmosphère contrôlée (température, humidité, lumière) (Smetanska, 2008). Elle est basée sur la manipulation de cellules végétales isolées et sur des techniques de multiplication végétative permettant de régénérer des plantes entières à partir de fragments de plante (Thorpe, 2006). Elle est rendue possible grâce un caractère spécifique des cellules végétales : la totipotence, qui est la capacité pour une cellule différenciée de se dédifférencier, c'est-à-dire de revenir d'un stade de cellule spécialisée au stade de cellule méristématique, pouvant se différencier à nouveau (Krikorian and Berquam, 1969; Orhan et al., 2012). Ce concept a été décrit pour la première fois par Haberlandt, botaniste autrichien, au début du XX^{ème} siècle (Haberlandt, 1902).

La CVIV peut présenter un intérêt dans différents domaines. Tout d'abord elle est couramment utilisée en recherche fondamentale, elle permet de réaliser de très nombreuses études physiologiques, mais elle est aussi un outil fondamental pour la biologie moléculaire. Par exemple, des cellules végétales dépourvues de paroi, les protoplastes, sont utilisées pour effectuer de la transgénése par électroporation. La CVIV peut aussi présenter un intérêt en écologie, notamment pour la micropropagation ou la conservation d'espèces menacées. Enfin, elle est très utilisée pour la production de métabolites d'intérêt (Orhan et al., 2012).

2. Historique de la culture végétale *in vitro*

Dans un premier temps, la CVIV a été très utilisée sur des espèces végétales d'intérêt alimentaire. Par exemple, des études ont été menées sur la croissance infinie des racines de tomates en milieu liquide (White, 1934), ou encore sur l'obtention des premiers cals de carotte (Nobécourt, 1939).

En parallèle, de nombreuses recherches ont été réalisées sur des organismes modèles tels que le tabac. En 1969, deux physiologistes végétalistes, Murashige et Skoog, ont mis au point des

milieux de culture (Murashige and Skoog, 1962) qui sont encore utilisés aujourd'hui pour de très nombreuses espèces végétales. En 1965, Vasil et Hilderbrandt régénèrent un plant de tabac à partir d'une cellule unique (Vasil and Hildebrandt, 1965).

Les espèces horticoles font aussi l'objet de nombreuses études, notamment les orchidées, avec la première multiplication *in vitro* en 1965 (Morel, 1965).

Au fil du temps, la CVIV a également été utilisée pour la production de métabolites d'intérêt. Par exemple, en 1977, on s'intéressait déjà à la production d'antraquinones par des cellules de *Morinda citrifolia* cultivées en bioréacteur (Wagner and Vogelmann, 1977).

3. Les différentes techniques de CVIV

a. Généralités

Le développement d'un végétal résulte de deux processus : la croissance (division et élongation) et la différenciation cellulaire. Le processus de développement est gouverné par des facteurs externes comme par exemple la photopériode ou la température et par des facteurs internes que sont les hormones végétales (ou phytohormones) et les vitamines qui sont des régulateurs de croissance.

Il existe différentes classes d'hormones végétales considérées comme régulateurs de croissance (Tableau 1.7). (Kefeli, 1978; Kefeli and Kalevitch, 2013; Khan et al., 2012; Machácková and Romanov, 2013).

Tableau 1.7 : Les principales hormones végétales

Hormone	Nature chimique	Fonction
Gibbérellines	Diterpène	Croissance des entre-nœuds Levée de la dormance
Ethylène	Alcène	Dormance des graines Maturation des fruits
Acide abscissique	Acide sesquiterpénoïque	Diminution de la croissance des entre-nœuds Dormance des graines Fermeture des stomates
Cytokinines	Adénine substituée	Division cellulaire Croissance apicale
Auxines	Dérivés du tryptophane (éventuellement acide chorismique)	Elongation cellulaire Rhizogénèse

Certaines hormones possèdent des rôles antagonistes comme par exemple l'acide abscissique et les gibbérellines. Les auxines et les cytokinines jouent des rôles complémentaires dans la division et la différenciation cellulaires, ce qui en fait des hormones fondamentales en CVIV (Figure 1.26). Les auxines sont synthétisées dans les parties aériennes et sont ensuite transportées par le phloème de l'apex vers la base de la plante, alors que les cytokinines sont transportées par le xylème de la base vers l'apex, donc dans les deux cas le transport est polarisé, mais en direction contraire (Hopkins, 2003). Parmi les phyto-hormones utilisées en CVIV, certaines sont naturelles comme la zéatine, l'AIB ou l'AIA, et d'autres d'origine synthétique comme par exemple la kinétine, le 2,4-D ou l'ANA (Figure 1.27) (Gaspar et al., 1996).

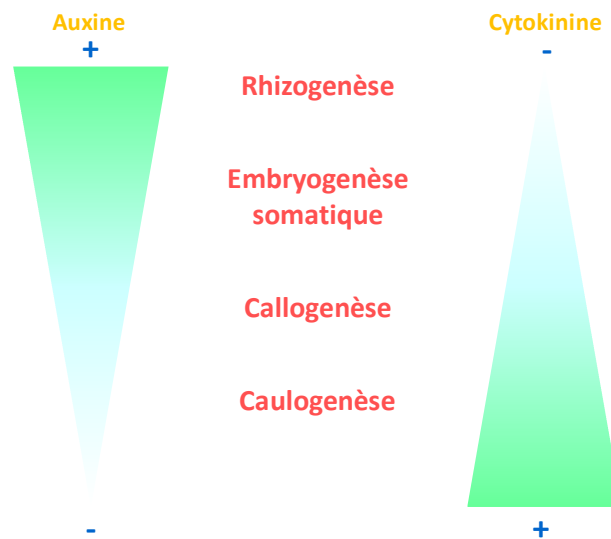


Figure 1.26 : Effet de la balance hormonale auxine/cytokinine sur le développement

Un protocole de CVIV débute en plaçant le matériel végétal (explant) sur un milieu de culture constitué d'une balance hormonale cytokinine / auxine (Figure 1.26 et 1.27), mais aussi de sucres, d'eau, de vitamines et de minéraux. Les minéraux se décomposent en deux groupes : les macroéléments (azote, phosphore, potassium, soufre, magnésium, calcium) et les microéléments (fer, manganèse, molybdène, cuivre ...), les premiers étant en concentrations plus importantes (g/L) que les seconds (mg/L) (Orhan et al., 2012). A noter que l'on peut ajouter des agents gélifiants comme l'agar si l'on souhaite faire de la culture en milieu solide.

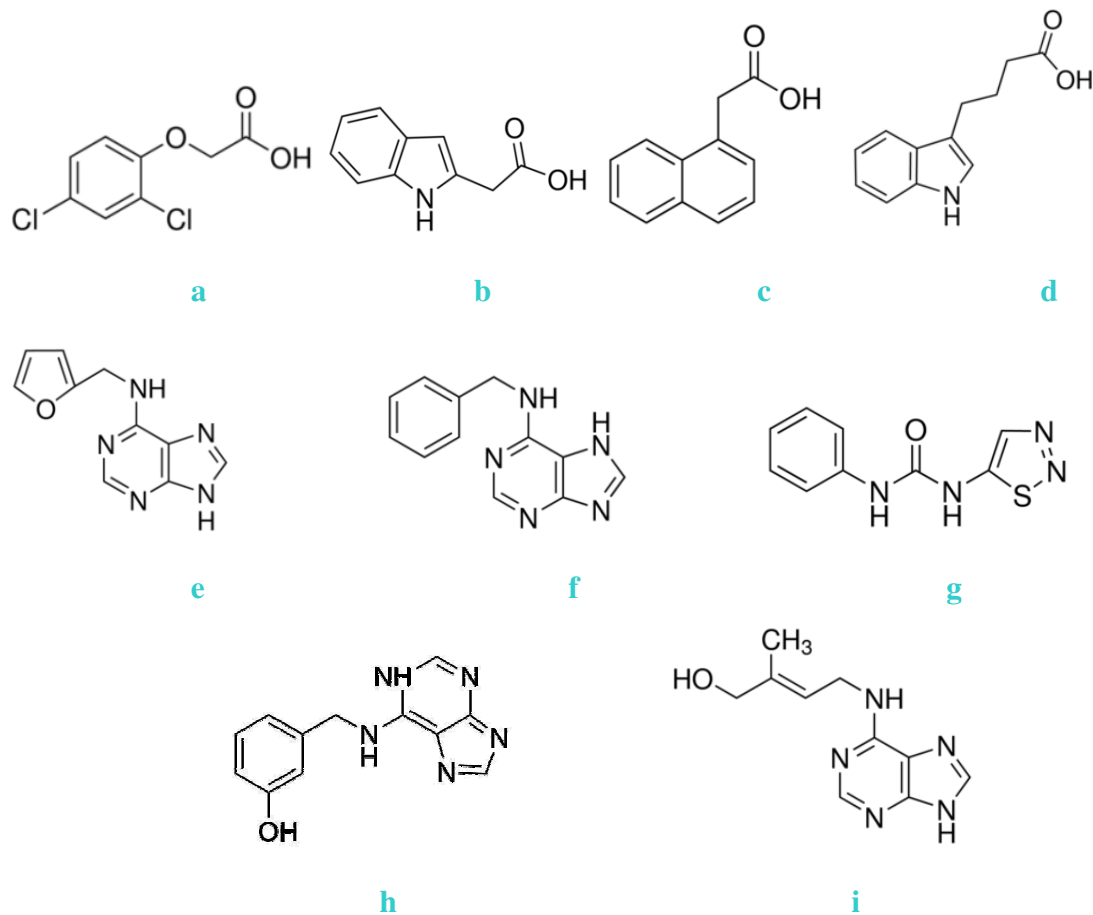


Figure 1.27 : Exemple d'auxines (a-d) et de cytokinines (e-i) utilisées en CVIV

(a. acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, b. acide 3-indole acétique, c. acide 1-naphtalène acétique, d. acide 3-indole butyrique, e. kinétine, f. benzylaminopurine, g. thiazuron, h. méta-topoline, i. zéatine)

Il existe d'autres hormones végétales comme le jasmonate, l'acide salicylique et les brassinostéroïdes (Davies, 2013). Le jasmonate est synthétisé en réponse à un stress et peut ensuite être transformé par exemple en méthyl-jasmonate par une méthyl-transférase, la molécule devient alors volatile. Il peut aussi être transformé en isoleucine-jasmonate (JA-Ile) par des acides aminés synthase, le JA-Ile une forme de stockage du jasmonate, notamment en cas de stress osmotique (Figure 1.28) (Wasternack, 2007). L'acide salicylique joue un rôle dans la croissance, l'induction florale mais aussi sur l'ouverture des stomates ou encore l'augmentation de la teneur en chlorophylles et caroténoïdes et comme le MeJA, il est impliqué dans la réponse au stress (Hayat et al., 2007).

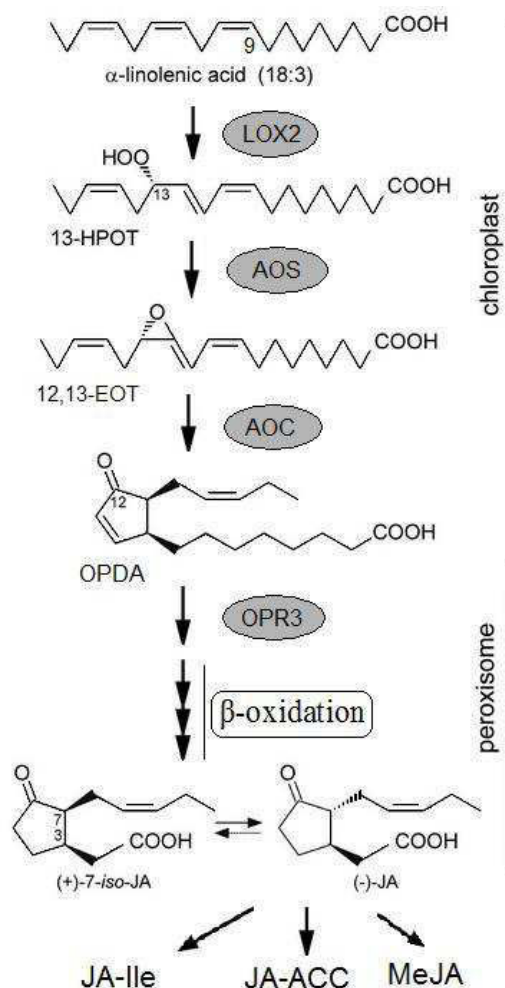


Figure 1.28 : Voie de biosynthèse de l'acide jasmonique et de ses dérivés (Delker et al., 2006)

LOX2 : Lipoxygénase 2 ; AOS : Allène oxyde synthase ; AOC : Allène oxyde cyclase ; OPR3 : 12-oxophytodienoate réductase 3 ; 13-HPOT : acide 13S-hydroperoxy-9Z,11E,15Z-octadécatriénoïque ; 12,13-EOT : acide 12,13-époxyoctadécatriénoïque ; OPDA : acide 12-acide oxophytodienoïque ; JA ; jasmonate ; JA-Ile : Isoleucine-jasmonate ; JA-ACC : jasmonoyl-1-amino-1-cyclopropane carboxylique acide ; MeJA : Methyl jasmonate.

Le milieu de culture étant très riche en nutriments, en particulier en sucres, il est très favorable au développement bactérien et fongique. C'est pourquoi il est nécessaire de le stériliser avant utilisation, et de travailler ensuite en milieu aseptique. Le matériel végétal subit lui aussi systématiquement une étape de stérilisation. L'ensemble du travail est ensuite réalisé avec du matériel stérile et sous une hotte à flux laminaire. Il est possible d'ajouter des antibiotiques et antifongiques au milieu de culture, mais cela n'est pas forcément souhaitable lors d'une valorisation industrielle (cf. § III.B.3).

b. Culture de cellules dédifférenciées

Les cals sont des amas de cellules dédifférenciées (Figure 1.29). La callogénèse est le processus permettant d'obtenir des cals à partir d'un explant qui est un matériel végétal différencié (racine, tige, feuille, graine, fleur). Pour ce faire, l'explant doit être placé sur du milieu de culture en présence d'une balance hormonale avec des concentrations de cytokinines et d'auxines qui sont - en théorie - équivalentes (Figure 1.26) (Orhan et al., 2012). Le choix de l'explant peut s'avérer important pour l'obtention de cals (Dhar and Joshi, 2005; Yan et al., 2009).



Figure 1.29 : Cals de *Chorisia speciosa* (Fahim et al., 2015)

La callogénèse peut être une étape précédant la caulogénèse ou l'embryogénèse somatique dans le cas de stratégies de micropropagation indirectes (Figure 1.31) (Baskaran and Staden, 2014; Fernando et al., 2016; Skala et al., 2015; Tomiczak et al., 2015). Elle constitue également une étape indispensable pour l'établissement de suspensions cellulaires. Dans ce cas, les cals doivent être le plus friable possible pour pouvoir se désagréger une fois sous agitation en milieu liquide (Lage et al., 2015; Robles-Martínez et al., 2016).

Les suspensions cellulaires sont principalement utilisées pour la production de métabolites d'intérêt en réalisant des *scale-up* en bioréacteurs (Figure 1.30) et en stimulant la biosynthèse de molécules à haute valeur ajoutée (Dias et al., 2016; Orhan et al., 2012; Ramirez-Estrada et al., 2016; Yue et al., 2016).



Figure 1.30 : Culture de cellules dédifférenciées de *Panax ginseng* en bioréacteurs.
 a. Bioréacteur de 5L, b. Bioréacteur de 500 L, c. Bioréacteur de 1000 L, d. Récolte d'un réacteur de 1000 L (Peak et al., 2014)

c. Régénération d'un vitroplant

Un vitroplant est une plante entière (parties aériennes et souterraines) obtenue par CVIV, lors du processus de micropropagation.

Pour initier la régénération de vitroplants par CVIV, il existe deux stratégies: l'organogénèse et l'embryogénèse somatique. Dans les deux cas, on peut soit passer par une étape préliminaire de callogénèse (multiplication de cellules dédifférenciées), il s'agit de la voie indirecte, soit utiliser directement un explant, il s'agit de la voie directe (Figure 1.31).

L'embryogénèse somatique consiste à régénérer un embryon à partir de n'importe quel type cellulaire, qui germera pour donner un vitroplant (Dodeman et al., 1997; Tisserat et al., 1979). L'embryogénèse somatique nécessite une concentration d'auxine légèrement supérieure à celle de cytokinine (Jiménez, 2001, 2005), le 2,4-D étant très souvent utilisé (Boufis et al., 2014; Ćosić et al., 2013) (Figure 1.31). Cette technique est très utilisée notamment comme outil pour les études de biologie moléculaire (Feher et al., 2002) mais aussi pour l'agronomie où il peut être très intéressant de créer des clones comme par exemple pour la vigne ou les agrumes

(Martinelli et al., 2015; Omar et al., 2016), et en horticulture, notamment pour la multiplication des orchidées (Agila et al., 2015).

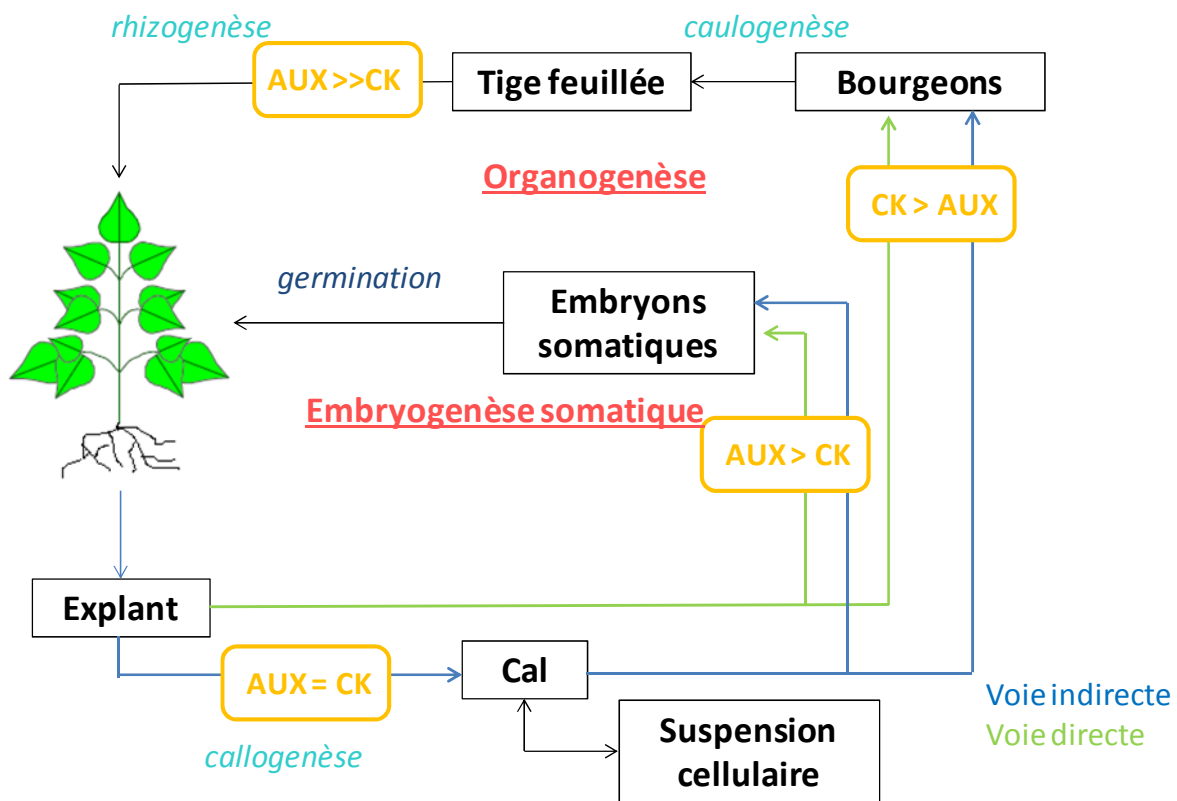


Figure 1.31 : Schéma récapitulatif des différentes stratégies d'obtention d'un vitroplant avec les balances hormonales théoriques

Par ailleurs, il est également possible d'induire séquentiellement la différenciation des différents organes végétaux *via* un processus d'organogénèse, qui consiste tout d'abord en la différenciation des parties aériennes (caulogénèse), puis dans un second temps des racines (rhizogénèse) (Figure 1.31). Pour la caulogénèse, il est nécessaire que la balance hormonale soit caractérisée par un excès de cytokinine, la rhizogénèse nécessitant au contraire un excès d'auxines. A noter qu'il est parfois inutile d'ajouter des hormones exogènes pour la rhizogénèse, puisque les auxines endogènes synthétisées par les parties aériennes de la plantule en formation peuvent suffire à initier la formation de racines.

d. Cultures racinaires

La culture de racines est également utilisée en CVIV, soit sous forme de racines adventives soit sous forme de hairy roots.

d.1 Les *hairy roots*

Les *hairy roots* résultent d'une infection de la plante par la bactérie *Agrobacterium rhizogenes*, qui lui transmet un fragment du plasmide Ri, le T-DNA, codant pour la synthèse d'auxines et d'opines, ce qui conduit à une prolifération racinaire (Figure 1.32). En anglais, cette infection est appelée *hairy roots disease*. Dans la nature, cette infection survient généralement après une blessure de la plante. *In vitro*, cette transformation est génétiquement stable car le T-DNA est intégré au génome végétal, et elle permet une croissance racinaire importante, et ce sans apport d'hormones végétales exogènes. Les *hairy roots* sont caractérisées par des ramifications latérales très importantes et l'absence de géotropisme. (Srivastava and Srivastava, 2007).

Par rapport aux cellules dédifférenciées, les avantages des *hairy roots* se situent au niveau de leur stabilité génétique et biochimique, et de l'absence d'hormones dans le milieu de culture.

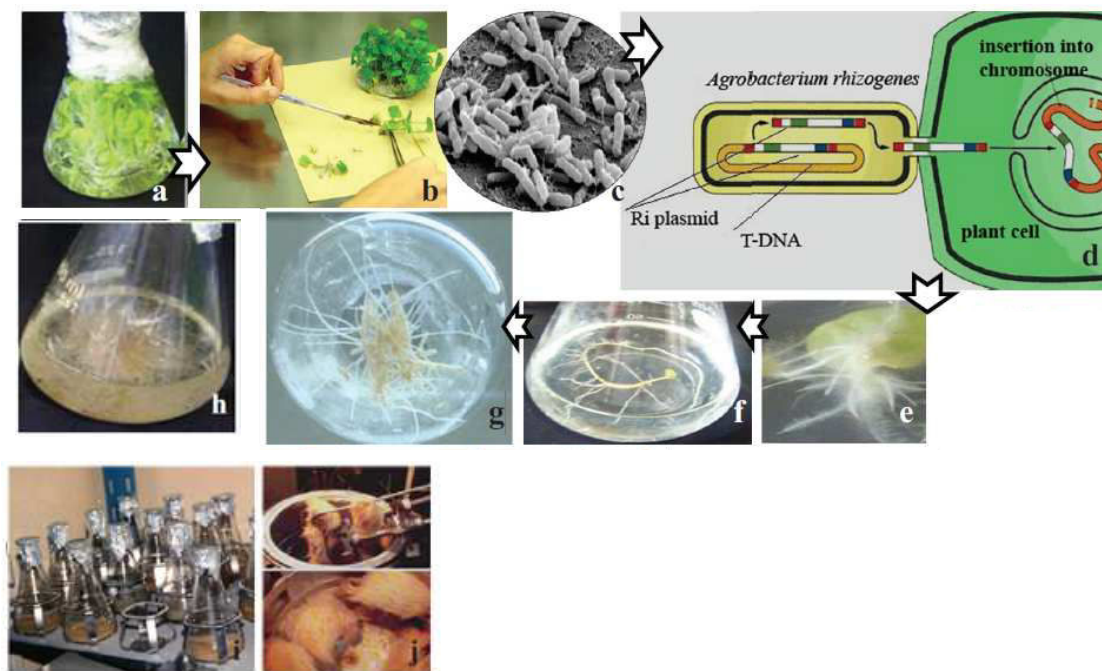


Figure 1.32 : Les étapes nécessaires à l'établissement de *hairy roots* (Talano et al., 2012)

a. Explant stérile ; b & c. Etape d'infection : blessure des explants et inoculation avec une culture d'*A. rhizogenes* ; d. Transformation génétique : transfert et intégration de le T-DNA du plasmide Ri au génome de la plante ; e. Premiers développements racinaires en absence d'hormones exogènes ; f - h : Propagation des racines ; i. Culture des *hairy roots* en milieu liquide et sur agitateur orbital ; j. *Scale-up* en bioréacteurs

Les *hairy roots* sont très utilisées pour la production de métabolites secondaires, par exemple pour la production d'alcaloïdes chez *Rauwolfia serpentina* (Mehrotra et al., 2015) et *Rhazya stricta* (Akhgari et al., 2015), et de polyphénols chez *Salvia milltiorhiza* (Yang et al., 2016) et *Momordica charantia* (Thiruvengadam et al., 2014). Parmi de nombreux autres exemples, nous pouvons encore citer la production d'ajmalicine chez *Catharanthus roseus* (Thakore et al., 2017).

d.2 Les racines adventives

Les *hairy roots* sont des organes génétiquement modifiés, ce qui n'est pas toujours souhaitable pour l'industrie. C'est pourquoi des stratégies alternatives de cultures racinaires se basent sur le développement de racines adventives. Dans ce cadre, la plante n'est pas transformée, la prolifération des racines est provoquée par un excès d'auxine dans le milieu. Cette technique est également utilisée pour produire des métabolites d'intérêts (Murthy et al., 2016; Peak et al., 2014), comme par exemple de la plumbagine à partir de *Plumbago rosea* (Silja and Satheeshkumar, 2015) ou encore des polyphénols d'*Echinaceae purpurea* (Figure 1.33).

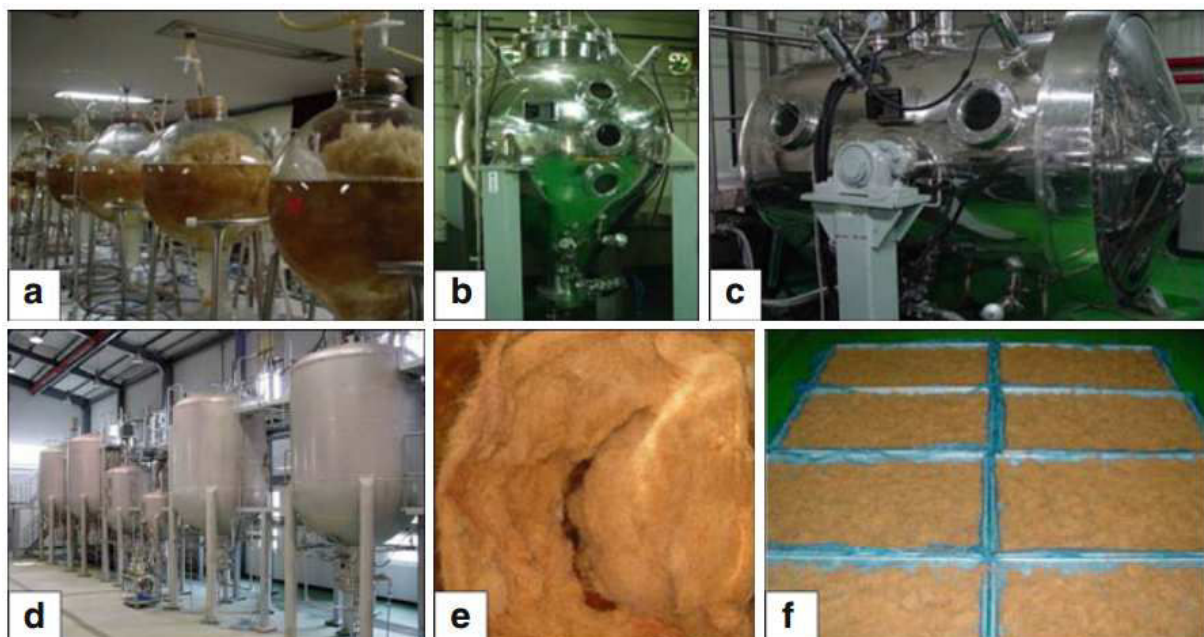


Figure 1.33 : Culture de racines adventives d'*Echinaceae purpurea* en bioréacteurs.

a. Airlift de 20L, b. Bioréacteur bubble de 500 L, c. Bioréacteur tambour de 500 L, d. Bioréacteur vertical de 10000 L, e-f. Récolte des racines adventives

(Peak et al., 2014)

B. Production de molécules d'intérêt par CVIV

1. Généralités

Les plantes produisent des métabolites secondaires très diversifiés qui ne sont pas indispensables à la croissance et au développement, mais qui sont essentiels pour l'adaptation et la défense vis à vis de stress environnementaux. Elles possèdent un arsenal chimique de défense varié (alcaloïdes, terpènes, polyphénols), constitué de molécules bioactives, qui peuvent être valorisées dans des secteurs très diversifiés : pharmaceutique, agrochimique, agroalimentaire, cosmétique ou encore dans le secteur des compléments alimentaires (Ramirez-Estrada et al., 2016). Cependant, pour de nombreuses raisons, l'approvisionnement en matière première végétale peut s'avérer compliqué. Par exemple des problèmes environnementaux (ex : espèces protégées, en voie de disparition) ou géopolitiques peuvent restreindre l'accès aux matières premières. De plus, la teneur en métabolites secondaires d'une plante varie en fonction de l'écosystème, la saison, les conditions climatiques, il est donc difficile d'avoir un matériel standardisé. Ces problèmes ont conduit les chercheurs à davantage considérer l'alternative que constitue la CVIV depuis les années 1990 pour la production de métabolites (Figure 1.34), donnant naissance au concept de *plant cell factories*, très étudié comme en témoigne l'analyse bibliographique quantitative ci-dessous (Dias et al., 2016; Ramachandra Rao and Ravishankar, 2002; Yue et al., 2016).

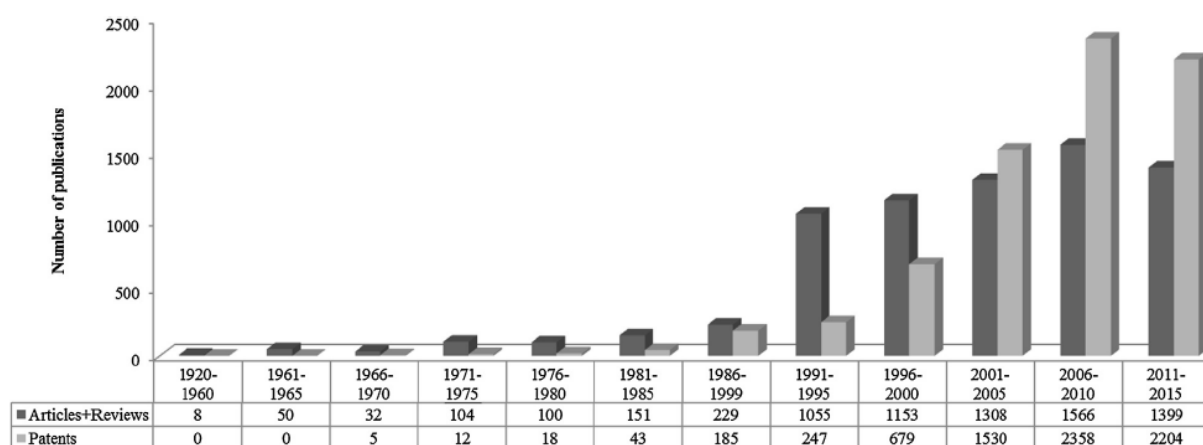


Figure 1.34 : Nombre de publications et de brevets publiés de 1920 à 2015 sur la culture végétale *in vitro* (Dias et al., 2016)

La CVIV est une approche intéressante pour la production de métabolites secondaires car elle présente les avantages suivants : production possible n'importe où dans le monde, diminution considérable des facteurs de variabilité, absence de contaminants de types métaux lourds ou

pesticides, conservation des espèces menacées, cycle de culture raccourci, respectueux de l'environnement (Chattopadhyay et al., 2002; Ochoa-Villarreal et al., 2015; Ramirez-Estrada et al., 2016). De plus, du fait que les conditions de culture sont contrôlées, les extraits obtenus sont censés être qualitativement et quantitativement constants, permettant ainsi une standardisation plus aisée du matériel végétal (Dias et al., 2016). Un contrôle important doit cependant être réalisé à chaque étape du développement de la stratégie de bioproduction pour sécuriser le process (Figure 1.35) (Murthy et al., 2015).

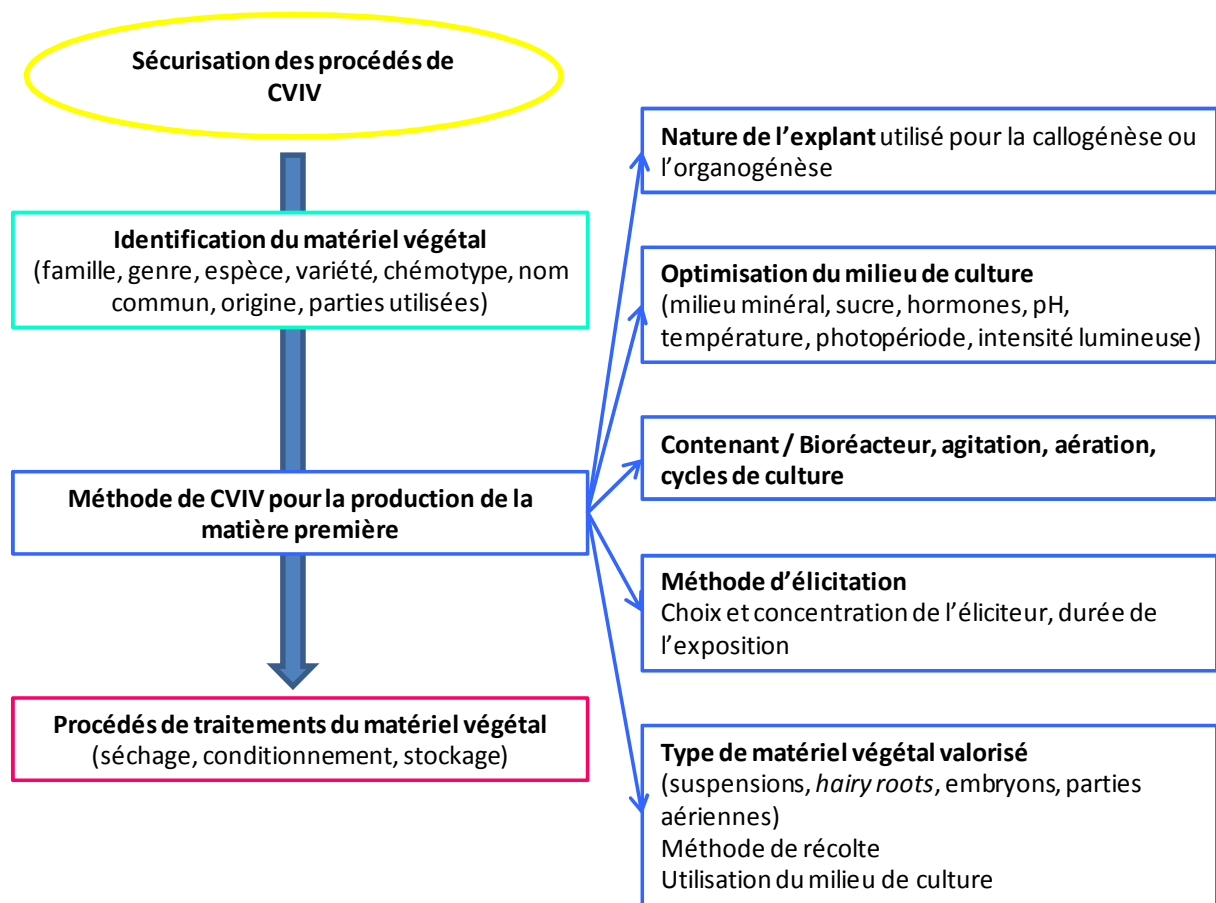


Figure 1.35 : Mise en place d'une stratégie de bioproduction en CVIV

(adapté de Murthy et al., 2015)

Un avantage de la CVIV est aussi la possibilité de faire du *scale-up*, où le volume de culture est progressivement augmenté, de quelques dizaines de mL à des milliers de litres dans des bioréacteurs. Il existe différents types de bioréacteurs (Peak et al., 2014; Yue et al., 2016) (Figure 1.36).

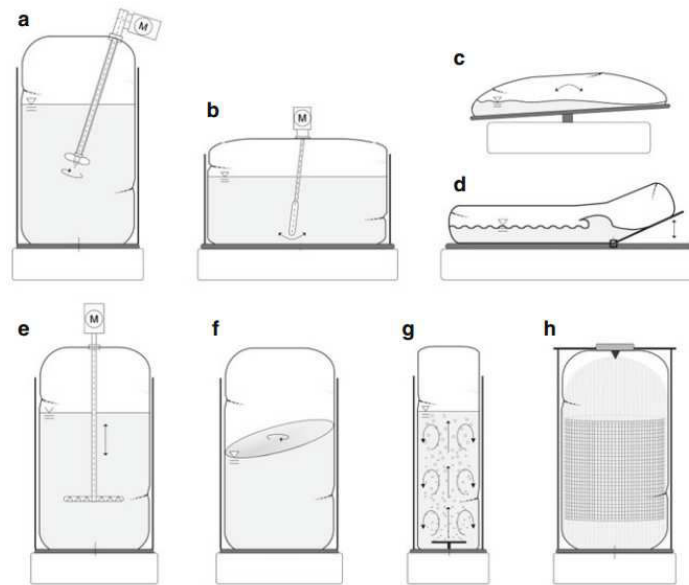


Figure 1.36 : Représentation schématique des différents types de bioréacteurs
 a. agitation magnétique, b. agitation à tambour, c. plateforme basculante, d. plateforme élévatrice, e. disque vibrant, f. plateforme orbitale, g. colonne à bulles, h. bioréacteur à brume
 (Peak et al., 2014)

A noter que des bioréacteurs spécifiques pour les *hairy roots* existent (Srivastava and Srivastava, 2007) (Figure 1.37).



Figure 1.37 : Bioréacteur spécifique pour les *hairy roots*
 (Peak et al., 2014)

La mise en suspension nécessite également le suivi de certains paramètres, plus encore lors du *scale-up* : la rhéologie, l'aération, la sensibilité des cellules végétales au cisaillement (Kieran et al., 1997).

La CVIV présente aussi des inconvénients. Par exemple, lorsque la culture est maintenue pendant une longue période, les risques d'induire des variations somaclonales augmentent, conduisant à un patrimoine génétique différent des cellules d'origine et à des variations phénotypiques (Jain et al., 2013). Un autre inconvénient dans le cas de l'utilisation de la CVIV pour la production de molécules d'intérêt est la baisse de production de métabolites secondaires par rapport à des plantes cultivées en champs puisque le matériel n'est plus soumis à des stress. De plus, il se peut que la biosynthèse de métabolites soit associée au processus de différenciation cellulaire. Il est alors nécessaire de mettre en place différentes stratégies pour restaurer cette production de métabolites secondaires comme l'élicitation (cf § 2.b) (Murthy et al., 2014a). Il existe d'autres techniques pour la production de molécules végétales par des plantes hors champs. On peut citer la culture en hydroponie ou aéroponie qui n'est pas de la CVIV *stricto sensu* mais qui est un concept en plein essor, notamment au sein de la société Plant Advanced Technologies qui a breveté le procédé des Plantes à Traire® (Gontier et al., 2001; PAT SA).

La CVIV peut également être utilisée dans des stratégies de bio-transformation, c'est-à-dire l'utilisation du métabolisme végétal pour modifier la structure de molécules exogènes. Cette approche peut constituer une véritable alternative à la synthèse chimique ou à l'hémi-synthèse. Elle permet de palier les limites de la synthèse organique, mais elle peut aussi être une approche intéressante pour créer de la diversité moléculaire, ce qui a été fait avec des cals d'*Angelica sinensis* pour synthétiser des dérivés d'isofraxetine-6-*O*- β -D-glucopyranoside (Zhou et al., 2017). On peut également citer des parties aériennes d'*Origanum majorina* qui sont capables de convertir l'hydroquinone en arbutine (Skrzypczak-Pietraszek et al., 2017) ou encore des suspensions cellulaires de *Panax quinquefolium* et *Catharanthus roseus* qui transforment l'acide artémisinique et l'acide dihydroartémisinique en leurs dérivés hydroxylés (Zhu et al., 2010).

2. Les stratégies utilisées pour augmenter la production de métabolites secondaires

Les métabolites secondaires ne sont pas indispensables à la croissance des cellules végétales, ils sont davantage utiles pour lutter contre des stress biotiques ou abiotiques. Ainsi, les

cellules végétales ne synthétisent pas systématiquement les mêmes métabolites secondaires que la plante d'origine, et surtout ils peuvent être en quantité moindre (Zhao et al., 2005). C'est pourquoi différentes stratégies ont été élaborées pour stimuler la production de métabolites secondaires par les suspensions cellulaires.

A noter cependant qu'une production accrue de métabolites secondaires peut devenir phytotoxique et/ou exercer un rétro-contrôle négatif ; il faut donc effectuer un contrôle en parallèle de la croissance cellulaire lors de tout protocole visant à stimuler le métabolisme secondaire *in vitro*.

Plusieurs paramètres d'optimisation sont détaillés ci-dessous : le choix d'une lignée, l'élicitation, l'ingénierie métabolique ou encore l'addition de précurseurs.

a. Choix d'une lignée

Il existe des variations génétiques au sein d'une même espèce pouvant se traduire par des variations métaboliques quantitatives et qualitatives. Ainsi, il est d'abord nécessaire de sélectionner comme source d'explant une plante ayant un important potentiel métabolique, c'est-à-dire avec un contenu important en molécules d'intérêt (Ramachandra Rao and Ravishankar, 2002). Ensuite, un criblage peut également être réalisé sur les différentes lignées de cals obtenus qui peuvent elles aussi présenter une hétérogénéité (Ogino et al., 1978). Celle-ci est facilement visible lorsqu'on recherche des pigments végétaux comme par exemple la shikonine ou encore des anthocyanes (Dougall et al., 1980; Fujita et al., 1985; Yamamoto et al., 1982). Certains auteurs ont établi des lignées qui étaient 4 fois plus productrices que d'autres, c'est le cas pour la production d'anthocyanes par des cellules de *Vitis vinifera* (Curtin et al., 2003). On peut également exposer les cellules à des agents mutagènes pour induire des mutations qui auraient pour conséquence une surproduction de métabolites d'intérêt (Ramachandra Rao and Ravishankar, 2002).

b. Elicitation

L'élicitation est la technique la plus utilisée pour augmenter la production de métabolites d'intérêt dans des cultures végétales *in vitro*. Un éliciteur est un composé qui stimule les réactions de défense, il peut donc induire le métabolisme secondaire pour protéger les cellules et la plante entière (Baenas et al., 2014; Ramirez-Estrada et al., 2016; Zhao et al., 2005). Les

élicitations peuvent être de deux natures : biotique et abiotique. Dans les deux cas, l'élicitation peut devenir phytotoxique, il est donc important de vérifier l'effet des éliciteurs sur la croissance et/ou la viabilité cellulaire. De plus, nous parlerons ici essentiellement des élicitations de suspensions cellulaires, mais les *hairy roots* (Bais et al., 2002; Peebles et al., 2009), les racines adventives et les plantes entières (Nair et al., 2013) peuvent aussi être élicitées.

Les élicitations abiotiques regroupent les sels et composés inorganiques ainsi que les stress physiques. Parmi les sels on trouve AgNO_3 , AlCl_3 , CaCl_2 , CdCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , HgCl_2 , KCl , MgSO_4 , NiSO_4 (Ramirez-Estrada et al., 2016). De façon plus courante, on retrouve des élicitations au NaCl (généralement de 50 et 200 mM) (Baenas et al., 2014), qui provoque l'augmentation d'un facteur 3,8 de la teneur en steviosides dans des cals de *Stevia rebaudiana* (Gupta et al., 2014) ou encore d'un facteur 4,4 de la teneur en flavonoïdes dans des suspensions de *Ginkgo biloba* (Chen et al., 2014). Le NaCl induit des variations osmotiques pouvant être perçues comme un stress. Il existe d'autres stress abiotiques comme les rayonnements UV, qui par exemple augmentent de 1,8 fois la teneur en polyphénols totaux dans des cals d'*Echinaceae purpurea* (Manaf et al., 2016) ou encore d'un facteur 4,9 la teneur en diterpènes dans des *hairy roots* de *Salvia miltiorrhiza* (Wang et al., 2016).

Les éliciteurs biotiques sont généralement reconnus *via* des récepteurs membranaires sur les cellules végétales, la transduction du signal engendrera ensuite des variations dans le métabolisme (Zhao et al., 2005). Parmi les éliciteurs biotiques, on retrouve les éliciteurs exogènes qui proviennent d'organismes non végétaux, et les éliciteurs endogènes qui sont des hormones végétales. Ainsi la production d'éliciteurs endogènes peut-être induite par des éliciteurs exogènes ou abiotiques. L'ensemble des mécanismes biochimiques impliqués sont présentés dans la figure 1.38.

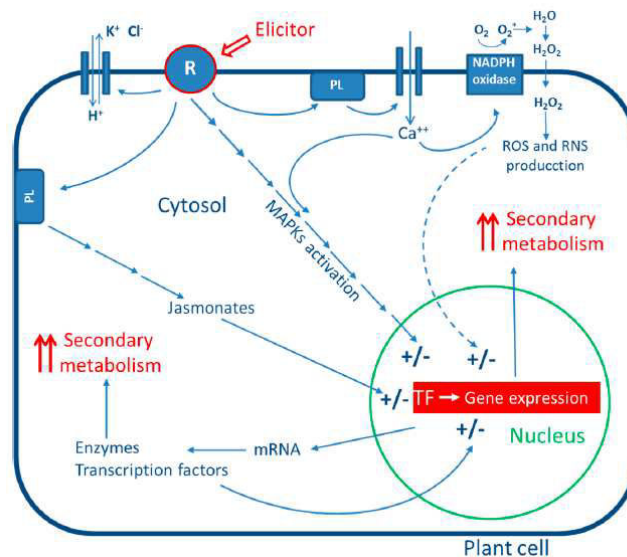


Figure 1.38 : Réponses des cellules végétales à l'élicitation biotique (Ramirez-Estrada et al., 2016)
 R : récepteur, PL : phospholipase, MAPKs: protéines kinases activatrices de la Mitose, ROS : espèces réactives de l'oxygène, RNS : espèces réactives de l'azote, TF : facteurs de transcription

Les éliciteurs que nous avons utilisés lors de notre étude sont présentés ci-dessous :

b.1 Le méthyl jasmonate

Le méthyl jasmonate (MeJa) (Figure 1.39) est une molécule de signalisation végétale appartenant à la famille des oxylipines (Farmer et al., 2003). Il s'agit d'une phytohormone.

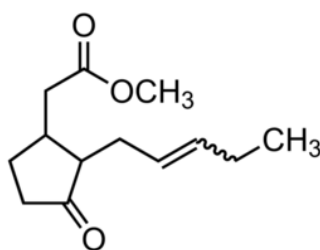


Figure 1.39 : Méthyl jasmonate

Cette molécule est synthétisée lorsque la plante est attaquée par un organisme pathogène ou blessée (Ramirez-Estrada et al., 2016). Elle permet l'augmentation de la synthèse des métabolites secondaires, de façon aspécifique (Zhao et al., 2005).

Le MeJa augmente la production d'alcaloïdes à très haute valeur ajoutée. Il augmente par exemple d'un facteur 2 la teneur en taxanes par des cellules de *Taxus globosa* (Osuna et al., 2015) ou la teneur en tabersonine, alcaloïde bisindolique, dans les suspensions de *Catharanthus roseus* (Goldhaber-Pasillas et al., 2014). Le MeJa permet aussi d'augmenter la

production de composés phénoliques, il augmente par exemple d'un facteur 2,5 la teneur en acides phénoliques dans des tiges de *Salvia virgata* (Attaran Dowom et al., 2017) ; d'un facteur 3 la teneur en anthraquinones dans des suspensions de *Rubia tinctorum* (Perassolo et al., 2016) ; d'un facteur 2,7 la teneur en flavonoïdes dans les suspensions d'*Hypericum perforatum* (Wang et al., 2015). Il provoque également une augmentation de la teneur en stilbènes dans des suspensions cellulaires de *Sylibum marianum* transformées avec le gène codant pour la stilbène synthase (Hidalgo et al., 2017). Le MeJa est aussi capable de stimuler la synthèse de terpènes : par exemple, il augmente d'un facteur 13 la teneur en acide gymnémique dans des suspensions de *Gymnema sylvestris* (Chodisetti et al., 2015) ou d'un facteur 3 des triterpènes (bétuline, acide bétulinique, lupéol) dans des suspensions de *Jatropha curcas* (Zaragoza-Martínez et al., 2016).

b.2 L'acide salicylique

L'acide salicylique (SA) (Figure 1.40), qui est l'acide 2-hydroxybenzoïque, est une molécule de signalisation végétale impliquée dans la résistance systémique acquise (Durrant and Dong, 2004; Pieterse and van Loon, 1999).

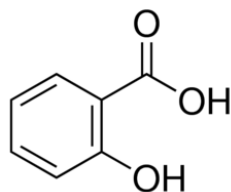


Figure 1.40 : Acide salicylique

Comme le MeJa, il s'agit d'une phytohormone capable d'induire la synthèse de métabolites secondaires (Ramirez-Estrada et al., 2016; Zhao et al., 2005).

L'acide salicylique est couramment utilisé comme éliciteur pour augmenter la synthèse de polyphénols (Dias et al., 2016). Par exemple, il permet d'augmenter de presque deux fois la teneur en phénylpropanoïdes et naphthodianthrones dans des suspensions cellulaires d'*Hypericum perforatum* (Gadzovska et al., 2013). Mais il permet aussi d'augmenter la teneur en d'autres familles de métabolites secondaires : par exemple la production en ginsenosides dans des suspensions de *Panax ginseng* est triplée lors de l'élicitation au SA (Ali et al., 2006). On observe aussi un triplement de la teneur en acide gymnémique, un autre triterpène, dans *Gymnema sylvestris* (Chodisetti et al., 2015). Le SA est aussi utilisé pour stimuler la

biosynthèse d'alcaloïdes comme par exemple le taxol (Khosroushahi et al., 2006; Wang et al., 2007).

A noter que des analogues ou dérivés de SA peuvent être utilisés comme éliciteurs, c'est le cas de l'acide 2,6-dichloroisonicotinique ou du benzothiadiazole (Ramirez-Estrada et al., 2016).

b.3 Le chitosan

Le chitosan correspond à de la chitine partiellement dé-acétylée soit par des enzymes soit en milieu alcalin (Figure 1.41). La chitine est un constituant de la paroi des champignons et des levures, mais aussi de l'exosquelette des insectes. Il s'agit d'un polysaccharide de β -(1 \rightarrow 4)-N-acétylglucosamine. Le chitosan stimule les réactions de défense des plantes (Malerba and Cerana, 2016), il est d'ailleurs utilisé en phytoprotection (El Hadrami et al., 2010).

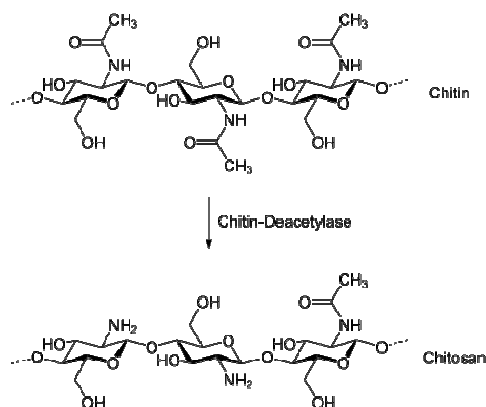


Figure 1.41 : Synthèse de chitosan à partir de chitine par voie enzymatique

Le chitosan permet dans de nombreux cas d'augmenter la teneur en métabolites secondaires. Par exemple, il permet d'augmenter d'un facteur 10 la teneur en menthol dans des suspensions cellulaires de *Mentha x pipereta* (Chang et al., 1998), alors que la production de monoterpènes par des cellules différenciées est assez peu décrite dans la littérature. Mais le chitosan permet aussi d'augmenter la teneur en métabolites plus classiquement désirés en CVIV comme par exemple la plumbagine, une naphtoquinone, par des cultures racinaires de *Plumbago indica* (Jaisi and Panichayupakaranant, 2017) ou encore d'acides phénoliques par des suspensions cellulaires de *Malus domestica* (Cai et al., 2014).

b.4 La coronatine

La coronatine (Figure 1.42) est une toxine produite par *Pseudomonas syringae*, capable d'induire la production de métabolites secondaires (Ramirez-Estrada et al., 2016), en activant la voie du MeJa chez les plantes (Figure 1.28 et 1.38) (Katsir et al., 2008).

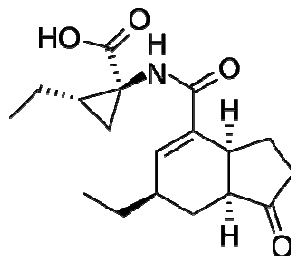


Figure 1.42 : Coronatine

L'effet stimulant de la coronatine sur le métabolisme secondaire a été démontré dans plusieurs études. Par exemple, il a été décrit que la coronatine permet d'augmenter la teneur en alcaloïdes dans des suspensions d'*Eschscholzia californica* (Haider et al., 2005); en glycéollines qui sont des dérivés d'isoflavonoïdes dans des suspensions de *Glycine max* (Fliegmann et al., 2005; Lauchli and Boland, 2003); en resvératrol dans des suspensions de *Vitis vinifera* (Almagro et al., 2015); en taxanes dans des suspensions de *Taxus* (Onrubia et al., 2013).

b.5 Autres exemples d'éliciteurs

Il existe d'autres éliciteurs, mais que nous n'avons pas utilisés lors de notre travail. Parmi eux, nous pouvons citer les brassinostéroïdes (Kolbe et al., 1995), des extraits de champignons inactivés (Ahmed and Baig, 2014; Bahabadi et al., 2011; Namdeo et al., 2002), des oligosaccharides (Zhou et al., 1992), des cyclodextrines (Belchi-Navarro et al., 2011), des extraits bactériens inactivés (Kang et al., 2009) ou encore des nanoparticules (Ghorbanpour and Hadian, 2015).

c. Addition de précurseurs

L'addition de précurseur, ou *feeding*, consiste à ajouter un précurseur des métabolites d'intérêt dans le milieu de culture pour que celui-ci soit incorporé dans la voie de biosynthèse, et que la concentration en substrats ne soit pas un facteur limitant. Par exemple l'ajout de glycine et

phénylalanine dans le milieu permet d'augmenter par deux la teneur en taxol dans des suspensions de *Taxus chinensis* (Luo and He, 2004), dans ce cas elle sert de précurseur de la chaîne latérale du taxol : la N-benzoylphénylisosérine (DiCosmo and Misawa, 1995). La phénylalanine est par ailleurs très utilisée pour la production de polyphénols, elle permet d'augmenter de 2,5 fois la teneur en anthocyanes dans des suspensions cellulaires de fraise (Edahiro et al., 2005). Elle permet aussi de stimuler la production de glycosides de phényléthanoïde par des suspensions de *Cistanche deserticola* (Ouyang et al., 2005). D'autres précurseurs peuvent être utilisés, comme par exemple la tyrosine, l'acide caféique ou encore le farnésol pour augmenter la production de phényléthanoïdes glycosides (Yue et al., 2016). Cependant il est important de veiller à ce que le précurseur ne soit pas en amont d'une enzyme limitante, sans quoi son ajout serait inutile.

A noter que les précurseurs peuvent s'avérer toxiques pour les cellules à des doses importantes et un excès de production de métabolites d'intérêt ou de précurseurs peut engendrer un rétrocontrôle négatif sur la voie de biosynthèse en amont (Yue et al., 2016). Il est donc important de contrôler les conditions et les concentrations d'ajout des précurseurs.

d. Ingénierie métabolique

L'ingénierie métabolique nécessite de connaître les voies de biosynthèse des molécules d'intérêt pour ensuite augmenter ou réprimer l'expression de gènes codant pour des enzymes clés. Ainsi on peut chercher à sur-exprimer les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse d'intérêt afin de lever le verrou lié à l'existence d'étapes limitantes, à sous-exprimer les gènes impliqués dans le catabolisme des molécules d'intérêt, ou à bloquer des voies biosynthétiques qui pourraient être en compétition avec celle d'intérêt (Yue et al., 2016). Par exemple, de nombreux travaux ont été réalisés sur la pervenche de Madagascar afin de sur-exprimer des gènes qui codent pour des enzymes clefs dans la biosynthèse des alcaloïdes anti-cancéreux qui en sont extraits (Verpoorte et al., 2002).

e. Autres paramètres influant sur la production de métabolites secondaires

Certains paramètres moins étudiés que l'élicitation ont un effet sur la production de métabolites secondaires par CVIV, comme par exemple le taux de sucres, de nitrate et de

phosphate dans le milieu de culture, la nature des phytohormones ou encore des paramètres environnementaux comme la lumière, la température, le pH, la vitesse d'agitation (Murthy et al., 2014; Ramachandra Rao and Ravishankar, 2002).

Une partie des métabolites synthétisés par les cellules peut être excrétée dans le milieu de culture (Hidalgo et al., 2017; Sakunphueak and Panichayupakaranant, 2010; Xu et al., 2016). Cela peut conduire à des pertes en molécules d'intérêt si le milieu de culture n'est pas valorisé, mais cela peut également permettre de travailler directement sur le milieu de culture avec des techniques adaptées. Par exemple, la perméabilisation membranaire avec des solvants organiques permet d'augmenter l'excrétion. Dans ce cas d'excrétion importante, il peut être intéressant de réaliser de l'extraction *in situ* dans le milieu de culture avec des résines d'ester polycarboxylique ou XAD, la capture des métabolites secondaires par des cyclodextrines, l'immobilisation des cellules dans un gel d'alginate. Ces techniques évitent notamment un éventuel rétrocontrôle négatif des molécules produites et peuvent faciliter le process *via* une culture continue (Murthy et al., 2014).

f. Stratégies combinées

Afin d'augmenter la teneur en molécules d'intérêt il est possible de combiner différentes stratégies détaillées précédemment, comme par exemple la combinaison d'éliciteurs de nature différente. Cela peut conduire à des synergies et donc des teneurs en molécules d'intérêt amplifiées par rapport à des traitements simples. Dans des suspensions cellulaires de *Vitis vinifera*, la teneur en stilbène est augmentée de 48% avec du chitosan par rapport à un témoin non-élicité, de 134% avec des UV-C et de 207% lorsque les UV et le chitosan sont combinés (Xu et al., 2016). Un mélange de coronatine et cyclodextrine permet aussi d'augmenter drastiquement (20 fois environ) la teneur en *trans*-resvératrol dans les suspensions de *V. vinifera* contre environ 2 fois pour chacun des deux éliciteurs appliqués séparément (Almagro et al., 2015). Il est également possible de combiner l'utilisation d'un éliciteur et d'un précurseur, ce qui a été fait pour augmenter la synthèse de withanolides par des suspensions de *Whitania somnifera* en utilisant du chitosan et du squalène (Sivanandhan et al., 2014). La combinaison de chitosan et de Diaion®, une résine adsorbante, permet aussi d'augmenter la synthèse de plumbagine dans des cultures racinaires de *Plumbago indica* (Jaisi and Panichayupakaranant, 2017).

3. Limites de la production de métabolites par CVIV

Il est important de souligner l'importance de la nature des molécules utilisées dans les milieux de culture *in vitro*, notamment lorsque ce sont des extraits et non des molécules pures qui sont valorisés, ou alors des atomisats de cellules. En effet, certaines phytohormones qui peuvent être par ailleurs utilisées comme produit phytosanitaire peuvent s'avérer nocives, par exemple c'est le cas du 2,4-D qui a une DL_{50} de 375 mg/kg chez le rat par voie orale (Alves et al., 2013; Coady et al., 2014; Harada et al., 2016). Néanmoins les concentrations utilisées en CVIV restent bien inférieures à cette DL_{50} . A titre d'exemple, nous avons utilisé du 2,4-D à une concentration maximale de 2 mg/L de milieu de culture. De plus, l'utilisation d'antimicrobiens pour préserver l'asepsie dans les cultures n'est pas non plus souhaitable dans le cas d'une valorisation cosmétique certifiée biologique par exemple (Ecocert). Les éliciteurs utilisés peuvent aussi avoir des effets sur les cellules humaines, comme le méthyl jasmonate qui inhibe la prolifération de cellules cancéreuses (Cohen and Flescher, 2009; Wang et al., 2008). Il est donc nécessaire de sélectionner rigoureusement les ingrédients du milieu de culture, et d'envisager le dosage des molécules potentiellement indésirables avant commercialisation des produits issus de la CVIV.

C. Conclusion sur les biotechnologies végétales

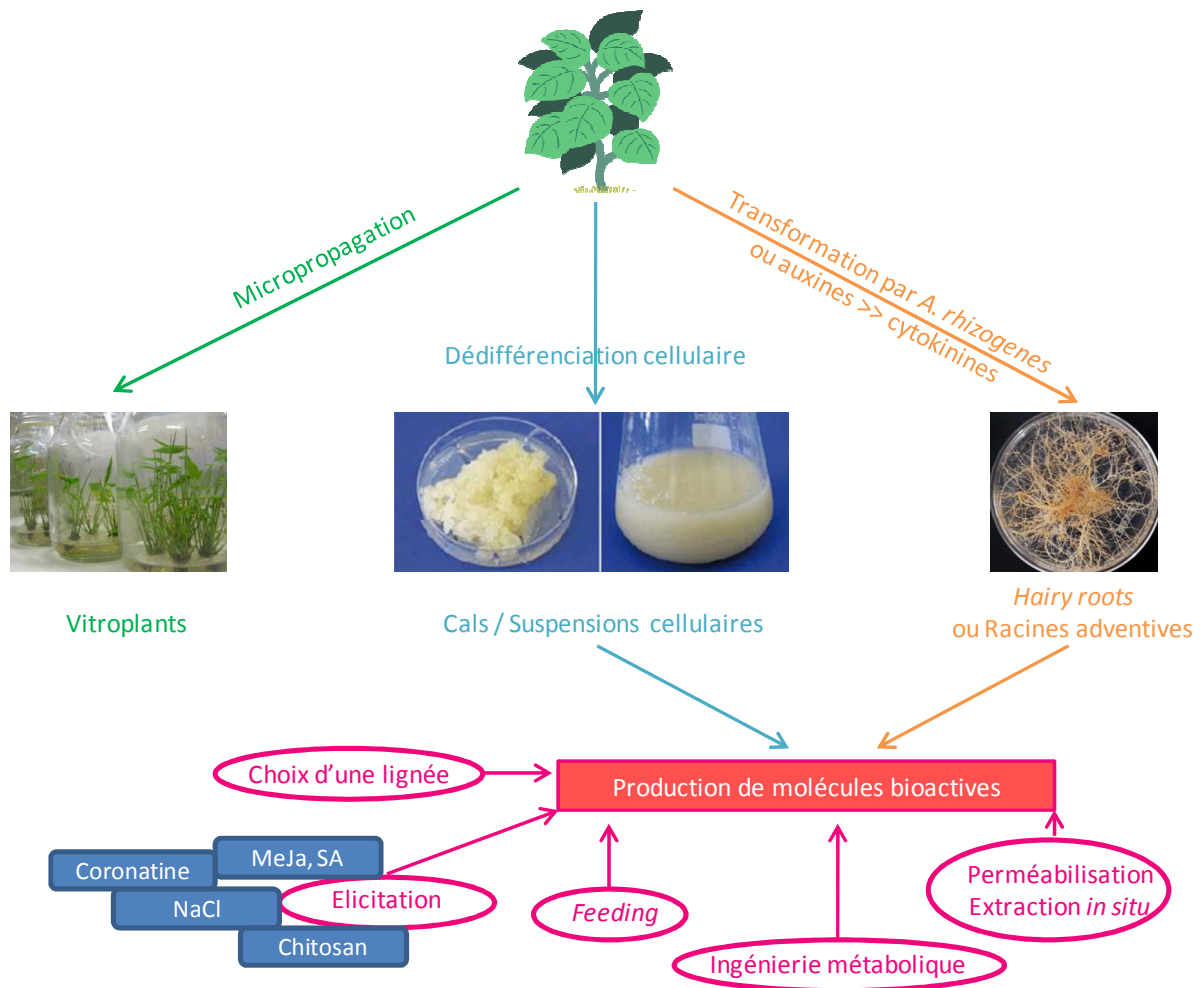
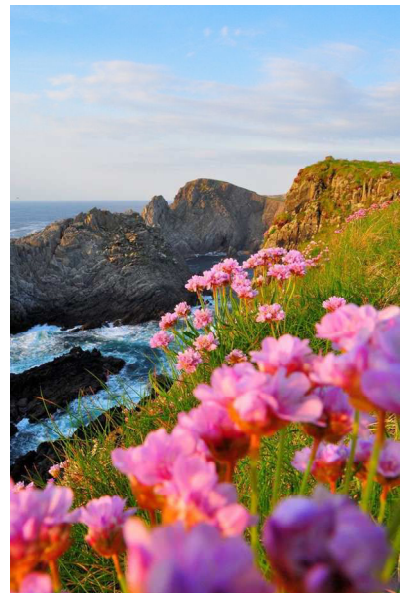


Figure 1.42 : Schéma récapitulatif des différentes techniques de CVIV et exemples de stratégies pour la production de molécules d'intérêt

La CVIV est un outil puissant pour la recherche en biologie végétale (ingénierie métabolique, micropropagation...) mais également pour la production de molécules bioactives avec une stratégie de type *plant cell factory*.

Cette dernière approche est très intéressante pour les industries pharmaceutiques (DiCosmo and Misawa, 1995), agro-alimentaires (Baenas et al., 2014) ou encore **cosmétiques** (Dias et al., 2016), qui utilisent de plus en plus les végétaux comme matière première pour l'obtention de **molécules d'intérêt** (anticancéreux, antioxydants, colorants, édulcorants ...). Néanmoins il s'agit de techniques onéreuses, donc leur utilisation est rentable pour la production de molécules à haute valeur ajoutée.

Chapitre 2 : Etude d'*Armeria maritima* (Mill.) Willd.



Le choix du matériel végétal étudié est basé sur plusieurs critères. Le premier d'entre-eux concerne l'écosystème de la plante puisque nous privilégions les plantes du littoral dont l'intérêt a été démontré dans le premier chapitre. Les travaux antérieurs réalisés sur l'espèce constituent également un critère très important : une espèce peu étudiée sera fondamentalement très attrayante alors qu'une espèce déjà décrite permettra une étude plus approfondie. La taxonomie et plus particulièrement la chimio-taxonomie sont des critères importants, notamment lorsque l'on recherche des familles de molécules préalablement définies. La disponibilité du matériel végétal pour s'assurer un approvisionnement suffisant et dans le respect de la législation est un critère essentiel, notamment avec la mise en place du protocole de Nagoya (Ratification du protocole de Nagoya). Le dernier critère est dicté par la réglementation cosmétique, en particulier par une législation spécifique mise en place en Chine, basée sur la liste IECIC (*Inventory of Existing Chemical Ingredient in China* - IECIC 2014). Cette liste regroupe l'ensemble des substances autorisées dans les produits cosmétiques commercialisés en Chine qu'il s'agisse d'excipient ou d'actif, d'origine chimique ou naturelle, d'extrait ou de molécule pure. Ainsi développer un actif qui ne serait pas listé dans cette réglementation reviendrait à se priver approximativement des deux tiers du marché mondial.

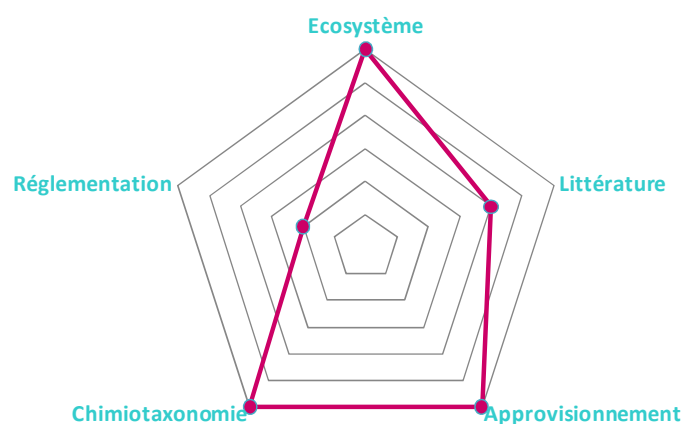


Figure 2.1 : Diagramme de sélection du matériel végétal : le cas d'*Armeria maritima*
(Plus un point est excentré, plus le critère est satisfait)

A. maritima est une **halophyte facultative**, qui pousse mieux en présence de 40 mM de NaCl qu'en absence de sel. Elle est capable de tolérer 200 mM de NaCl pendant plusieurs mois (Köhl, 1997a). Cette tolérance au sel explique sa présence sur le littoral breton mais elle est également capable de se développer sur des sols non salins, par exemple dans les jardins comme plante ornementale. Cette plante est fréquemment cultivée par des horticulteurs, il est donc très facile de s'en procurer. Très peu d'études ont été réalisées sur la phytochimie, la

biologie ou la CVIV de cette espèce (Kumarasamy et al., 2002; Lauranson et al., 1995). Le genre *Armeria* est très peu étudié pour les aspects qui nous intéressent, néanmoins d'autres genres de la famille des Plumbaginaceae ont fait déjà l'objet de travaux avec notamment la mise en évidence d'espèces riches en polyphénols dans le genre *Limonium* (Blainski et al., 2013; Ivan and Oprica, 2013). Ce profil métabolique a été confirmé par des travaux antérieurs au sein de notre laboratoire (Bréant, 2012), ainsi que pour le genre *Limoniastrum* (Chaabi, 2008). Quant à la réglementation cosmétique, *A. maritima* possède déjà une dénomination INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) : ARMERIA MARITIMA EXTRACT, mais elle ne figure pas sur la liste IECIC. Même si cette situation interdit toute exportation vers le marché chinois, *A. maritima* répond parfaitement aux autres critères posés en préambule, justifiant ainsi des études plus approfondies. De plus, cette réglementation pourrait évoluer ; il serait donc dommage de se priver d'une ressource végétale potentiellement intéressante uniquement sur la base de sa non-appartenance à la liste IECIC. Le positionnement d'*A. maritima* pour les différents critères retenus est résumé en figure 2.1.

I. Etude bibliographique

La taxonomie de l'espèce *Armeria maritima* (Tela Botanica; The Angiosperm Phylogeny Group, 2016) est présentée ci-dessous :

Tableau 2.1 : Taxonomie de l'espèce *Armeria maritima*.

Domaine	Eukaryota
Règne	Plantae
Clade	Angiospermes Dicotylédones vraies Dicotylédones vraies supérieures Superasteideae
Ordre	Caryophyllales
Famille	Plumbaginaceae
Genre	<i>Armeria</i>
Espèce	<i>maritima</i>
Descripteurs	Miller Willdenow

A. La famille des Plumbaginaceae

1. Taxonomie

La famille des Plumbaginaceae appartient à l'ordre des Caryophyllales (Tela Botanica). Cet ordre regroupe de nombreuses familles, parmi lesquelles certaines peuvent retenir notre attention, notamment les Cactaceae qui sont majoritairement des xérophytes (Wickens, 1998), et les Chenopodiaceae qui regroupent de nombreuses halophytes comme *Beta maritima* (Skorupa et al., 2016) ou encore *Atriplex halimus*.

La famille des Plumbaginaceae est subdivisée en deux sous-familles : les Plumbaginaoideae Burnett et les Limonioideae Reveal (Missouri Botanical Garden). Ce dernier taxon est à son tour divisé en deux tribus : *Aegilitideae* Peng et *Limonieae* Reveal. Il existe des synonymes de *Limonieae* comme *Armeniaceae* Horaninow, *Limoniaceae* Seringe ou encore *Staticeae* Cassel. Le genre *Armeria* appartient à la tribu des *Limonieae*.

La famille des Plumbaginaceae regroupe 29 genres et plus de 836 espèces, dont certaines sont présentées ci-dessous :



Figure 2.2 : Illustration de la diversité botanique au sein de la famille des Plumbaginaceae
 (A. *Limoniastrum guyonianum*, B. *Limonium vulgare*, C. *Acantholimon halophilum*, D. *Plumbago zeylanica*, E. *Ceratostigma plumbaginoides*, F. *Ceratolimon weygandiorum*)

A. <http://www.biusante.parisdescartes.fr> B. <http://florealpes.com> C. <http://flora.of.turkey.pagesperso-orange.fr> D. <https://commons.wikimedia.org> E. <http://www.plantes-et-nature.fr> F. <http://www.florasilvestre.es>

Parmi ces 29 genres on retrouve, en France notamment, les genres *Armeria*, *Ceratostigma*, *Limoniastrum*, *Limonium*, *Plumbago*. A noter que les *Limonium* étaient jadis nommés *Statice*, et qu'aujourd'hui *Statice* correspond au genre *Armeria* ; des confusions peuvent donc exister. L'espèce *Limonium vulgare* est notamment retrouvée sur le littoral breton (Figure 2.2 B). Cette espèce est appelée « lavande de mer » ou « immortelle bleue » à cause de la couleur de ses feuilles à limbe élargi.

2. Distribution

Les *Plumbaginaceae* constituent une famille assez cosmopolite, mais avec la spécificité de se retrouver aussi dans des endroits hostiles comme sur les sols secs ou salins (Guignard and Dupont, 2004; Missouri Botanical Garden). En effet, malgré une répartition sur l'ensemble du globe, on observe une préférence pour les littoraux, les steppes et les déserts salés (Botineau, 2010).

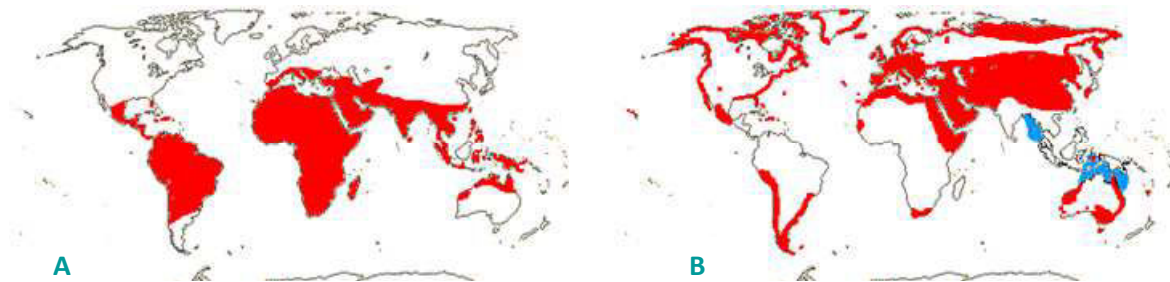


Figure 2.3 : Distribution mondiale des Plumbaginaceae (A. Plumbaginoïdeae, B. Limonioïdeae)
(Missouri Botanical Garden)

3. Description botanique

L'ensemble de la description botanique s'appuie sur l'ouvrage *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs* (Botineau, 2010).

Les *Plumbaginaceae* sont majoritairement des plantes herbacées mais parfois des arbustes comme pour le genre *Limoniastrum*.

Les fleurs sont regroupées en épis, grappes, thyrses ou têtes cymeuses. La fleur est régulière, hermaphrodite, pentamère et tétracyclique. La formule florale générale est la suivante :

$$5S + 5P + 5E + 5C$$

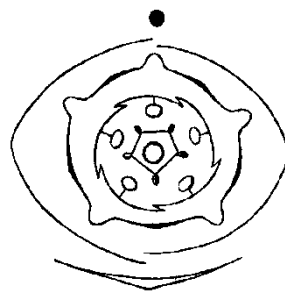


Figure 2.4 : Diagramme floral des Plumbaginaceae

<http://herba.msu.ru>

Le fruit peut-être un akène, une capsule ou plus rarement une pyxide. La graine est albuminée et contient un embryon droit.

4. Phytochimie

Plusieurs familles moléculaires ont été mises en évidence dans différents genres des Plumbaginaceae. De façon générale, les genres les plus étudiés de la famille sont le genre *Plumbago* et *Limonium*.

On retrouve notamment la présence de métabolites primaires particuliers, qui jouent le rôle d'osmo-régulateurs dans les halophytes (cf. chap1. § I.B.2). Parmi eux, on peut citer les ammoniums quaternaires comme la proline, la glycine-bétaïne ou encore la β -alanine-bétaïne (Hanson et al., 1994; Rathinasabapathi et al., 2001; Suprasanna et al., 2016). (Figure 2.5)

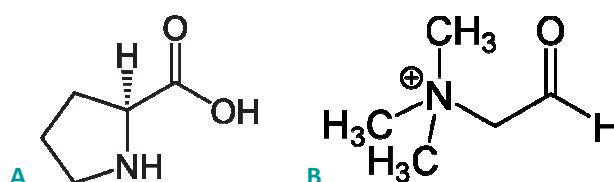


Figure 2.5 : Structure d'osmorégulateurs

A. Proline B. Glycine-bétaïne

De nombreuses classes de métabolites secondaires ont également été décrites dans la famille des Plumbaginaceae.

La présence de tripterpènes ubiquitaires comme le sitostérol ou l'amyrine a été mise en évidence dans les genres *Limonium* et *Plumbago* (de Paiva et al., 2005; Wei and Wang, 2006) (Figure 2.6). Des saponosides triterpéniques ont également été isolés dans le genre *Limonium* (Belboukhari and Cheriti, 2009). Des monoterpènes sont aussi présents dans le genre *Limonium* qui est un taxon à huile essentielle (Hammami et al., 2011).

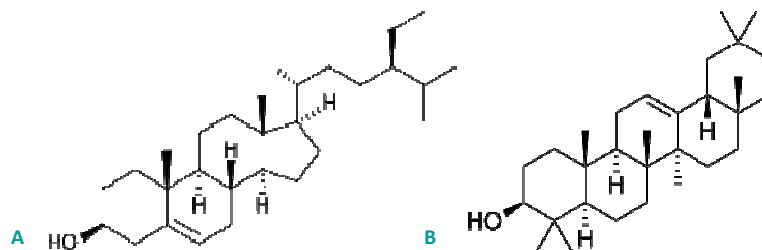


Figure 2.6 : Structure de triterpènes :

A. Sitostérol B. Amyrine

Il est important de signaler la présence d'alcaloïdes dans le genre *Plumbago* (Cong et al., 2013). Des composés plus originaux sont également décrits dans ce genre, il s'agit des naphthoquinones (Gunaherath et al., 1983; Lin et al., 2003), avec en chef de file la plumbagine (5-hydroxy-2-méthyl-1,4-naphthoquinone) (Figure 2.7 A).

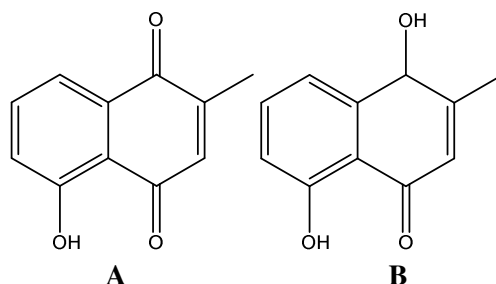


Figure 2.7 : Structure de base de la plumbagine (A) et de l'isoshinanolone (B)

Des naphthoquinones ont également été mises en évidence dans le genre *Ceratostigma* (Yue et al., 1994). La présence d'isoshinanolone, qui a une structure dérivée des naphthoquinones, a également été démontrée dans ces deux genres (de Paiva et al., 2005; Yue et al., 1997) (Figure 2.7 B). Les alcaloïdes et les quinones sont des familles de métabolites secondaires peu souhaitables en cosmétique, la première pour sa toxicité probable et la seconde pour le pouvoir allergisant qui lui est attribué (Bruneton, 2009; Inoue et al., 2007). Néanmoins, la présence de ces molécules n'étant pas décrite dans tous les genres de la famille, cela n'a pas été un critère de rejet lors de la sélection d'*A. maritima*.

La présence de coumarines simples comme l'ombelliférone ou l'éséculetine a été démontrée dans les genres *Ceratostigma* (Yue et al., 1997) et *Limonium* (Ahmed et al., 1999) (Figure 2.8).

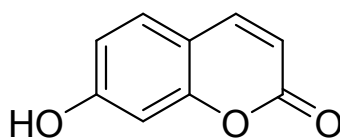


Figure 2.8 : Structure de l'ombelliférone

La présence d'acides phénoliques, qui sont des molécules ubiquitaires, a également été décrite dans plusieurs genres de la famille des Plumbaginaceae. Des acides phénoliques simples comme l'acide caféique ou vanillique ont été décrits (Yue et al., 1997), mais aussi des acides phénoliques conjugués à des acides aminés, comme par exemple la N-E-caféoyltyramine (Trabelsi et al., 2014) (Figure 2.9).

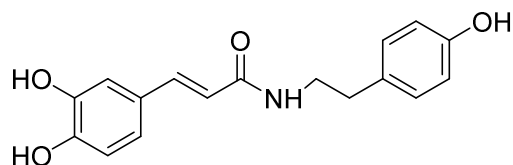


Figure 2.9 : Structure de la N-E-caféoyltyramine

Les flavonoïdes sont très largement distribués dans cette famille. On y retrouve des flavones (Rahmani et al., 2014), des flavonols (Korul'kina et al., 2004), des flavanones (Ye and Huang, 2006) et des dihydroflavonols (Dinda et al., 1994) (Figure 2.10).

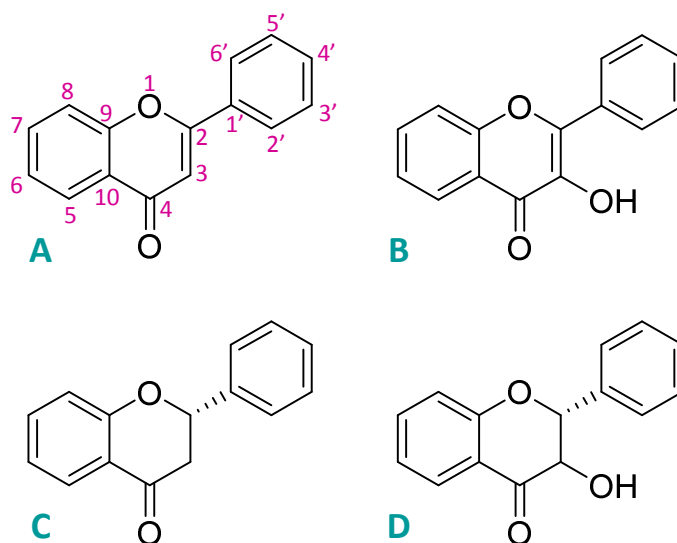


Figure 2.10 : Noyaux de base des différents types de flavonoïdes (A.flavone, B. flavonol, C.flavanone, D. dihydroflavonol)

Dans les travaux cités précédemment, les flavonoïdes sont présents soit sous forme d'aglycones soit sous forme d'hétérosides. En cas de glycosylation, les sucres sont soit en position 3, soit en position 7 (Figure 2.10). La partie osidique est constitué d'un ou deux sucres classiques comme le D-glucose, le L-rhamnose, le D-galactose ou encore le L-arabinose.

5. Activités biologiques

De par sa grande diversité phytochimique, la famille des Plumbaginaceae a été associée à de nombreuses activités biologiques. Les activités citées dans cette partie se rapportent soit à des extraits de plante soit à des molécules isolées à partir de ces extraits.

Des activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires ont été décrites dans la littérature pour plusieurs des genres de cette famille. Certaines de ces études sont référencées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2.2 : Activités anti-oxydante et anti-inflammatoire dans la famille des Plumbaginaceae

Genre	Anti-oxydante	Anti-inflammatoire
<i>Plumbago</i>	<p>Extrait hydro-alcoolique des parties aériennes fraîches de <i>Plumbago europaeae</i> CI₅₀(ABTS)=1,16 mg/mL CI₅₀(DPPH)=1,23 mg/mL (Serrilli et al., 2010)</p> <p>Extrait aqueux des racines de <i>Plumbago zeylanica</i> DPPH=106 µM équivalent trolox FRAP=262 µM équivalent trolox (Tilak et al., 2004)</p>	<p>Diminution d'un facteur 6 de la sécrétion d'IL-2, IL-4, IL-6 et IFNγ dans des lymphocytes (<i>in vivo</i>) par la plumbagine (isolée de <i>Plumbago zeylanica</i>). (Checker et al., 2009)</p> <p>Diminution par deux de l'inflammation due à un œdème induit par des carraghénanes (<i>in vivo</i>) par l'extrait acétonique de <i>Plumbago zeylanica</i> (Sheeja et al., 2010)</p>
<i>Limonium</i>	<p>Extrait acétonique des fleurs de <i>Limonium delicatulum</i> CI₅₀(DPPH) = 2 µg/mL (Medini et al., 2014)</p> <p>Inhibition de la production de ROS intracellulaire par les extraits BuOH, MeOH et cHex de <i>Limonium tetragonum</i> (Lee et al., 2011)</p>	<p>100 % d'inhibition de la synthèse de NO dans des macrophages murins stimulés au LPS par un extrait dichlorométhanique de <i>Limonium densiflorum</i> à 160 µg/mL (Medini et al., 2015)</p>
<i>Limoniasstrum</i>	<p>Activité antioxydante cellulaire d'un extrait aqueux de <i>Limoniasstrum guyonianum</i>. CE₅₀ = 10,03 µg/mL (Krifa et al., 2013)</p> <p>Activité antioxydante d'acides phénoliques aminés issus de <i>Limoniasstrum guyonianum</i> CI₅₀(DPPH) = 0,5 et 0,6 µg/mL (Trabelsi et al., 2014)</p>	<p>38% d'inhibition de la synthèse de NO dans des macrophages murins stimulés au LPS par un extrait méthanolique de <i>Limoniasstrum guyonianum</i> à 100 µg/mL (Krifa et al., 2015)</p>

Des travaux ont aussi été menés sur le pouvoir cicatrisant du genre *Plumbago* (Reddy et al., 2002). Aucune étude n'a été publiée sur cette activité au sein des autres genres de la famille.

Concernant l'activité anti-MMP (MétalloProtéinases Matricielles) et plus particulièrement anti-collagénase et anti-élastase, peu de travaux ont été décrits ; on notera les travaux réalisés sur l'activité anti MMP-9 et MMP-2 inhibées respectivement de 30 et 50% par un extrait dichlorométhanique de *Limonium tetragonum* à 20 µg/mL (Bae et al., 2016).

D'autres activités biologiques ont été reportées, comme l'activité anti-proliférative d'un extrait hydro-alcoolique de racines de *Plumbago rosea* sur des cellules tumorales (Anuf et al., 2014), et l'activité antibactérienne d'extraits d'espèces de *Limonium* sur les genres *Escherichia*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Listeria*, comparable à celle d'un antibiotique, la gentamycine (Medini et al., 2014; Nostro et al., 2012).

6. Cultures *in vitro*

Nous avons souligné l'hétérogénéité botanique au sein de la famille des Plumbaginaceae (Figure 2.2). Ainsi les protocoles de culture *in vitro* sont difficilement transposables d'un genre à un autre.

Néanmoins il est tout de même important de signaler l'existence de travaux sur l'embryogénèse somatique indirecte de l'espèce *Limonium bellidifolium* (Aly et al., 2002a, 2002b). Pour l'étape initiale de callogénèse, les auteurs sont partis de cotylédons issus de plantules axéniques placés sur du milieu minéral MS renfermant du saccharose, du 2,4-D (4,5 µM) et de la kinétine (0,5 µM).

De nombreux travaux sur la culture *in vitro* du genre *Plumbago* ont été publiés avec notamment la mise en place de suspensions cellulaires et de processus d'élicitation pour *P. rosea* (Binoy et al., 2014). Parmi ces travaux, on peut citer ceux de Silja *et al.*, qui ont initié de la callogénèse sur un milieu minéral MS supplémenté en ANA (1 mg/L), 2,4-D (2 mg/L) et BAP (2,5 mg/L), en préalable à l'établissement de suspensions cellulaires (Silja *et al.*, 2014). Ces auteurs ont également réalisé des élicitations avec du méthyl jasmonate et des extraits de levures pour stimuler la production de plumbagine (Figure 2.7 A).

Des travaux de micropropagation par organogénèse indirecte ont également été décrits, notamment pour l'espèce *P. zeylanica* (Rout et al., 1999).

B. L'espèce *Armeria maritima* (Mill.) Willd.

Le genre *Armeria* regroupe entre 80 et 90 espèces selon les classifications (Tison and Foucault, 2014 ; The Angiosperm Phylogeny Group 2016). Les plus connues sont *A. maritima* et *A. alpina* que l'on retrouve dans les Alpes et les Pyrénées, et *A. alliaceae* et *A. arenaria* présentes dans quelques régions de France (Tela Botanica). Le genre *Armeria* est très peu étudié pour les trois aspects qui nous intéressent, à savoir la phytochimie, les activités biologiques et la culture *in vitro*, ce qui constitue un avantage en termes d'originalité potentielle et de possible brevetabilité.

Armeria maritima (Mill.) Willd. possède 3 basionymes : *Armeria maritima* subsp. *planifolia* , *Armeria pubescens*, *Armeria pubigera* subsp. *depilata* et plus de 50 synonymes (Tela Botanica; The Plant List). Ses noms vernaculaires sont « armérie maritime », « oeillet marin », « gazon d'olympé », « gazon d'Espagne » (Tela Botanica). Le nom « armérie » serait dérivé *armor* qui signifie "la mer" en breton.

1. Répartition géographique

La présence d'*A. maritima* a été signalée sur l'ensemble des côtes occidentales françaises (Atlantique et Manche). Elle pousse sur toutes les côtes d'Europe occidentale et boréale (Irlande, Ecosse, Lituanie, Estonie, Russie...) ainsi qu'en Asie boréale et sur les côtes du continent nord-américain (Kumarasamy et al., 2002; Tela Botanica; Germplasm Resources Information Network).

En France, elle est présente sur les pelouses et les falaises du littoral ainsi que dans les marais salants, ce qui est rendu possible par son caractère halophile (Tela Botanica) (Figure 2.11). On peut aussi la retrouver dans les terres, notamment le long des rivières, comme dans l'estuaire de la Vilaine (Claustres and Lemoine, 1977).



Figure 2.11 : Présence d'*A. maritima* sur les pelouses et falaises des littoraux bretons.

(www.pinterest.com)

2. Description botanique

A. maritima est une plante vivace croissant en touffes gazonnantes de 5 à 30 cm de hauteur (Figure 2.12 A). Ses feuilles sont glabres ou pubescentes et modérément charnues. Elles sont linéaires-obtuses, très allongées et fines (quelques millimètres seulement) et possèdent une seule nervure centrale (Figure 2.12 B). La hampe florale dressée est mollement pubescente. A son sommet, la hampe possède une gaine brunâtre d'une dizaine de millimètres plus courte que le capitule ou l'égalant. Ce dernier est dense avec une largeur de 12 à 18 mm (Figure 2.12 C). Les fleurs qui constituent ce capitule sont roses. Elles apparaissent de mai à juin et la période de floraison peut se prolonger jusqu'en septembre. A la base de l'inflorescence, on retrouve un involucre vert ferrugineux à folioles sur 3 ou 4 rangs. Le calice forme un tube égalant le pédicelle (Figure 2.12 C).



Figure 2.12 : Aspects botaniques d'*A. maritima*

(A : touffes gazonnante ; B : feuilles glabres et linéaires ; C : hampe florale dressée ; D: capitule de fleurs roses)

Les racines sont longues et pivotantes, rameuses (Spach, 1841). Les fruits (3,2-3,8 x 1,4-1,8 mm) sont des capsules sèches, enfermés dans un calice hirsute dense et durable. Ils sont déhiscents transversalement. Les graines (2,0-2,2 x 0,8-1,0 mm) sont prolongées ovoïdes, biconvexes, avec un apex acuminé et une nervure latérale. La surface des graines est dense sillonnée, terne et brune, avec l'apex et la base un peu plus sombres (Bojnanský and Fargašová, 2007).

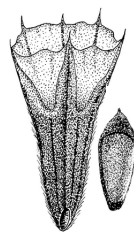


Figure 2.13 : Fruit et graine d'*A. maritima*

(Bojnanský and Fargašová, 2007)

A. maritima est largement reconnue comme plante halophile (Flowers, 1985; Glenn et al., 1999). Des études sur son aptitude à survivre dans un milieu riche en sel ont démontré qu'elle tolère des concentrations allant jusqu'à 200 mM de NaCl (Köhl, 1997b).

Comme cela a été évoqué dans le premier chapitre, les halophytes sont fréquemment caractérisées par une forte résistance aux métaux lourds ; c'est le cas pour *A. maritima* qui résiste par exemple au cadmium, au zinc et au plomb en excréant ces métaux (Neumann et al., 1995; Sruthi et al., 2016).

3. Etudes phytochimiques antérieures

Une seule étude a été menée sur la phytochimie d'*A. maritima*. Elle fait état de la présence de flavonoïdes glycosylés dans des extraits de feuilles (Lauranson et al., 1995). La caractérisation des composés reste cependant partielle en ce qui concerne la partie osidique. En effet, les auteurs ont isolé les molécules puis comparé leur temps de rétention et leur spectre UV à ceux de standards, ce qui est insuffisant pour identifier sans ambiguïté les molécules. Il aurait fallu également comparer le spectre de masse (MS et MS/MS) de ces composés à ceux des standards, ou alors procéder à des analyses RMN. Les molécules caractérisées sont présentées dans le tableau 2.3.

Tableau 2.3 : Ensemble des polyphénols caractérisés dans les travaux de Lauranson et al., 1995

Acide caféique	Dérivés d'acide caféique
Myricétine	Myricétine polyglycoside
	Myricétine diglycoside
	Myricétine monoglycoside
Quercétine	Quercétine polyglycoside
	Quercétine diglycoside
	Quercétine monoglycoside
Kaempférol	Kaempférol monoglycoside

Les molécules mises en évidence sont des dérivés d'acides phénoliques et des flavonols (avec 3 niveaux différents d'oxydation sur le noyau B) (Figure 2.14). Aussi on observe que les

flavonoïdes sont tous présents sous forme hétérosidique, avec un nombre d'oses variable. Les auteurs ont mis en évidence de fortes variations qualitatives et quantitatives de ces molécules dans *A. maritima* en fonction des groupes éco-géographiques, ce qui confirme que l'environnement, la variété, le climat sont des facteurs influençant le métabolisme secondaire.

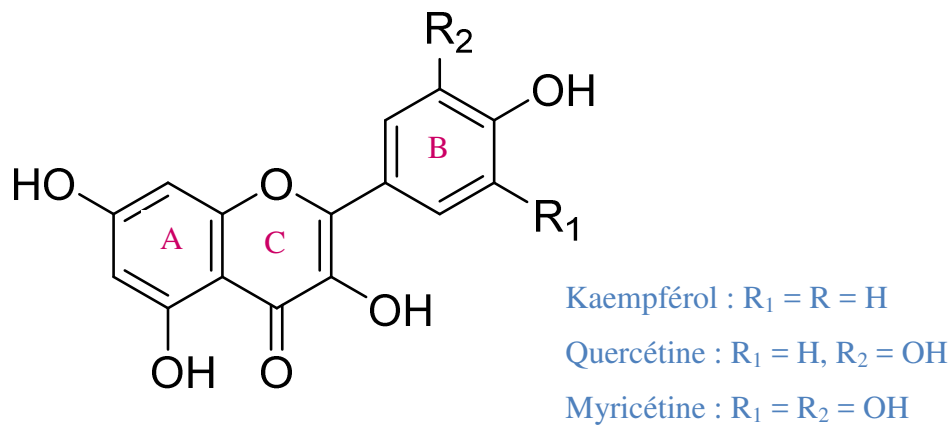


Figure 2.14 : Structure des génines des hétérosides flavoniques de *A. maritima* par Lauranson et al. (1995)

4. Activités biologiques

Seules une étude et une demande de brevet ont été publiées sur l'activité biologique d'*A. maritima*.

L'étude a été réalisée sur le potentiel anti-bactérien de graines d'*A. maritima* (Kumarasamy et al., 2002), dont l'extrait méthanolique a montré une concentration minimale inhibitrice de 50 mg/mL sur *Staphylococcus epidermidis*. L'extrait ne s'est révélé actif sur aucune des autres souches bactériennes testées. L'espèce *S. epidermidis* fait partie du microbiote cutané (Dekio et al., 2005). Ainsi les résultats obtenus dans ces travaux pourraient conduire à des études dermo-cosmétiques plus approfondies.

La demande de brevet publiée s'intitule "*Armeria maritima* plant extracts for use in the treatment or prevention of conditions arising from an impaired skin barrier function" (Laloeuf, 2012). Les revendications de cette demande de brevet concernent l'utilisation d'un extrait aqueux d'*A. maritima* pour le traitement et ou la prévention de la sécheresse et/ou de l'irritation cutanée ainsi que l'inflammation engendrée par une perturbation de la barrière cutanée.

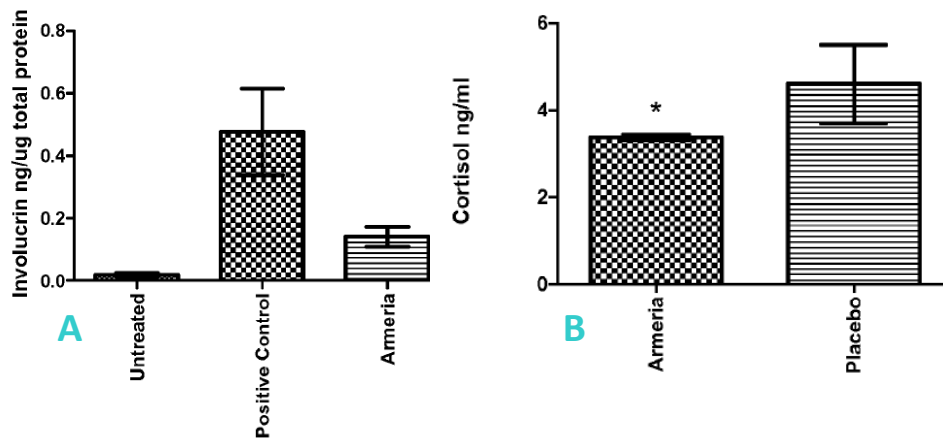


Figure 2.15 : Activités biologiques d'un extrait aqueux d'*A. maritima* présentées dans la demande de brevet EP2722075A1

(A. Evaluation de la synthèse d'involucrine dans des kératinocytes ; B. Evaluation de la production de cortisol dans un modèle d'épiderme reconstruit)

La stimulation de la différenciation des kératinocytes par un extrait aqueux d'*A. maritima* est également décrite. Pour ce faire, la production d'involucrine, marqueur précoce de la différenciation des kératinocytes, a été évaluée (Figure 2.15 A). Les inventeurs basent leur revendication sur la différenciation des kératinocytes par des analyses génomiques réalisées sur des épidermes reconstruits.

Dans le cadre de ce brevet, l'inhibition de la production de cortisol dans un modèle d'épiderme reconstruit a également été étudiée (Figure 2.15 B). Le cortisol est une hormone stéroïdienne pouvant être produite suite à un stress comme par exemple la sécheresse cutanée (Takei et al., 2013). De nombreuses fonctions sont attribuées à cette hormone, elle inhiberait notamment la cicatrisation (Pastar et al., 2014).

5. Cultures *in vitro*

Seulement deux études ont été publiées sur la culture *in vitro* d'*A. maritima* : l'une sur l'embryogénèse somatique (Aly et al., 2002a) et l'autre sur l'organogénèse indirecte (Brewin et al., 2003). Dans les deux cas, les auteurs ont utilisé des parties de plantules axéniques comme source d'explants, ils décrivent donc également des protocoles de germination *in vitro* utilisés pour leur étude (Tableau 2.4).

Tableau 2.4 : Synthèse des protocoles de germination *in vitro* de graines d'*A. maritima* décrits dans la littérature

Référence	Stérilisation	Milieu de culture	Conditions
Aly et al., 2002a	- 30s dans EtOH 70% - 10min dans de l'eau de Javel commerciale (10% chlore actif) - 5 rinçages dans l'eau distillée	- MS 1/2 - saccharose 15 g/L	- 5 j à la lumière
Brewin et al., 2003	- 5 min dans Domestos 30 % - 3 rinçages dans l'eau distillée	- MS - saccharose 30 g/L	-14 j à l'obscurité , 20°C -21 j à la lumière (60 $\mu\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$) , 20°C

Dans les deux cas, les graines sont stérilisées par de l'hypochlorite de sodium puis mises en culture sur un milieu minéral plus ou moins riche, supplémenté en saccharose. On constate par contre que les conditions de germination (durée, température, luminosité) sont totalement différentes dans ces deux études alors que ce sont des facteurs très influents pour la germination. Aucun pourcentage de germination n'a été cité dans ces deux publications.

Tableau 2.5 : Synthèse des protocoles de callogénèse d'*A. maritima* décrits dans la littérature

Référence	Nature des explants	Milieu de callogénèse	% de callogénèse
Aly et al., 2002a	Cotylédons issus de plantules axéniques	- MS - Vit B5 - Saccharose 30 g/L - 2,4-D 4,5 μM - Kinétine 0,93 μM	28 %
Brewin et al., 2003	Feuilles issues de plantules axéniques	- MS - Saccharose 30 g/L - NAA 5,3 μM - BAP 0,4 μM	74 %

Aly et al. (2002a) ont obtenu 28% d'induction de callogénèse (Tableau 2.5). Ils ne mentionnent pas d'écart-type, nous n'avons donc pas d'idée sur l'homogénéité des résultats. A noter que les auteurs ont obtenu des pourcentages d'induction bien plus importants pour le genre *Limonium* (jusqu'à 79% de callogénèse pour *L. sinuatum*).

Quant à Brewin et al. (2003), la finalité de l'étude n'est pas l'obtention de vitroplants mais des analyses sur les mécanismes de tolérance aux métaux lourds d'*A. maritima*. Le plus fort taux de callogénèse obtenu est de 74 % (Tableau 2.5), mais il faut noter le fort taux de racines formées en parallèle au phénomène de callogénèse.

C. Conclusion de l'étude bibliographique d'*A. maritima*

L'étude bibliographique des Plumbaginaceae et de l'espèce *Armeria maritima* montre le potentiel de cette espèce dans le cadre de la recherche de molécules bioactives et plus particulièrement de polyphénols. De plus, le **faible nombre de travaux réalisés** sur cette espèce dans les domaines de la pharmacognosie et des biotechnologies végétales confirme le **caractère original** de notre étude.

II. Investigation phytochimique des parties aériennes d'*A. maritima*

Une investigation phytochimique a été réalisée sur les parties aériennes d'*A. maritima* dans l'objectif d'identifier les métabolites secondaires majoritaires pour ensuite évaluer leurs effets biologiques.

A. Stratégie d'extraction et de purification des composés

1. Extractions

Des essais préliminaires ont été réalisés pour comparer une extraction solide-liquide hydro-alcoolique suivie de partages liquide/liquide avec des solvants organiques *versus* une série d'extractions solide-liquide avec des solvants organiques de polarité croissante. Les profils chromatographiques semblaient peu différents, nous avons choisi de faire une extraction hydro-alcoolique (extrait AmE, 170 g) suivie de partages liquide/liquide (eau/solvant organique) (Figure 2.16). Les extraits suivants ont ainsi été obtenus : AmC (cHex), AmD (CH_2Cl_2), AmA (AcOEt), AmB (BuOH), AmO (phase aqueuse résiduelle).

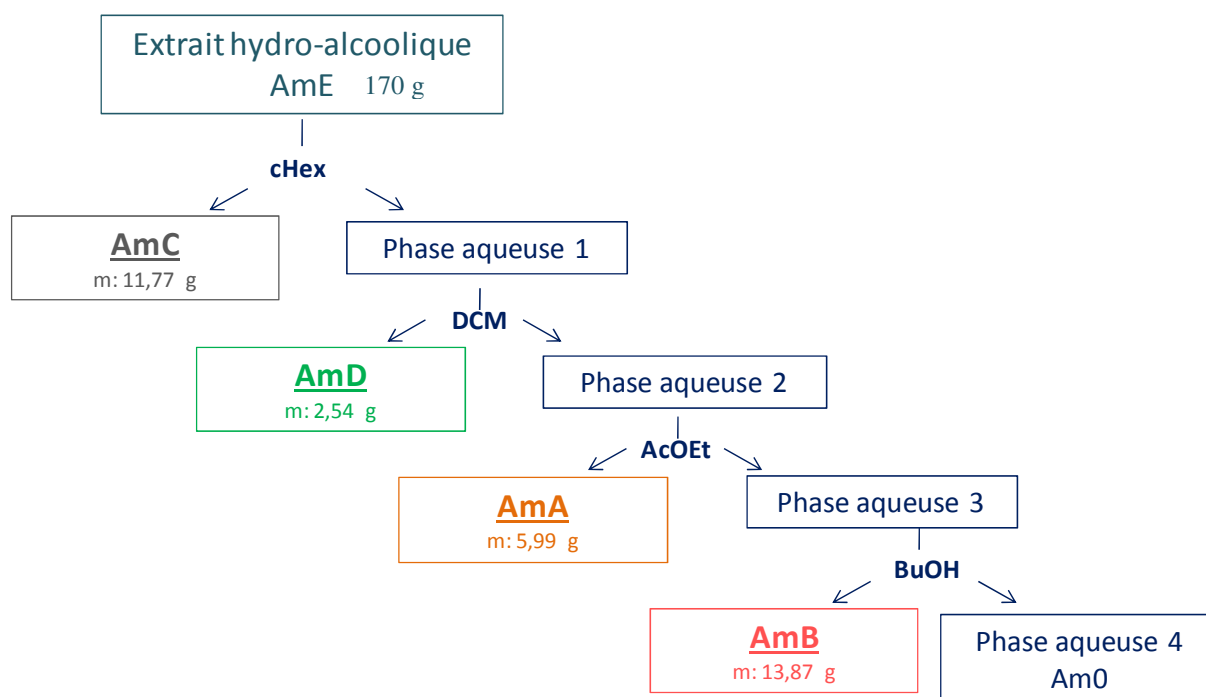


Figure 2.16 : Schéma d'obtention des extraits par partage liquide/liquide

Les profils chromatographiques obtenus par HPLC-DAD sont présentés dans la Figure 2.17.

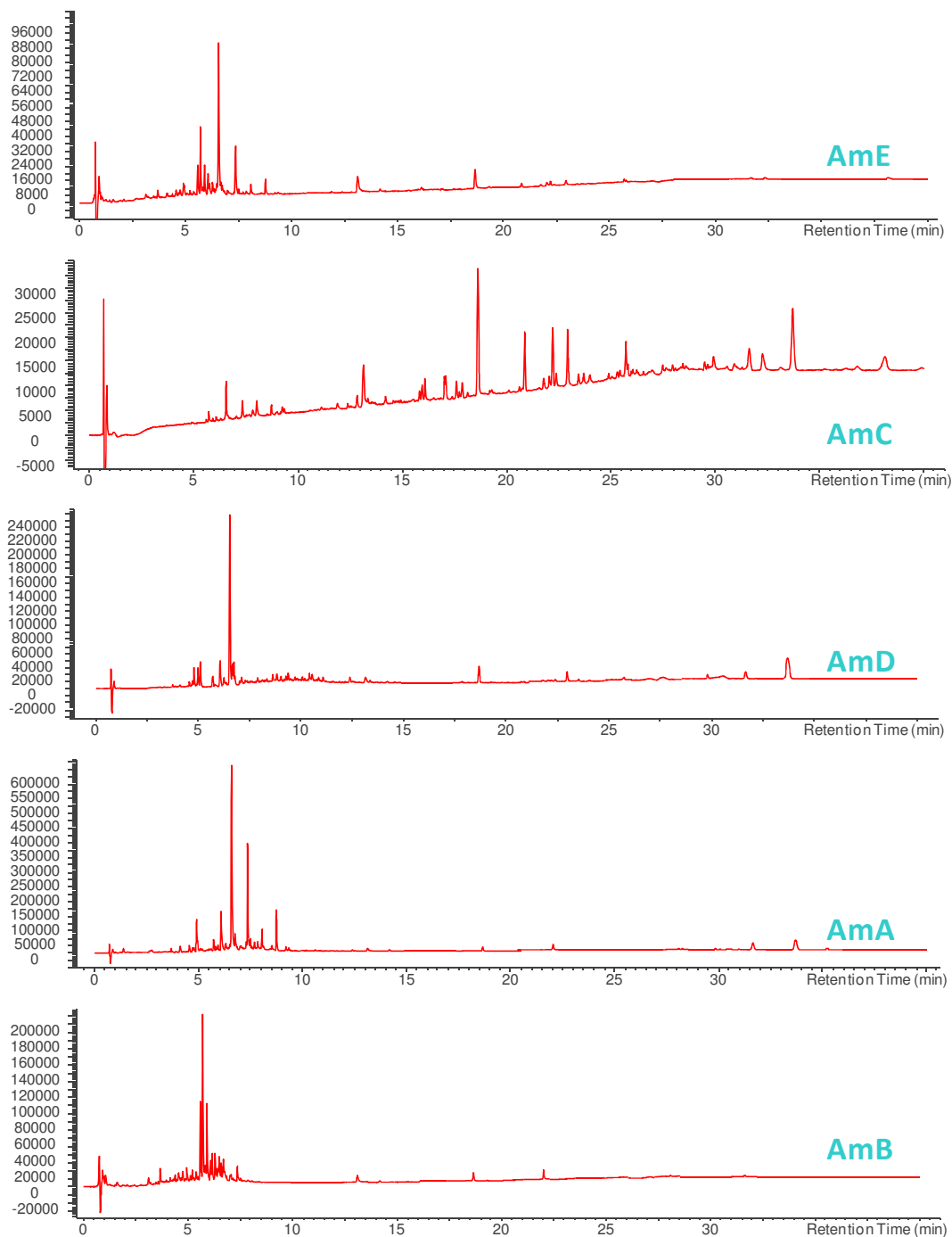


Figure 2.17 : Profils HPLC (TAC) des extraits obtenus après partage liquide/liquide, (AmE : extrait brut, AmC : fraction cHex, AmD : fraction DCM, AmA : fraction AcOEt, AmB : fraction BuOH) gradient n°1

Les profils chromatographiques obtenus par CCM ont montré une teneur élevée en polyphénols dans les fractions AmA (extrait AcOEt) et AmB (extrait BuOH) (Figure 2.18).

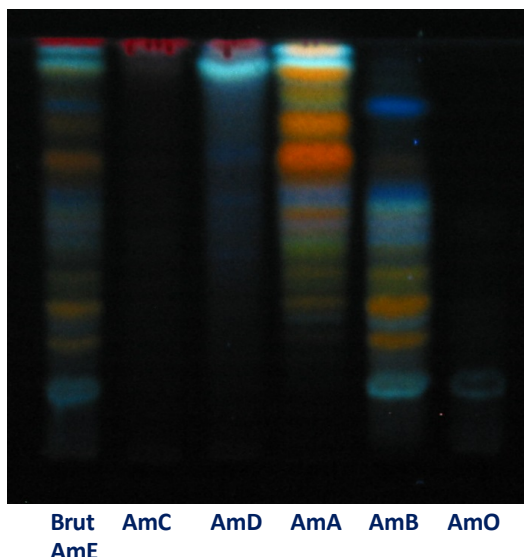


Figure 2.18 : Profil chromatographique des extraits.

(Phase mobile : AcOEt/Ac. formique / Ac. acétique / eau 100:11:11:26, révélation au Neu-PEG, observation à 365 nm)

Nous avons donc prioritairement travaillé sur ces deux fractions riches en polyphénols, et sur la fraction AmD pour laquelle des résultats d'activités biologiques intéressants ont été obtenus.

2. Fractionnement de l'extrait AmB

L'extrait AmB a été fractionné par VLC (chromatographie liquide sous vide), sur de la phase stationnaire C18. L'utilisation d'une phase normale aurait engendrée des adsorptions irréversibles des polyphénols sur la silice, générant ainsi des pertes de masse trop importantes. A l'issue de cette VLC, nous avons obtenu 12 fractions (Figure 2.19).

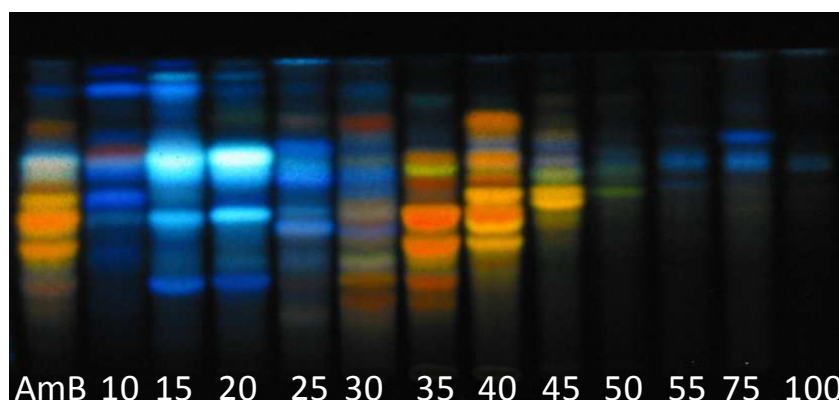


Figure 2.19 : Profil chromatographique des fractions de VLC de l'extrait AmB.

(Phase mobile : AcOEt/Ac. formique / Ac. acétique / eau 100:11:11:26, révélation au Neu-PEG, observation à 365 nm)

Les masses des fractions obtenues sont présentées dans le Tableau 2.6. On constate que les fractions les plus importantes sont AmB35 et AmB40 qui contiennent des flavonoïdes.

Tableau 2.6 : Masses des fractions d'AmB obtenues après VLC sur C18

Fraction	Masse (mg)	Fraction	Masse (mg)
AmB15	215,8	AmB45	147,3
AmB20	248,2	AmB50	58,4
AmB25	298,9	AmB55	38,7
AmB30	206,3	AmB75	51,5
AmB35	711,6	AmB100	20
AmB40	449,4		

La VLC a permis de séparer les acides phénoliques qui fluorescent en bleu dans les fractions AmB10 à AmB25, et des flavonoïdes en orange dans les fractions AmB35 à AmB45. Les molécules majoritaires de ces fractions ont été purifiées par HPLC semi-préparative, et codées de **B1 à B11** (Figure 2.20 2.21).

Les fractions AmB20 et AmB25 présentant des profils complexes en HPLC, celles-ci ont été rassemblées puis re-fractionnées par chromatographie d'exclusion (Sephadex LH20).

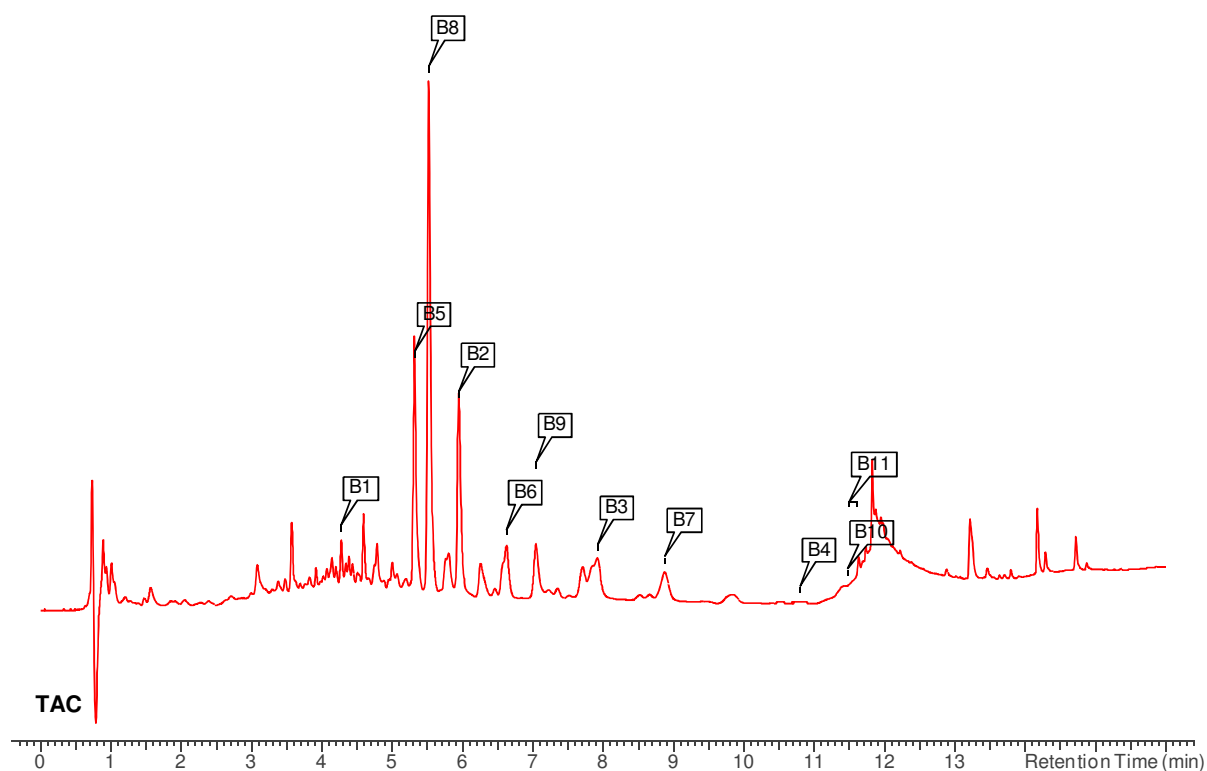


Figure 2.20 : Chromatogramme HPLC de la fraction AmB avec les molécules isolées (B1 à B11) gradient n°2

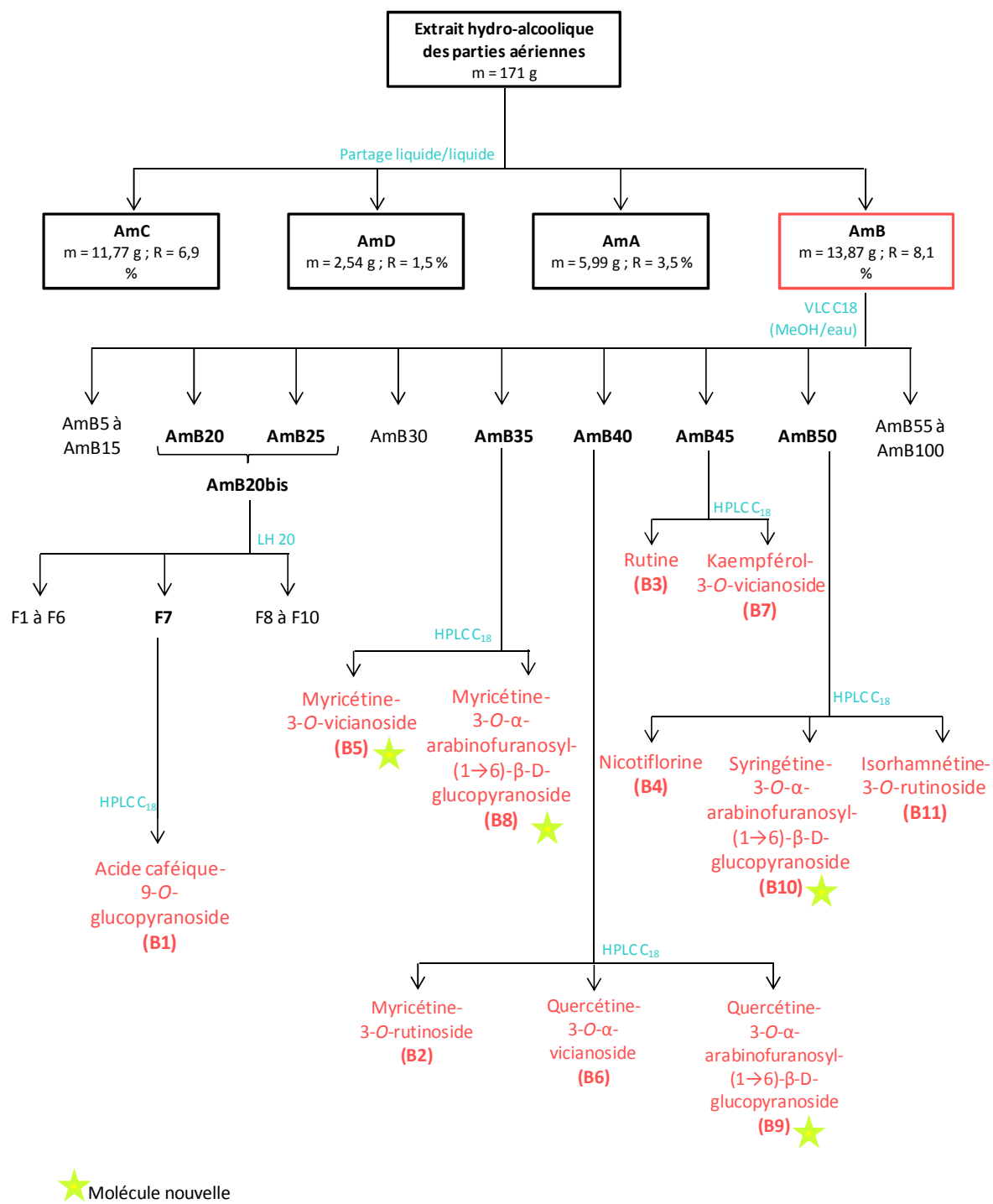


Figure 2.21 Schéma de purification des composés B de l'extrait butanolique d'*A. maritima* (AmB)

3. Fractionnement de l'extrait AmA

L'extrait AmA (5,99 g) a été travaillé exactement de la même manière que l'extrait AmB, c'est-à-dire par fractionnement sur VLC (Figure 2.22), puis éventuellement une étape de fractionnement sur Sephadex avant des purifications en HPLC semi-préparative.

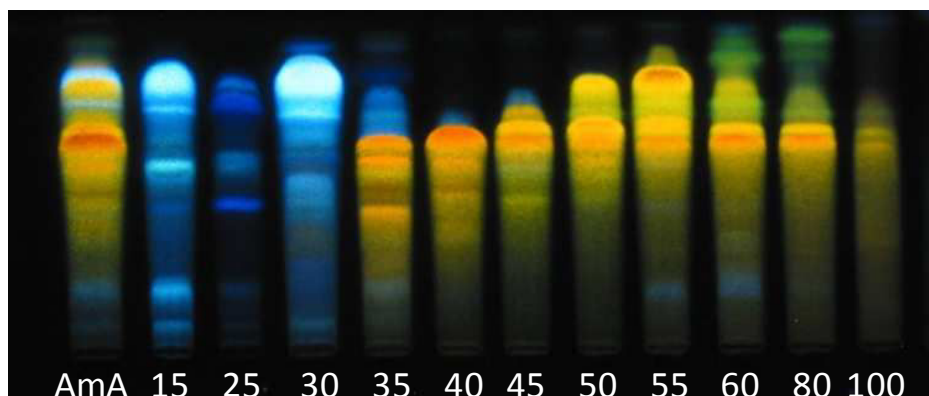


Figure 2.22 : Profil chromatographique des fractions de VLC de l'extrait AmA.
(Phase mobile : AcOEt/MeOH/eau 100:17:13, révélation au Neu-PEG, observation à 365 nm)

Comme pour AmB, la VLC a permis une nette séparation des flavonoïdes et des acides phénoliques. Elle s'est révélée moins efficace dans la séparation des flavonoïdes ; on observe notamment une traînée du composé majoritaire dans les fractions AmA35 à AmA100, bien que celui-ci soit essentiellement présent dans la fraction AmA40 comme nous le montre le bilan massique des fractions (Tableau 2.7).

Tableau 2.7 : Masses des fractions d'AmA obtenues après VLC

Fraction	Masse (mg)	Fraction	Masse (mg)
AmA15	168,9	AmA50	181
AmA25	120,5	AmA55	126
AmA30	152,8	AmA60	44,4
AmA35	209,6	AmA80	45,4
AmA40	609,9	AmA100	35,3
AmA45	420,1		

Les fractions AmA15 à AmA30 présentait des profils HPLC complexes. Elles ont été rassemblées puis re-fractionnées par chromatographie d'exclusion (Sephadex LH20). AmA40 présentant une insolubilité dans le mélange MeOH/eau utilisé pour l'injection en HPLC semi-préparative, cette fraction a été au préalable fractionnée sur Sephadex LH20.

Les molécules majoritaires de ces fractions ont été purifiées par HPLC semi-préparative. Elles ont été nommées de **A1** à **A12** (Figure 2.23 2.24).

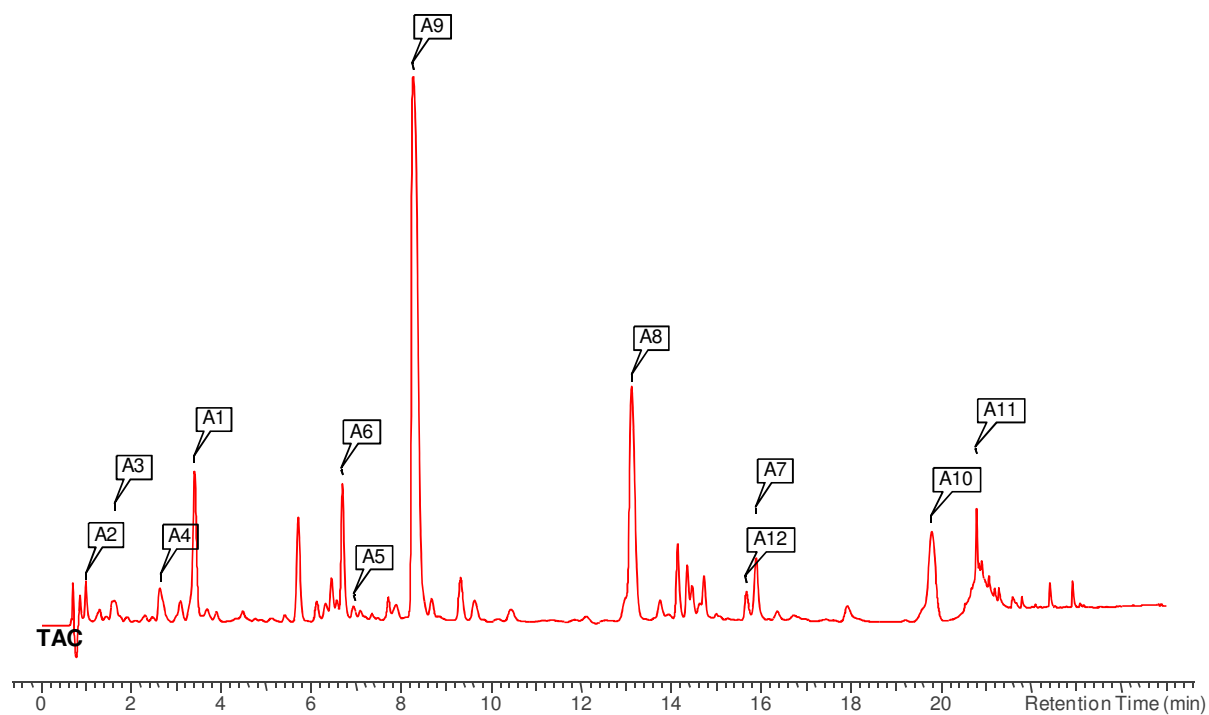


Figure 2.23 : Chromatogramme HPLC de la fraction AmA avec les molécules isolées (A1 à A12) gradient n°3

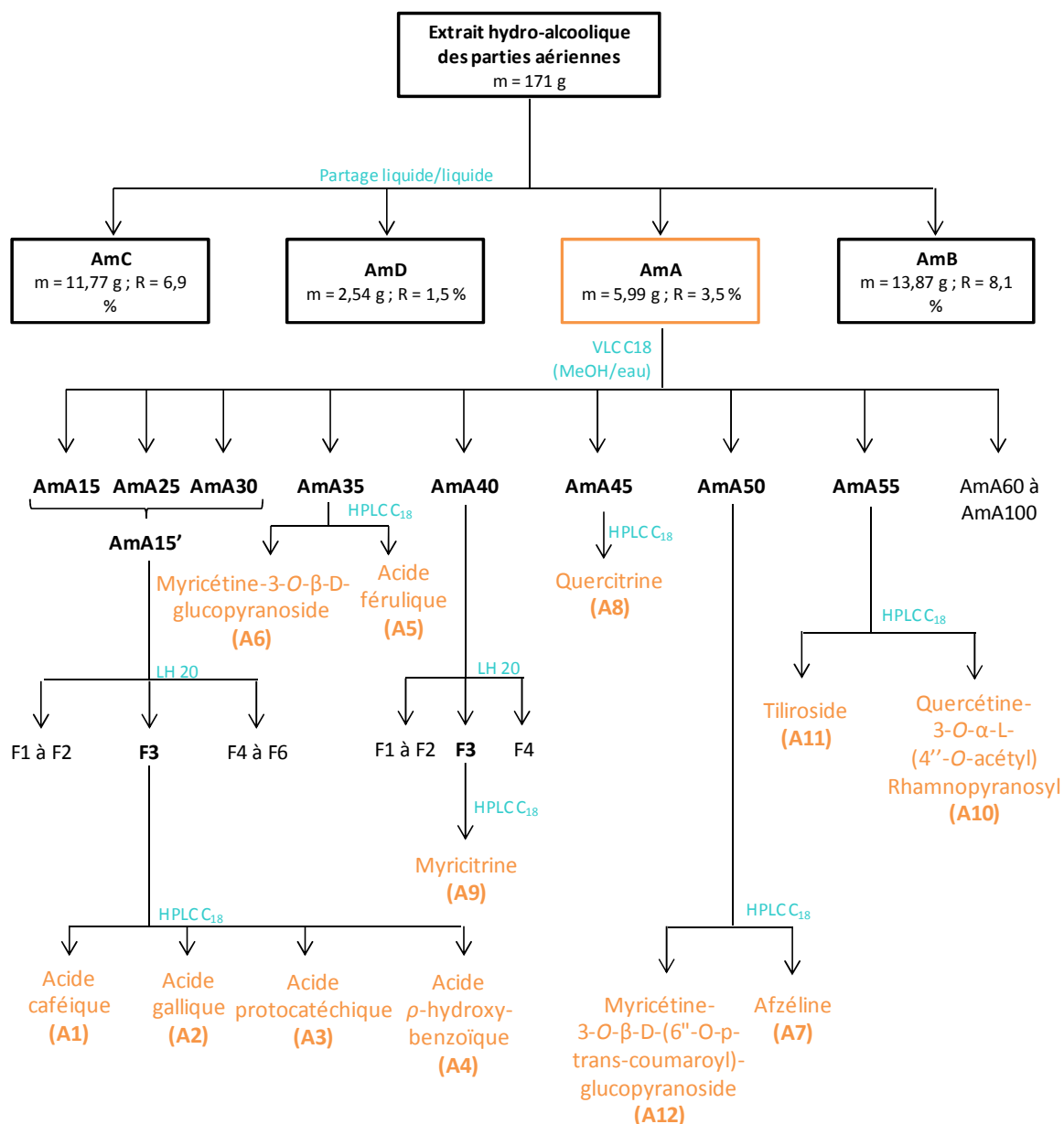


Figure 2.24 Schéma de purification des composés A de l'extrait AcOEt d'*A. maritima* (AmA)

4. Fractionnement de l'extrait AmD

L'extrait AmD était le moins important avec une masse de 2,54 g. 2g ont été fractionnés par VLC sur de la silice pour obtenir 18 fractions (Figure 2.25).

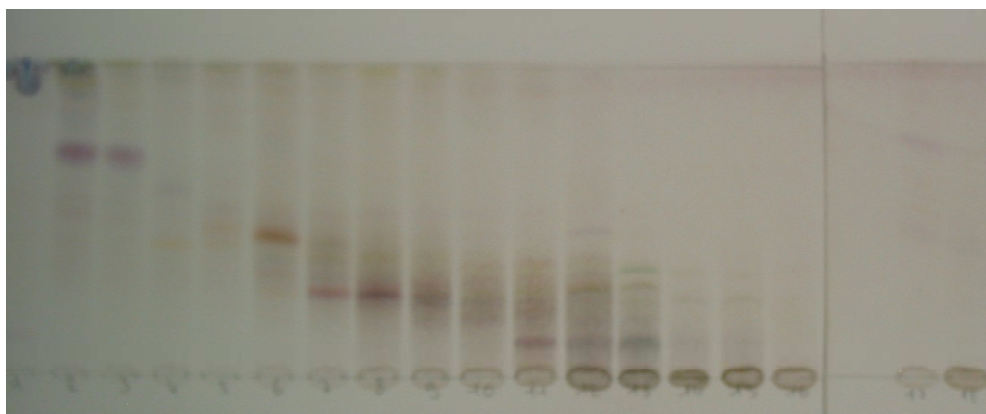


Figure 2.25 : Profil chromatographique des fractions de VLC de l'extrait AmD.
(Phase mobile : chloroforme/MeOH 94:6 , révélation à la vanilline sulfurique, observation dans le visible)

Tableau 2.8 Masses des fractions d'AmD obtenues après VLC

Fraction	Masse (mg)	Fraction	Masse (mg)
AmD1	153	AmD10	72
AmD2	307	AmD11	73
AmD3	68	AmD12	104
AmD4	68	AmD13	198
AmD5	101	AmD14	155
AmD6	87	AmD15	138
AmD7	102	AmD16	73
AmD8	109	AmD17	42
AmD9	78	AmD18	32

Certaines de ses fractions ont ensuite été purifiées en HPLC semi-préparative pour obtenir les composés majoritaires nommés de **D1 à D8**. (Figure 2.26)

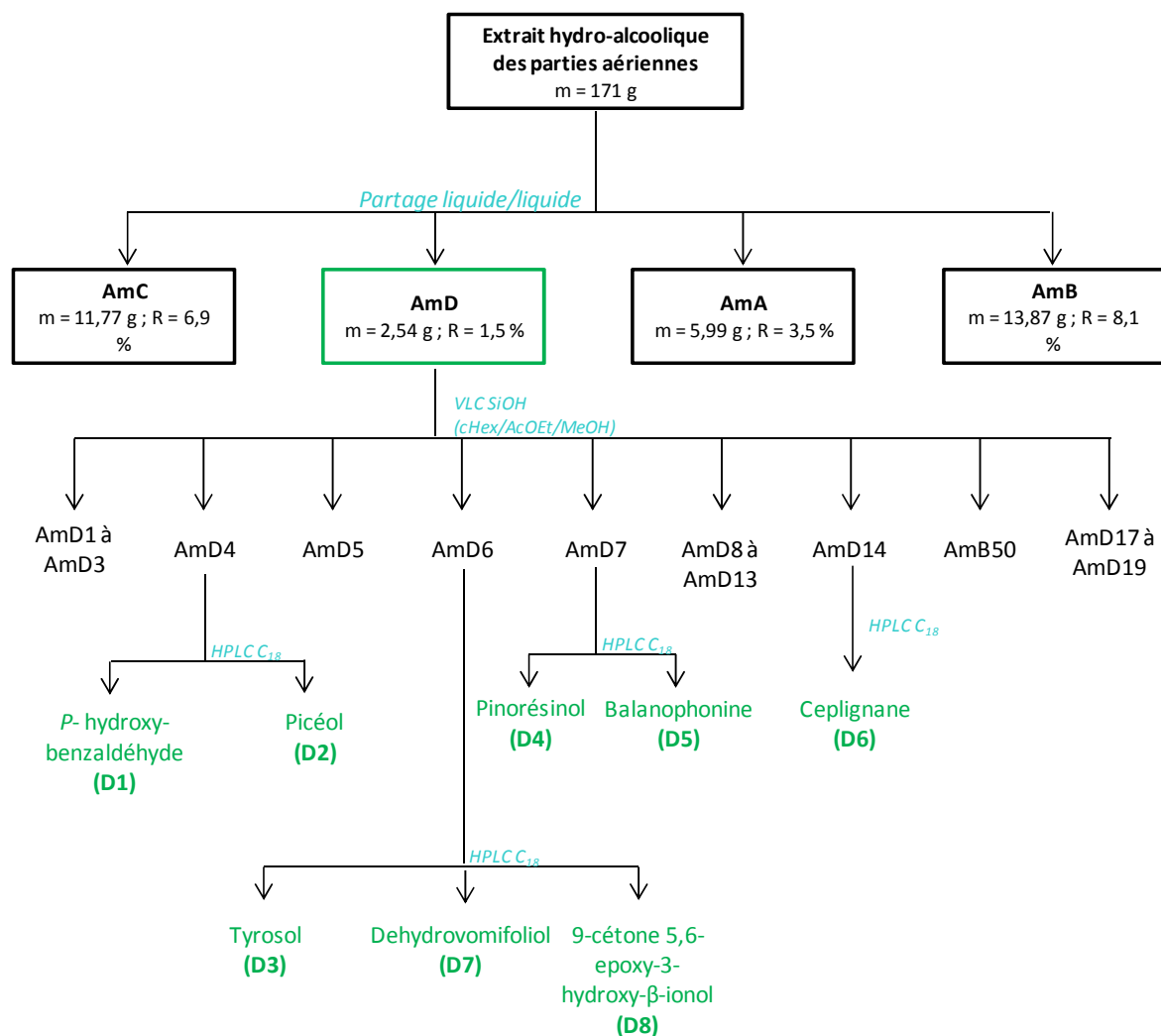


Figure 2.26 : Schéma de purification des composés D de l'extrait dichlorométhanique d'*A. maritima* (AmD)

B. Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes

Ces dosages ont été réalisés par la méthode de Folin-Ciocalteu pour les polyphénols totaux, et par la méthode de dosage à l' AlCl_3 pour les flavonoïdes totaux. Ces dosages concernent uniquement les extraits pour lesquels les études phytochimiques ont montré une grande richesse en polyphénols, soit AmB et AmA ainsi que l'extrait brut AmE.

❖ Méthode de Folin-Ciocalteu

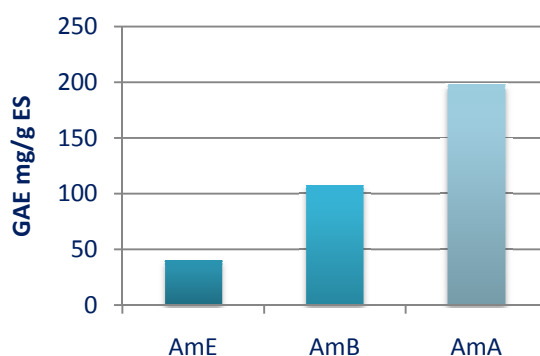


Figure 2.27 : Evaluation de la teneur en polyphénols par la méthode de Folin-Ciocalteu

Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique (GAE) par g d'extrait sec. Les extraits AmA et AmB sont enrichis en polyphénols, puisque l'extrait brut (AmE) contient 40 mg GAE / g d'extrait sec contre 107 mg/g pour AmB et 198 mg/g pour AmA. On a 2,6 fois plus de polyphénols pour AmB et 5 fois plus pour AmA par rapport à l'extrait brut.

En comparaison avec d'autres extraits hydro-alcooliques d'halophytes de la littérature, les teneurs en polyphénols sont respectivement de : 16, 31 et 32 mg/g d'extrait hydroalcoolique séché pour *Eryngium maritimum*, *Crithmum maritimum* et *Cakile maritima* (Meot-Duros et al., 2008). Ainsi l'extrait brut *A. maritima* (AmE) contient 2,5 fois plus de polyphénols qu'*Eryngium maritimum* mais il est dans le même ordre de grandeur que les deux autres halophytes.

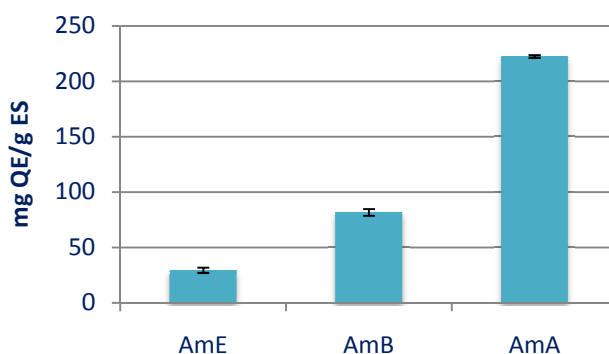
❖ **Dosage des flavonoïdes totaux**

Figure 2.28 : Evaluation de la teneur en flavonoïdes par la méthode de dosage à l' AlCl_3

Les résultats sont exprimés en mg de quercétine par g d'extrait sec. Les extraits AmA et AmB sont enrichis en flavonoïdes, puisqu'AmE en contient 29 mg / g d'extrait sec contre 82 mg/g pour AmB et 222 mg/g pour AmA. On a 2,8 fois plus de flavonoïdes dans AmB et 7,6 fois plus dans AmA que dans l'extrait brut. Ce dosage confirme les résultats obtenus dans l'analyse phytochimique, qui a mis en évidence plusieurs flavonoïdes dans les extraits AmA et AmB (cf § II.C.2).

C. Détermination structurale des molécules isolées

Nous avons identifié 4 classes principales de molécules dans *A. maritima*, des acides phénoliques et phénols simples, des hétérosides de flavonols, des lignanes et des megastigmanes. Les molécules isolées seront présentées selon leur appartenance à ces classes.

Pour rappel, les composés codés A proviennent de la fraction AmA, B d'AmB et D d'AmD.

1. Phénols & acides phénoliques

a. Biosynthèse

Les phénols et acides phénols sont synthétisés *via* la voie du shikimate (Bruneton, 2009). Seules les grandes étapes seront présentées ici par souci de concision.

La première étape est le couplage du phosphoénolpyruvate (PEP), qui vient de la glycolyse, au D-érythrose-4-phosphate provenant du cycle des pentoses phosphates. Ce couplage donne naissance au DAHP (acide-3-déoxy-D-arabino-heptulosonic-phosphate) (Dewick, 2009).

L'obtention des acides phénoliques les plus simples comme les **acides gallique et protocatéchuic** fait ensuite intervenir différentes enzymes pour donner l'acide 3-déhydroshikimique (Figure 2.29).

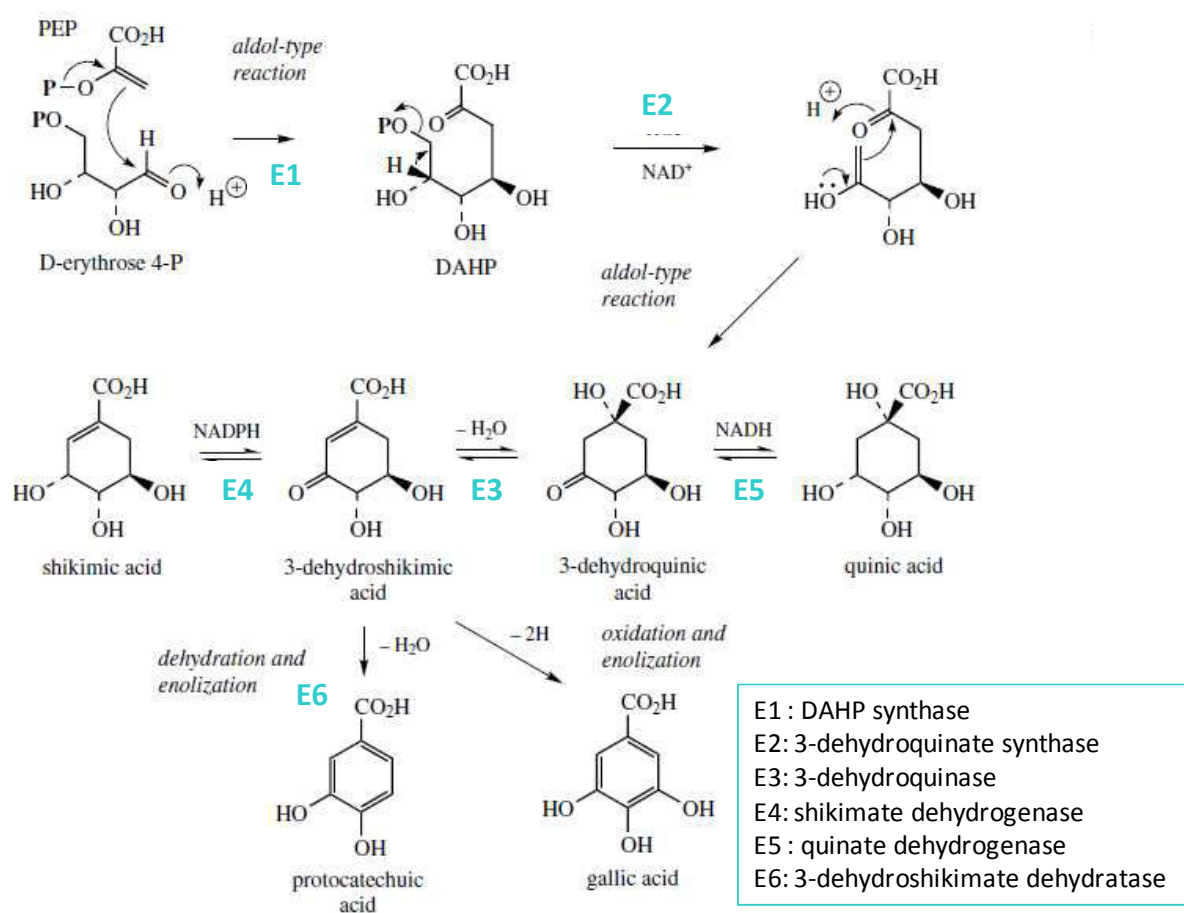


Figure 2.29 : Résumé des premières étapes de la voie du shikimate jusqu'à l'obtention des acides phénoliques les plus simples (Dewick, 2009)

Le shikimate est ensuite converti en chorismate grâce à l'intervention de trois enzymes (shikimate kinase, EPSP synthase et chorismate synthase). L'acide chorismique peut ensuite entrer dans plusieurs voies de biosynthèses (Figure 2.30). Les phénylpropanoïdes qui sont des dérivés cinnamiques (comme l'**acide caféique**) sont synthétisés à partir de la phénylalanine.

Différentes hydroxylations et méthylations peuvent ensuite intervenir. Par exemple, une méthyltransférase catalyse la transformation de l'acide caféique en **acide férulique** en présence de S-adénosylméthionine.

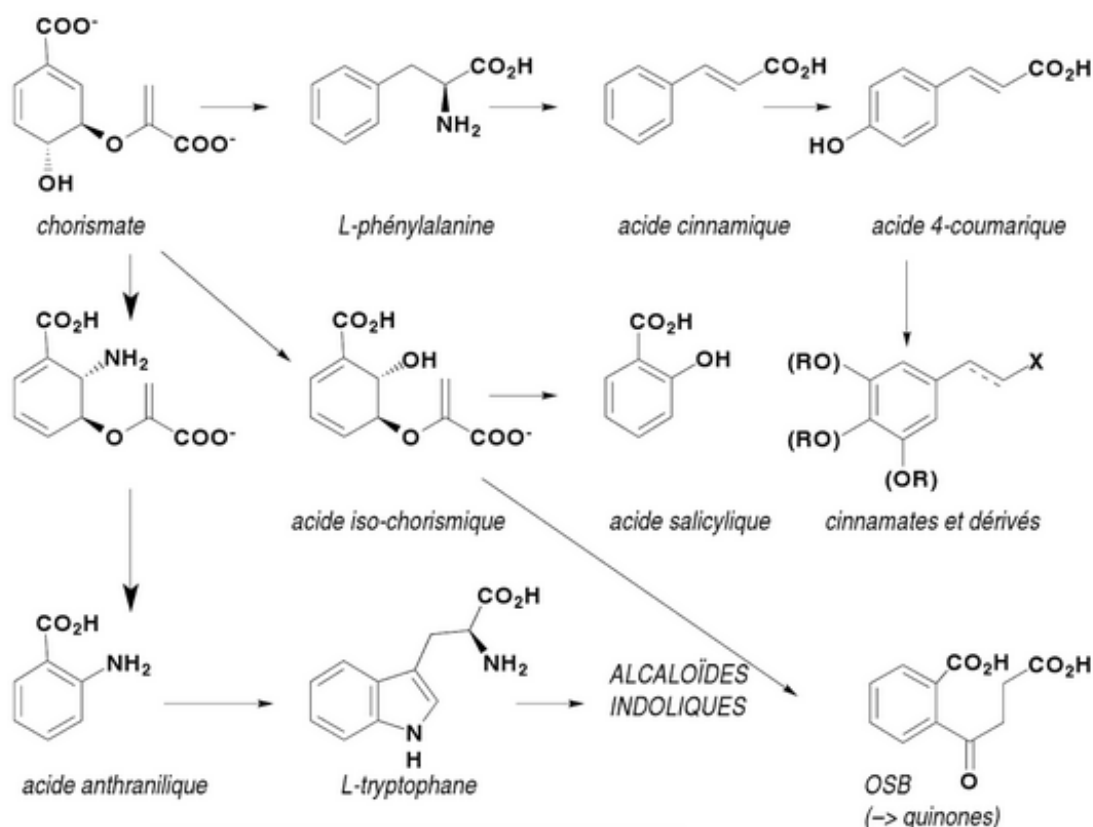


Figure 2.30 : Les différentes voies de biosynthèses à partir de l'acide chorismique

(Bruneton, 2009)

L'acide 4-coumarique peut être converti en ***p*-hydroxybenzaldéhyde** par l'intervention successive de trois enzymes que sont la CoA ligase, l'enyol-CoA hydratase et une enoyl-CoA hydratase/lyase, ou plus simplement en deux étapes (déshydratation puis aldolisation inverse).

L'**hydroxyphényléthanol** et les **acétophénone**s dérivent également de la phénylalanine (Dong et al., 2012; Hirata et al., 2012).

b. Elucidation structurale

❖ Détermination structurale du composé A1

Le spectre UV indique trois maxima à λ 217, 239 et 323 nm, caractéristiques des acides cinnamiques (Holser, 2012).

L'analyse HRMS de **A1** conduit à l'identification de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 181,0387 et l'adduit sodium $[M+Na]^+$ à m/z 203,0308, ce qui correspond à une formule brute de $C_9H_8O_4$. D'après le DNP (Dictionary of Natural Products), il pourrait s'agir d'un acide cinnamique.

Le spectre 1H RMN indique la présence de deux protons éthyléniques résonnant à δ 6,23 (br d, $J= 15.8$ Hz, H8), 7,50 (br d, $J= 15.8$ Hz, H7) ppm. La constante de couplage de 15,8 Hz est caractéristique de deux protons *trans* d'une double liaison de configuration *E*. On observe trois protons dans la zone des aromatiques à δ ppm 6,77 (d, $J= 8.2$ Hz, H5), 6,93 (dd, $J= 8.2, 16=1.5$ Hz, H6), 7,03 (d, $J= 1.5$ Hz, H2). Les valeurs des constantes de couplage indiquent que ces protons forment un système ABX et sont positionnés de façon *ortho* et *mé*ta sur le cycle benzénique trisubstitué. En comparant les données avec la littérature, le composé **A1** a été identifié comme étant l'**acide *trans*-caféique** (Gerothanassis et al., 1998) (Figure 2.31).

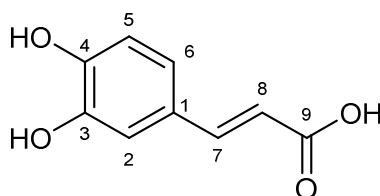


Figure 2.31 : Acide *trans*-caféique (A1)

De nombreuses propriétés biologiques ont été attribuées à l'acide caféique notamment un effet anti-oxydant (Chen and Ho, 1997) et anti-inflammatoire (Chao et al., 2009).

❖ Détermination structurale du composé **A5**

Le spectre UV de **A5** est identique à celui de **A1** (λ_{max} de 219, 240, 324 nm).

L'analyse HRMS conduit à une formule brute en $C_{10}H_{10}O_4$ pour **A5** ($[M+H]^+$ m/z 195,0651 m/z et $[M+Na]^+$ m/z 217,072).

Le spectre RMN 1H est similaire à celui de l'acide *E*-caféique avec les trois protons aromatiques ABX résonnant à δ ppm 6,80 (d, $J= 8.3$ Hz, H5), 7,04 (dd, $J= 8.3$ Hz, 1.8 Hz, H6) et 7,17 (d, $J= 1.8$ Hz, H2) et deux protons éthyléniques *trans* à δ ppm 6.32 (d, 15.9 Hz) et 7.53 (d, 15.9 Hz). Un signal supplémentaire sous forme d'un singulet de 3H est détecté à δ ppm 3,89, celui-ci correspond à un méthoxy. Un effet NOE est observé entre ce méthoxy et H2, confirmant sa position en C3.

En comparant ces données avec la bibliographie (Verpoorte et al., 2007), le composé **A5** a été identifié comme étant l'**acide *trans*-férulique**.

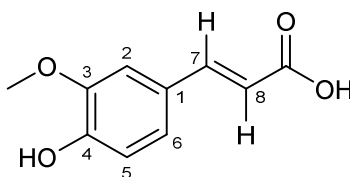


Figure 2.32 : Acide *trans*-férulique (A5)

Cette molécule possède un effet anti-oxydant (Kanski et al., 2002) et anti-inflammatoire (Ou and Kwok, 2004).

❖ Détermination structurale du composé **B1**

Le spectre UV de **B1** est caractéristique d'un dérivé d'acide cinnamique (λ_{max} de 218, 241, 329 avec un épaulement à 303 nm).

L'analyse HRMS conduit à l'identification de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 343,1017, d'où une formule brute en $C_{15}H_{18}O_9$. On observe également deux fragments à m/z 181 et 163 qui suggèrent la présence d'un acide cinnamique et d'un hexose. En accord avec le DNP, il pourrait ainsi s'agir d'un glycoside d'acide caféique.

Cette hypothèse est validée par le spectre RMN 1H . En effet, comme dans l'acide caféique, on retrouve deux protons éthyléniques *trans* δ ppm 6.31 (d, $J=15.9$ Hz, H8) et 7.66 (1 H, d, $J=15.9$ Hz, H7), et trois protons aromatiques à δ ppm 6.79 (d, $J=8.2$ Hz, H5), 6.97 (dd, $J=8.2, 1.8$ Hz, H6), 7.06 (d, $J=1.8$ Hz, H2).

On observe également un proton anomérique à δ ppm 5.57 (1 H, d, $J=7.9$ Hz, H1'). Le spectre HMBC montre une corrélation entre ce proton anomérique et un carbonyle à 167,9 qui correspond au C9 de l'acide caféique.

L'analyse du spectre COSY permet d'identifier six autres protons osidiques : un massif de quatre protons à δ 3.39 - 3.45 ppm (H4',H2',H5', H3'), la partie AM d'un système AMX à 3.70 ppm (1 H, dd, $J=12.1, 4.7$ Hz, H6'a), 3.85 ppm (1 H, dd, $J=12.1, 1.7$ Hz, H6'b). Le spectre HSQC permet d'attribuer les carbones osidiques.

La comparaison des déplacements chimiques des carbones osidiques avec ceux de la littérature (Agrawal, 1992), nous permet d'identifier un β -D-glucopyranose.

Le composé **B1** est identifié comme étant le **1'-O-E-caféoyl-β-D-glucopyranose** (Figure 2.33).

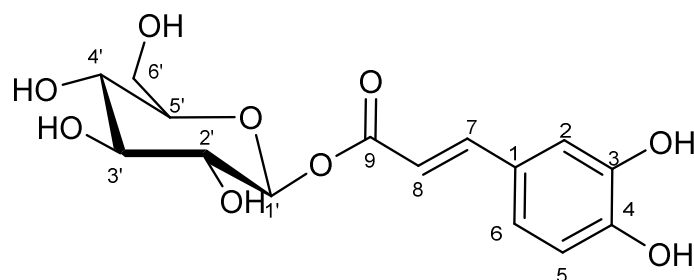


Figure 2.33 : 1'-O-E-caféoyl-β-D-glucopyranose (B1)

Cette molécule a déjà été identifiée dans la groseille (Mäkilä et al., 2016) ou encore dans *Lagerstroemia speciosa* (Choi et al., 2015). Les activités anti-oxydante et anti-inflammatoire de ce composé ont été évaluées mais sans résultats probants (Park et al., 2013).

❖ Détermination structurale du composé A2

Le spectre UV de **A2** montre des maxima à λ 215 et 271 nm, caractéristiques des acides phénoliques (Chanwitheesuk et al., 2007).

L'analyse par HRMS conduit à l'identification de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 171,0290 et de l'adduit sodium à m/z 193,0108 ($[M+Na]^+$), analysés pour la formule brute $C_7H_6O_5$. D'après le DNP il pourrait s'agir d'un acide trihydroxybenzoïque.

Son spectre RMN 1H indique la présence de deux protons aromatiques équivalents résonnant à 7,08 ppm (s, H2, H6). En comparant ces données avec la littérature (Korul'kina, 2004), ce composé a été identifié comme étant l'**acide gallique** (Figure 2.34).

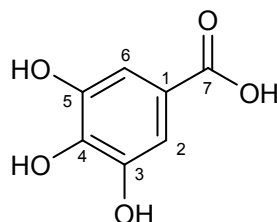


Figure 2.34 : Acide gallique (A2)

De nombreuses propriétés biologiques ont été attribuées à l'acide gallique notamment un effet anti-inflammatoire (Kim et al., 2006; Kroes et al., 1992) et un effet inhibiteur de la collagénase (Nguyen et al., 2013).

❖ Détermination structurale du composé A3

L'analyse HRMS de **A3** conduit à l'identification de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 155,0335 ($[M+Na]^+$ à m/z 177,0157), ce qui correspond à une formule brute en $C_7H_6O_4$. D'après le DNP il pourrait s'agir d'un acide dihydroxybenzoïque.

Le spectre UV indique trois maxima à λ 204, 259 et 294 nm, suggérant celui de l'acide protocatéchique (Cen et al., 2016).

Son spectre RMN 1H confirme cette hypothèse avec trois protons aromatiques (système ABX, *ortho* et *meta*) à δ ppm 6,78 (d, $J= 8.2$ Hz, H5), 7,40 (dd, $J= 8.2$ Hz, 1.9 Hz, H6), 7,43 (d, $J= 1.9$ Hz, H2). En comparant les données avec celles de la bibliographie (Gutzeit et al., 2007), le composé **A3** a été identifié comme l'**acide protocatéchique** (Figure 2.35).

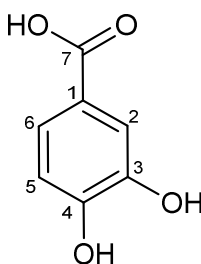


Figure 2.35 : Acide protocatéchique (A3)

De nombreuses propriétés biologiques ont été attribuées à l'acide protocatéchique notamment un effet anti-oxydant (Phan et al., 2001) et anti-inflammatoire (Min et al., 2010).

❖ Détermination structurale du composé A4

Le spectre UV de **A4** indique deux λ_{max} à 194 et 255 nm, suggérant un acide phénolique.

L'analyse HRMS conduit à une formule brute de $C_7H_6O_3$ avec un ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 139,039. D'après le DNP, il pourrait s'agir d'un acide hydroxybenzoïque.

Son spectre RMN 1H montre un système AA'BB' pour les quatre protons aromatiques d'un benzène *para*-disubstitué à δ ppm 6,82 (d, $J= 7.61$ Hz, H3, H5) et 7,89 (d, $J= 7.67$ Hz, H2, H6). En comparant ces données à la littérature (Gerothanassis et al., 1998), le composé **A4** a été identifié comme étant l'**acide *p*-hydroxybenzoïque** (Figure 2.36).

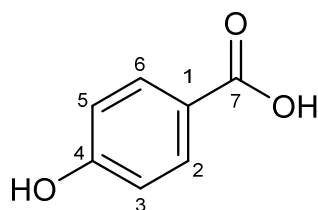


Figure 2.36 : Acide *p*-hydroxybenzoïque (A4)

Cette molécule possède un effet anti-oxydant (Rice-Evans et al., 1996).

❖ Détermination structurale du composé D1

Le composé **D1** est obtenu sous forme de poudre de couleur beige. Son spectre UV indique trois maxima à λ 196, 221 et 284 nm.

L'analyse HRMS conduit à l'identification d'un adduit sodium $[M+Na]^+$ à m/z 145,0242, ce qui correspond à une formule brute en $C_7H_6O_2$.

Son spectre proton présente une forte similarité avec celui du composé **A4** pour la présence d'un cycle benzénique symétrique *para*-disubstitué. Un proton supplémentaire et isolé est observé à δ ppm 9.75 (1 H, s, C7). Son déplacement chimique élevé est caractéristique d'un proton aldéhydique.

Le spectre ^{13}C nous confirme la présence d'un aldéhyde avec un carbone à 193 ppm. Le second carbone déblindé à 165,8 ppm, correspond au carbone phénolique (C4). Le carbonyle aldéhydique corrèle en HMBC (3J) avec les deux protons aromatiques à 7.77 ppm (2H, d, $J=8.6$ Hz), ce qui confirme qu'il s'agit de H2 et H6.

Après comparaison avec la littérature (Machida and Kikuchi, 1996), la molécule **D1** est confirmée comme étant le *p*-hydroxybenzaldéhyde ou 4-hydroxybenzaldéhyde (Figure 2.37).

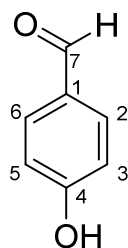


Figure 2.37 : *p*-hydroxybenzaldéhyde (D1)

Le *p*-hydroxybenzaldéhyde est une molécule ubiquitaire. On le retrouve notamment dans le genre *Limonium* (Rodrigues et al., 2015). Cette molécule possède des propriétés anti-inflammatoires (Lee et al., 2006), neuromodulatrices (Ha et al., 2000) et anti-oxydantes (Bountagkidou et al., 2010).

❖ Détermination structurale du composé **D2**

Comme pour le composé précédent, **D2** est une poudre de couleur beige dont les spectres UV sont identiques.

L'analyse HRMS conduit à une formule brute en $C_8H_8O_2$ avec son adduit sodium $[M+Na]^+$ à m/z 137,0601.

Le spectre proton présente le système AA'BB' des protons du cycle phénolique para-disubstitué, et trois protons équivalents à δ 2.52 ppm (1 H, s, H8) qui correspondent à un méthyle au lieu de l'aldéhyde dans le *p*-hydroxybenzaldéhyde.

Sur le spectre ^{13}C un carbone déblindé est observé à 199,6 ppm qui correspond à un carbonyle de cétone conjuguée, et un carbone blindé à 26,4 ppm pour un méthyle. Les protons du méthyle corrélerent en HMBC avec le carbonyle cétonique, qui lui-même possède une seconde corrélation avec les protons aromatiques H2 et H6.

Comme dans le *p*-hydroxybenzaldéhyde, on détecte le C4 phénolique à 164,4 ppm.

Après comparaison avec la littérature (Kwon and Lee, 2001), la molécule **D2** est identifiée comme étant la ***p*-hydroxy-acétophénone**, encore appelée **picéol**.

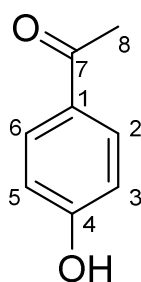


Figure 2.38 : *p*-hydroxyacétophénone (**D2**)

Le picéol est une petite molécule retrouvée dans différentes plantes, notamment des orchidées (Jao et al., 2016) ou l'épicéa (Hoque, 1984). Cette molécule présente des propriétés anti-inflammatoires (Alvarez et al., 2000).

❖ Détermination structurale du composé D3

Le quatrième composé phénolique de cette série présente un spectre UV identique aux trois autres, avec trois λ_{max} à 193, 221 et 277 nm, et une formule brute en $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$ déterminée par HRMS ($[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 139,0751).

Par rapport aux composés **A4**, **D1** et **D2**, le spectre de RMN ^1H de **D3** comprend deux triplets s'intégrant pour 2H chacun à δ ppm 2.71 (2 H, t, $J=7.2$ Hz, H7) et 3.68 (2 H, t, $J=7.2$ Hz, H8) ; leur différence de déplacement chimique ($\Delta = 1$ ppm) est due à l'hydroxylation du second CH_2 pour un enchaînement $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$.

Sur le spectre de RMN ^{13}C , on observe le C4 phénolique à 156,9 ppm comme dans les molécules précédentes. Les DEPT et l'HSQC nous confirment la présence de 2 CH_2 à δ ppm 39.6 (C7) et 64.7 (C8). Les protons H7 corrélient en HMBC avec les carbones C2 et C6 d'où la fixation du groupe éthanolique sur le C1 en position *para* du phénol.

Après comparaison avec la littérature (Capasso et al., 1992; Kimura and Tamura, 1973), la molécule **D3** est identifiée comme le *p*-hydroxyphényléthanol ou **4-hydroxyphényléthanol** également appelé **tyrosol** (Figure 2.39).

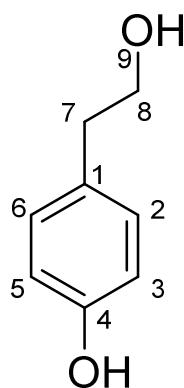


Figure 2.39 : *p*-hydroxyphényléthanol (D3)

Le tyrosol est une molécule anti-oxydante (Vlachogianni et al., 2015) qui possède une activité inhibitrice de collagénase (MMP-9) (Nakbi et al., 2011). Cette molécule est retrouvée dans l'huile d'olive (Kiritsakis, 1998).

c. Conclusion

Six acides phénoliques ubiquitaires et **trois phénols** ont été isolés à partir d' *A. maritima*. Les acides phénoliques (**A1 à A5**) proviennent tous de la fraction AmA, à l'exception de l'hétéroside **B1** qui a été isolé dans AmB, ce qui se justifie par une augmentation de la polarité due à sa nature hétérosidique. Les phénols simples (**D1 à D3**) quant à eux, ont été isolés dans la fraction AmD.

De par leur large distribution, ces molécules ont été très étudiées. Ainsi de très nombreuses activités biologiques leurs sont attribuées.

2. Les hétérosides de flavonols

a. Biosynthèse

La famille des flavonoïdes regroupe différents types de squelettes que sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavones, les biflavonoïdes, les chalcones et les aurones. Seuls les flavonols sont évoqués ici, puisqu'ils sont les seuls flavonoïdes isolés à partir d' *A. maritima*.

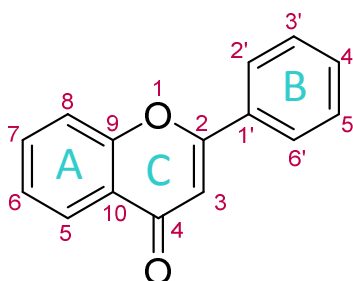


Figure 2.40 : Numérotation des flavonols

Les flavonoïdes sont biosynthétisés à partir d'un cinnamoyl-CoA qui donnera le cycle B avec une extension de la chaîne latérale par trois molécules de malonyl-CoA, qui elles, donneront le cycle A. La cyclisation engendre la formation du cycle pyrane C. Cette réaction est catalysée par la chalcone synthase. La fermeture de la chalcone est ensuite catalysée par la chalcone isomérase. La flavanone 3-hydroxylase permet l'hydroxylation en position 3, puis la flavonol synthase introduit l'insaturation entre C2 et C3. (Bruneton, 2009; Dewick, 2009) (Figure 2.41)

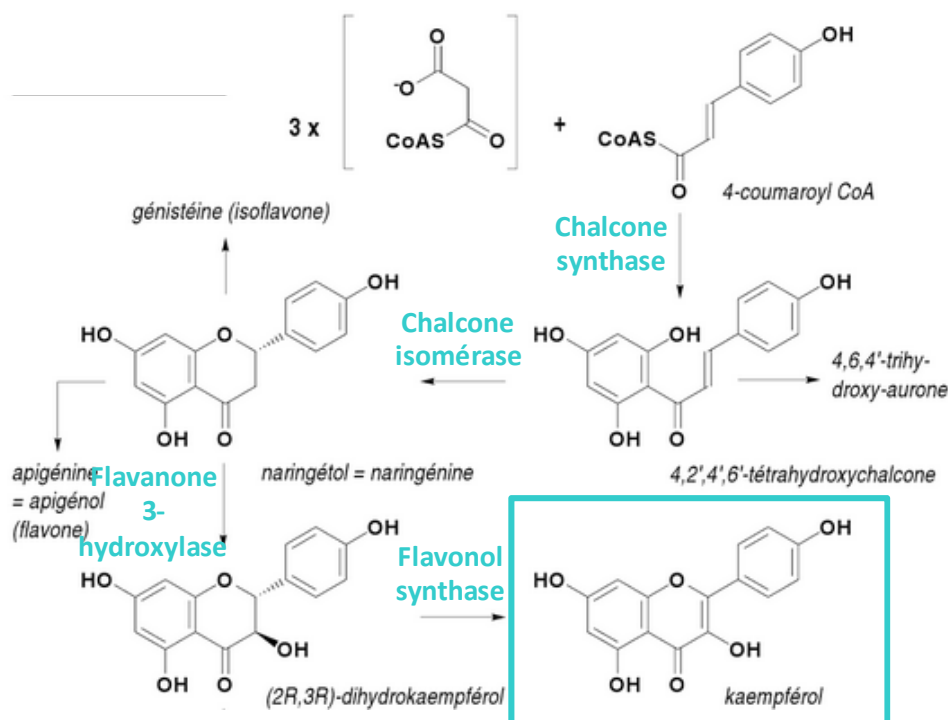


Figure 2.41 : Origine biosynthétique des flavonoïdes et enzymes intervenants dans la synthèse des flavonols (Bruneton, 2009).

La figure 2.41 présente la biosynthèse du kaempférol qui est le flavonol le plus simple. Les deux autres flavonols les plus courants sont la myricétine et la quercétine. Les hydroxylations supplémentaires du cycle B pour la synthèse de la quercétine (cycle B hydroxylé en position 3' et 4') et de la myricétine (cycle B hydroxylé en position 3', 4', 5') ont lieu plus tardivement.

Les flavonols peuvent être *O*-glycosylés par un, deux voire trois unités osidiques et ce préférentiellement aux positions 3 ou 7 (Figure 2.40). Cette étape de glycosylation est effectuée par des transférases d'uridine diphosphate ose (ex : UDP-glucose) (Bruneton, 2009). A noter qu'il existe également des *C*-hétérosides de flavonoïdes, dans ces cas la liaison se fait entre le carbone anomérique du sucre et la position 6 ou 8 du flavonoïde.

On peut aussi observer des acétylations ou encore des méthylations, notamment sur les hydroxyles du cycle B, comme dans le cas de l'isorhamnétine par exemple (Harborne and Mabry, 2013).

b. Elucidation structurale

Dix-sept hétérosides flavoniques ont été identifiés. Tous possèdent des aglycones de type flavonol glycosylées en C3 par une chaîne osidique comprenant une ou deux unités osidiques. Les cinq aglycones sont des flavonols ubiquitaires : la quercétine (**A8, A10, B3, B6, B9**), le

kaempférol (**A7**, **A11**, **B4**, **B7**), la myricétine (**A6**, **A9**, **A12**, **B2**, **B5**, **B8**), la syringétine (**B10**) et l'isorhamnétine (**B11**) (Figure 2.42). Leurs valeurs spectrales sont présentées dans les tableaux 2.9 à 2.13.

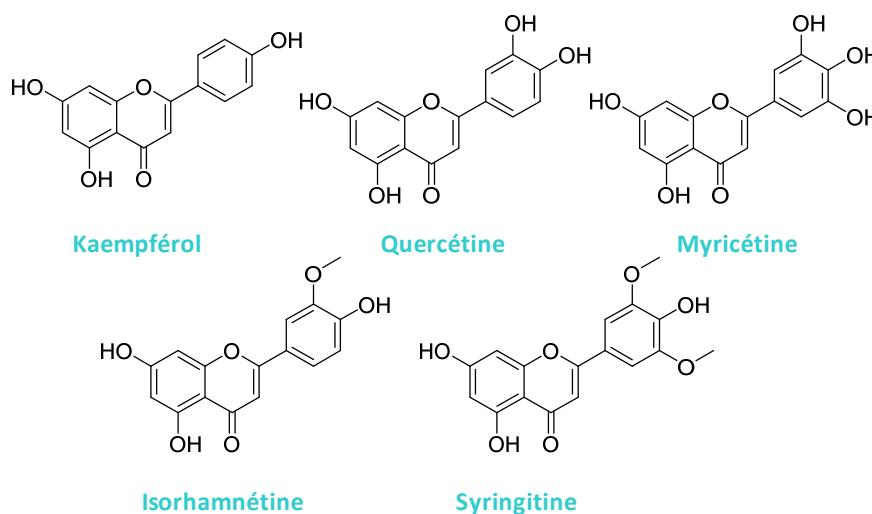


Figure 2.42 : Formules des 5 aglycones

Les hétérosides de myricétine B5 et B8, ainsi que ceux de quercétine B9, et de syringétine B10 correspondent à quatre composés originaux nouvellement décrits et caractérisés.

b.1 Hétérosides flavoniques mono-glycosylés

b.1.1 Myricétine monoglycosylée

❖ Détermination structurale du composé A6

Cet hétéroside est de couleur orange en CCM à 365 nm après révélation au Neu-PEG, ce qui est typique des flavonoïdes. Son spectre UV avec trois λ_{\max} de 206, 265 et 359 nm, est caractéristique des flavonols (Markham, 1982).

L'analyse HRMS conduit à l'identification de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 481,0980, ce qui correspond à une formule brute en $C_{21}H_{20}O_{13}$. On observe aussi un fragment

à m/z 319,04, équivalent à une perte de 162 Da correspondant à un hexose. D'après le DNP, il pourrait s'agir d'un hexahydroxyflavonol glycosylé par un hexose.

Détermination de la structure de la génine:

Le spectre RMN ^1H montre deux protons couplés sous forme de doublets à δ ppm 6.19 (d, $J=2.1$ Hz) et 6.37 (d, $J=2.1$ Hz). Leurs déplacements chimiques sont caractéristiques de protons aromatiques, leur constante de couplage (2,1 Hz) caractéristique d'une position relative *meta*. Deux autres protons aromatiques équivalents à 7.30 ppm apparaissent sous forme d'un singulet, traduisant la présence d'un second cycle aromatique *para* et di-*meta* tétrasubstitué.

Les protons situés entre 3 et 4 ppm ont des déplacements chimiques caractéristiques de protons osidiques, ce qui est confirmé par la présence d'un proton anomérique à δ ppm 5.24 (d, 7.5 Hz). (Figure 2.43).

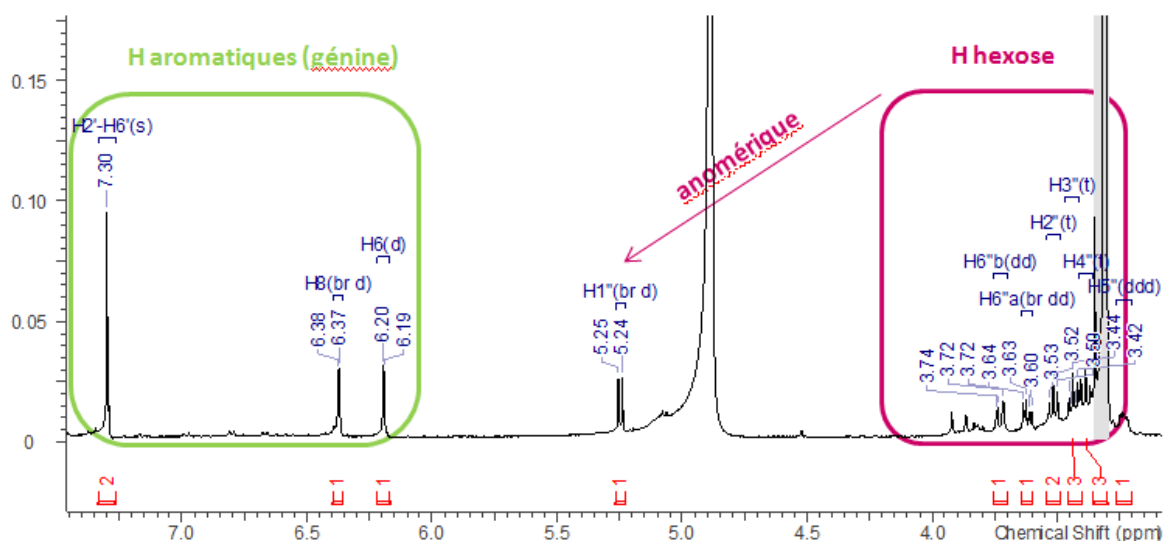


Figure 2.43 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de l'hétéroside A6

Le spectre RMN ^{13}C confirme les 21 carbones de la formule brute, dont deux carbones équivalents à δ ppm 100,1 et deux autres à 146,6. Le carbone à δ ppm 179.5 est celui caractéristique d'un carbonyle α,β -insaturé, le C-4 des flavonols. Les huit carbones présents entre 130 et 165 ppm, correspondent aux carbones aromatiques quaternaires oxygénés soient les C5, C7, C9 du cycle A, les C2 et C3 du cycle pyrone C, et trois hydroxyles sur le cycle B. Les autres carbones de l'aglycone et ceux de la partie osidique, se situent entre 62 et 123 ppm. (Figure 2.44)

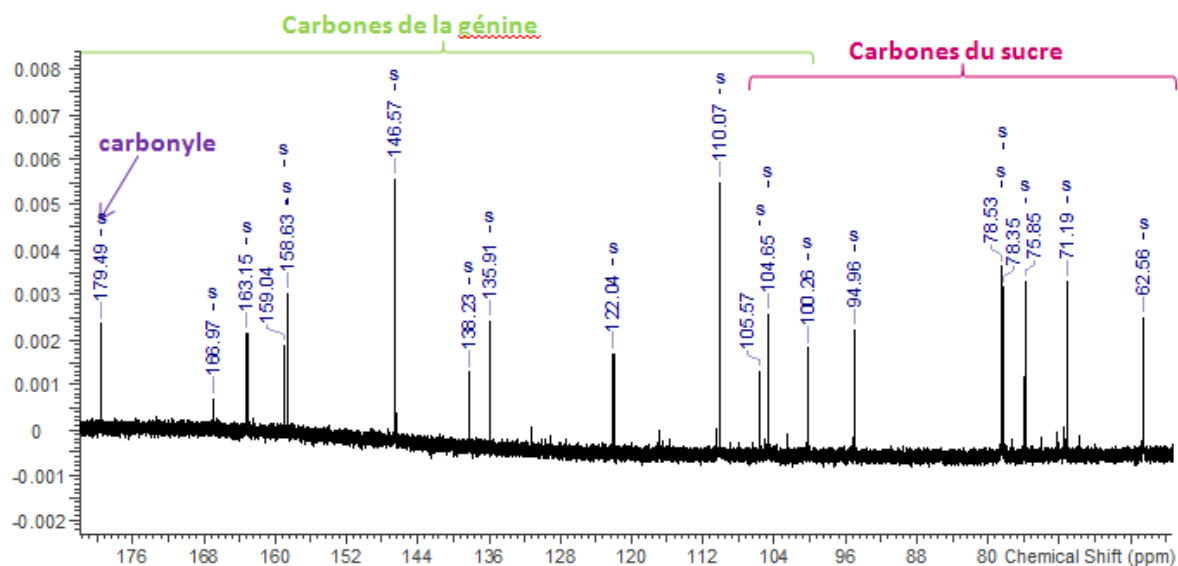


Figure 2.44 : Spectre RMN ^{13}C (126 MHz, CD_3OD) de l'hétéroside A6

Sur le spectre DEPT 135 où sont présents les CH_2 négatifs, et les CH et les CH_3 positifs, on obtient par soustraction avec le spectre carbone, 11 carbones quaternaires dont deux non oxygénés à 122.0 et 105.6 ppm. La présence d'un CH_2 à δ 62,6, est détectée, confirmant l'hypothèse d'un hexose. La présence de 9 CH (dont deux équivalents) est confirmée par le spectre DEPT 90 : 5 CH osidiques et 4 CH du flavonol : C6 à 99.9, C8 à 94.7, C2' et C6' à 109.8 ppm (Figure 2.45).

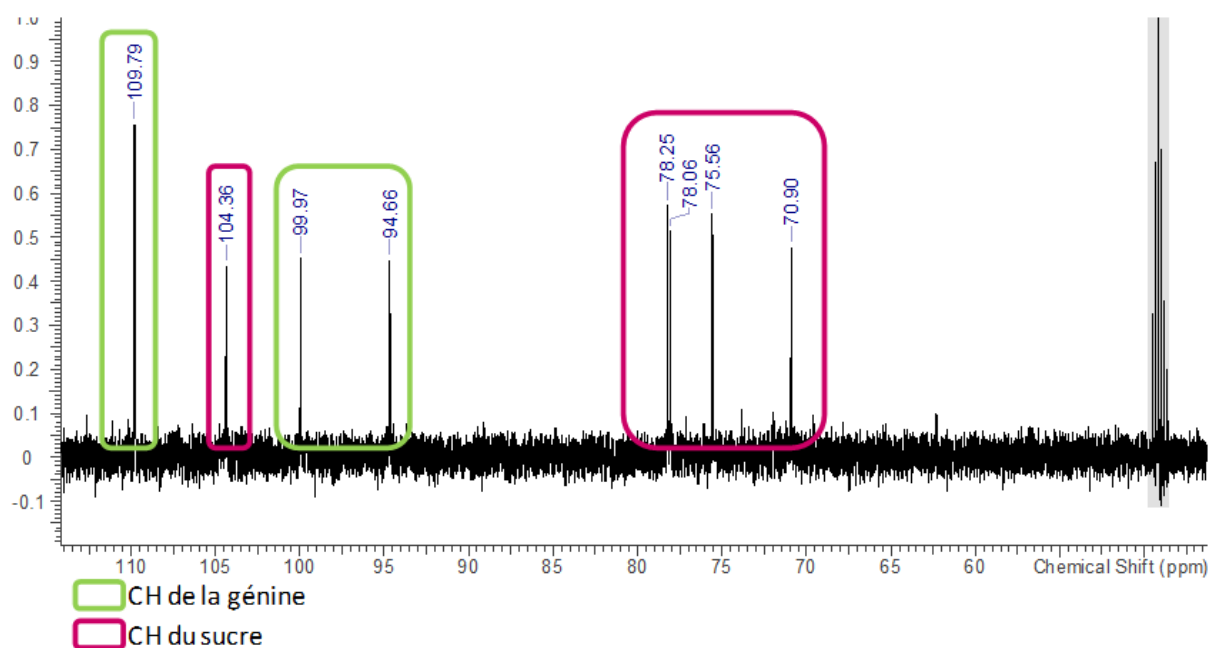


Figure 2.45 Spectre RMN dept90 (126 MHz, CD_3OD) de l'hétéroside A6

Le spectre 2D HSQC montre les corrélations $^1J_{H-C}$, et permet de réaliser les attributions proton-carbone pour les CH et CH₂, et ainsi de séparer en deux zones distinctes, les signaux osidiques et ceux de la génine (Figure 2.46).

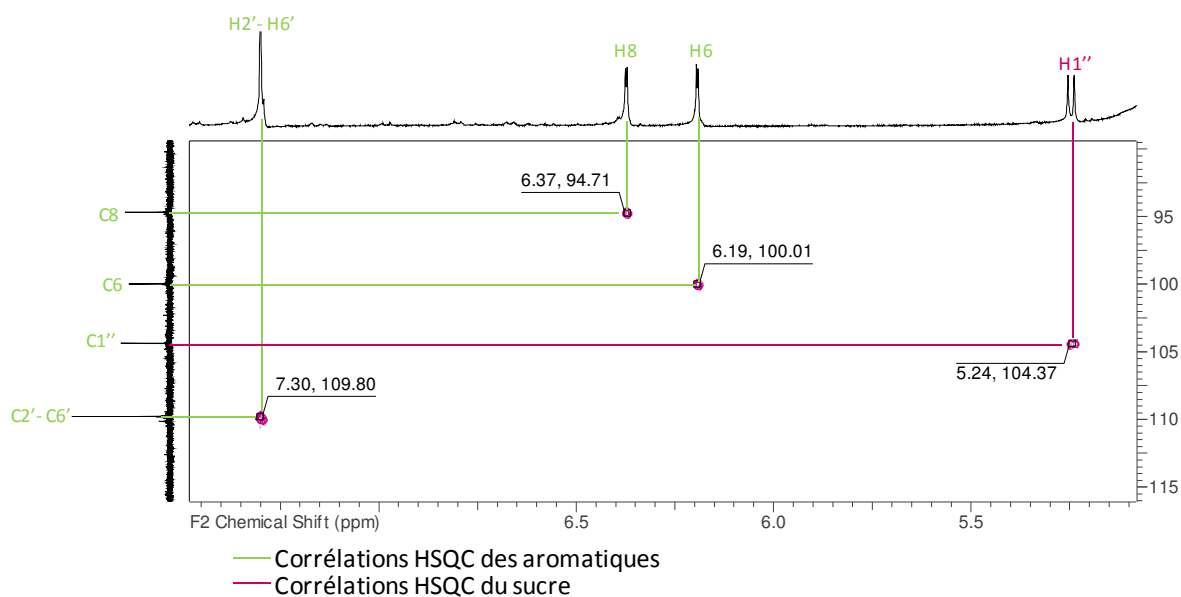


Figure 2.46 : Partie aglycone du spectre HSQC de l'hétéroside A6

La génine est donc un flavonol en C15 possédant deux noyaux aromatiques, une fonction carbonyle et 6 hydroxyles. Nous nous sommes basés sur la structure la plus probable au vu des voies de biosynthèse (Shirley, 1996), c'est-à-dire des hydroxylations en position 3, 5, 7, 4', du squelette flavonol, puis deux hydroxylations supplémentaires en position 3' et 5' du cycle B. Cette structure correspond à la **myricétine**.

Ainsi les deux protons aromatiques en *meta* (6.13 et 6.19 ppm) sont attribués à ceux H6 et H8 du cycle A et les deux protons équivalents sous forme d'un singulet aux H2' et H6' du cycle B (Braca et al., 2001).

L'analyse du spectre 2D HMBC (corrélations $^{2,3}J_{H-C}$) nous a permis de confirmer la structure de la myricétine et de finaliser l'attribution de ses carbones quaternaires.

On observe une auto-corrélation H-C entre les deux positions 6 et 8 *meta* du cycle A. Ces protons corrént également avec deux carbones à δ ppm 105,6 et 167,0 dont l'un déblindé correspond au C7 (2J) et le second blindé au C10 (3J). Le proton à 6,37 ppm (H8) corréle à un quatrième carbone quaternaire oxygéné à 158,6 ppm, il s'agit du C9. Le proton à 6,19 ppm (H6) corréle lui aussi avec un quatrième carbone quaternaire oxygéné à 163,2 ppm, il s'agit du C5.

Pour le cycle B, les positions 2' et 6' présentent une même auto-corrélation. Les protons H2' et H6' corrélient avec les carbones à 122,0, 138,2 et 159,0 ; le carbone le plus déblindé à 159,0 ppm correspond au C2 du cycle pyrone, le plus blindé à 122,0 ppm au C1' car dépourvu d'oxygène, et par conséquent le C4' est à 138.2 ppm (Markham and Chari, 1982). Le carbone quaternaire oxygéné restant est à 135,9 ppm, il correspond au C3.

Ce dernier carbone C3 présente une corrélation avec le proton anomérique en HMBC, indiquant que la myricétine est glycosylée en cette position du flavonol.

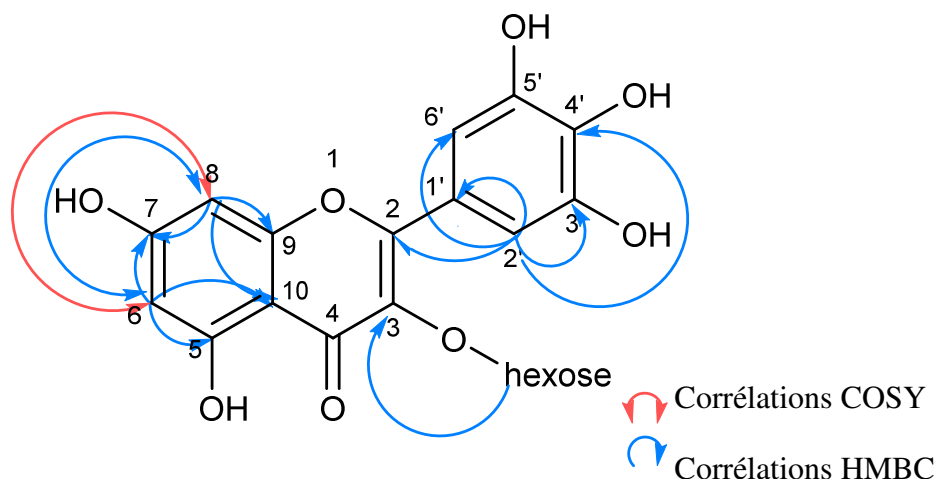


Figure 2.47 : Corrélations HMBC et COSY déterminantes pour l'élucidation structurale de la molécule A6

Le spectre COSY apporte quant à lui peu d'information, seule la corrélation entre H6 et H8 est observée.

Détermination de la structure de l'ose :

On voit sur le spectre proton que la constante de couplage du proton anomérique H1 (δ 5.24) est de $J_{H1''-H2''}$ 8.0 Hz. Cette valeur élevée indique que les deux protons H1'' et H2'' sont en position *trans* di-axiale. Les deux protons du CH₂ (H6''a et H6''b) ont été identifiés grâce à l'HSQC-DEPT, il s'agit des protons d'un système ABX à 3,73 (dd, $J = 12.5, 4.5$ Hz) et 3,62 ppm (dd, $J = 12.5, 3.5$ Hz) (Figure 2.48).

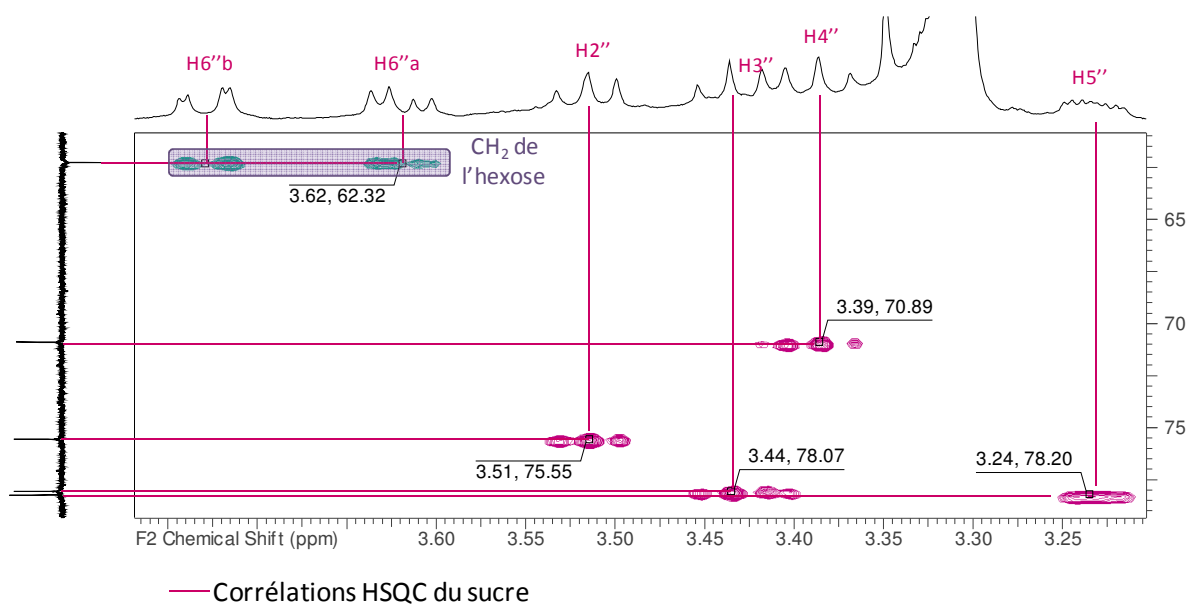


Figure 2.48 : Partie osidique du spectre RMN HSQC de l'hétéroside A6

Les protons H2'', H3'', H4'' et H5'' ont été identifiés grâce au spectre COSY qui permet de visualiser les corrélations H-H à faible distance (Figure 2.49). A partir du proton H1'' on obtient une corrélation avec H2'' à 3,51 ppm (*dd*, 9,0, 8,0 Hz), qui lui-même corrèle avec H3'' à 3,43 ppm (*t*, 9,0 Hz), qui lui-même voit H4'' à 3,40 ppm (*t*, 9,0 Hz), qui lui-même corrèle H5'' à 3,24 ppm (*ddd*, 7,3, 4,5, 3,5 Hz) puis on achève l'enchaînement des corrélations sur les deux H6'' à 3,62 ppm (*dd*, 12,5, 4,5) et à 3,73 ppm (*dd*, 12,5, 4,5).

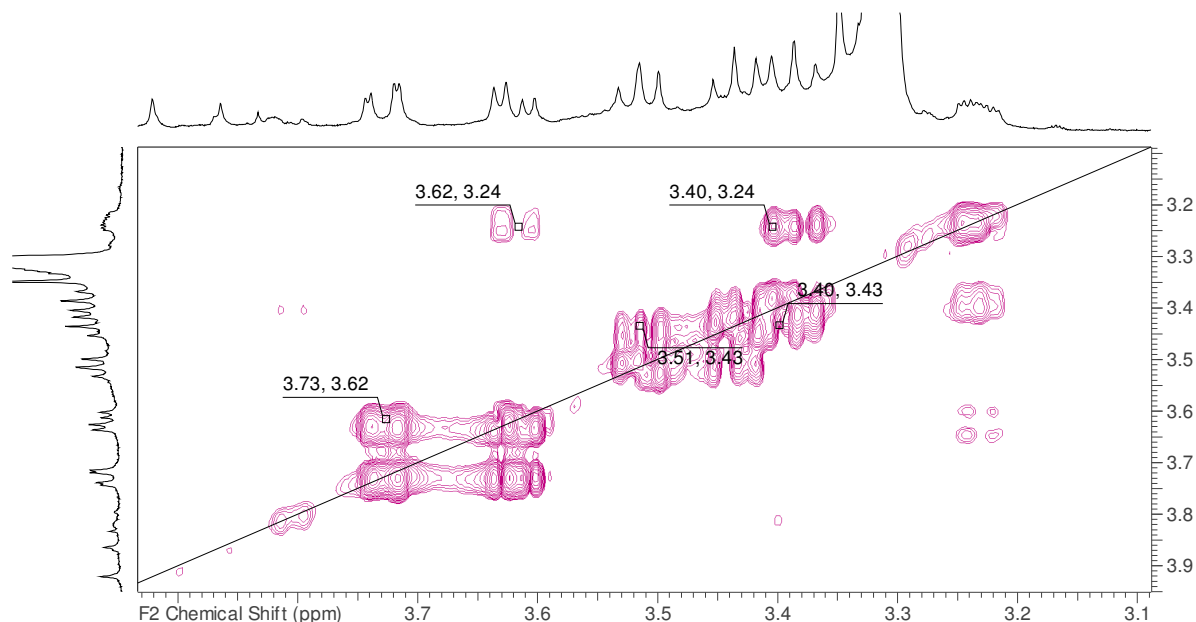


Figure 2.49 : Partie osidique du spectre RMN COSY de l'hétéroside A6

Le spectre HSQC met en évidence les $^1J_{H-C}$, et permet donc d'attribuer les différents carbones osidiques correspondants. Les données sont présentées dans le tableau 2.10.

Les grandes constantes de couplage ≥ 8 Hz entre tous les protons de l'hexose signifient que les protons du cycle pyranose sont en position *trans* di-axiale, il s'agit donc du β -D-glucopyranose. Le spectre NOESY le confirme puisque des effets nOe sont visibles entre les protons H1'', H3'' et H5'' et entre les protons H2'' et H4''.

Le composé **A6** a donc été identifié comme étant le **myricétine-3-O- β -D-glucopyranoside** (Figure 2.50). L'ensemble de nos données corrèlent avec celle de la littérature (Scharbert et al., 2004).

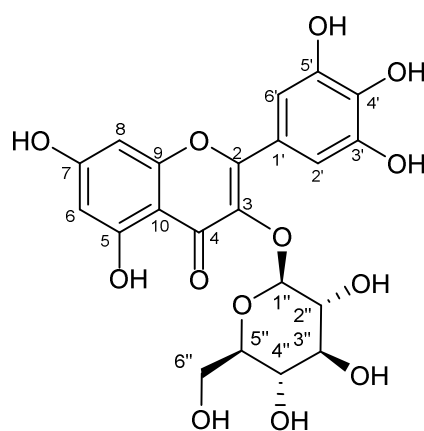


Figure 2.50 : Myricétine-3-O- β -D-glucopyranoside (A6)

Cette molécule a déjà été identifiée dans de nombreuses plantes dont le genre *Limonium* (Korul'kina et al., 2004).

❖ Détermination structurale du composé **A9**

Le composé **A9**, est une poudre couleur jaune virant de couleur orange en CCM à 365 nm après révélation au Neu-PEG ; son spectre UV indique deux λ_{max} de 206, 263, 351 nm caractéristiques des flavonols (Markham, 1982).

Par rapport au composé précédent **A8**, l'analyse HRMS de **A9** conduit à l'identification d'un ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 465,1040, d'où une formule brute de $C_{21}H_{20}O_{12}$, et on observe un fragment à m/z 319 m/z soit $[M-146]^+$ suggérant ici la présence d'un désoxy-hexose. D'après le DNP, il pourrait s'agir de la myricétine glycosylée par un rhamnose.

Détermination de la structure de la génine :

Les spectres RMN de l'aglycone sont comparables à ceux précédemment décrits pour l'hétéroside **A8**, ainsi on retrouve la signature caractéristique de la myricétine avec des protons en *meta* pour le cycle A (6,20 (d, $J=2.1$ Hz, H6), 6,36 (d, $J=2.1$ Hz, H8)), deux protons équivalents singulet à 6,95 ppm pour le cycle B.

Détermination de la structure de l'ose :

On observe sur le spectre RMN ^1H un proton anomérique H1'' (δ 5.32 (d, $J = 1.5$ Hz). La valeur de la constante de couplage est faible, indiquant que les deux protons H1'' et H2'' sont en position *trans* di-équatoriale. L'hypothèse du désoxy-hexose est confirmée par la présence de trois protons équivalents résonnant à 0.97 ppm (d, $J = 6.2$ Hz), ce qui est caractéristique d'un groupement méthyle H-6''.

Comme précédemment, les protons H2'', H3'', H4'' et H5'' ont été identifiés par l'analyse du spectre COSY. Le proton H1'' corrèle avec H2'' à 4,23 ppm (*dd*, 3.2, 1.5 Hz), qui lui-même corrèle avec H3'' à 3.80 ppm (*dd*, 9.5, 3.2 Hz), qui lui-même corrèle à H4'' à 3,35 ppm (*t*, 9.6 Hz), qui lui-même voit H5'' à 3,52 ppm (*dq*, 9.6, 6.2 Hz), ce dernier proton osidique corrélant au méthyle des protons H6''. Les valeurs des déplacements chimiques ainsi que celles des constantes de couplage en comparaison avec la littérature (Jagan Mohan Rao et al., 2002; Jayaprakasha et al., 2006) confirment que le sucre est bien un α -L-rhamnopyranoside.

Les données spectrales de RMN sont présentées dans le tableau 2.10, et après comparaison avec la littérature (Fossen et al., 1999), la molécule **A9** est identifiée comme étant la **myricétine-3-O- α -L-rhamnopyranoside**, également appelée **myricitrine** (Figure 2.51).

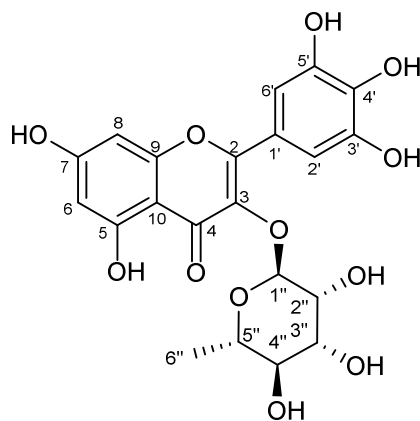


Figure 2.51 : Myricétine-3-O- α -L-rhamnopyranoside (A9)

Cette molécule a déjà été identifiée dans de nombreuses plantes dont le genre *Limonium* (Lin and Chou, 2000). Cette molécule possède des activités anti-inflammatoire et anti-oxydante (Domitrović et al., 2015; Meotti et al., 2006).

❖ Détermination structurale du composé A12

Le spectre UV du composé **A12** indique trois λ_{\max} de 200, 269, 375 (épaulement à 322) nm, et semble plus complexe par rapport aux spectres précédents. L'épaulement à 322 nm rappelle également le spectre UV des acides phénoliques.

L'analyse HRMS conduit à l'identification de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 627,13030 et le $[M+Na]^+$ est détecté à m/z 649,1139, soit une formule brute de $C_{30}H_{26}O_{15}$. Aucune perte caractéristique d'ose n'est observée.

Les spectres RMN sont très semblables à ceux du myricétine-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**A6**), excepté au niveau de la position 6'' du glucose. Les protons H6'' sont déblindés de $\Delta = + 0,6$ ppm (4.22 ppm, dd, $J = 11,6, 7,0$ Hz, et 4.32 ppm, dd, $J = 11,6, 1,5$ Hz) et le C6'' est déblindé à 64.5 ppm ($\Delta = + 1,9$ ppm) par rapport à ceux observés dans **A6**. Ceci suggère que le glucose est estérifié en sa position 6.

Des signaux supplémentaires sont observés dans les spectres RMN du composé **A12** :

- deux protons éthyléniques sous forme de deux doublets avec une constante de couplage de $J=16,1$ Hz, comme dans l'acide caféique, à 7.39 (H7''') et 6.10 (H8''') ppm.
- quatre protons aromatiques équivalents deux à deux, en position *ortho* à 6.79 ppm (d, $J= 8,9$ Hz, H3''' et H5''') et à 7.32 ppm (d, $J= 8,9$ Hz, H2''' et H6''').
- sur le spectre carbone, un carbonyle à 168,9 ppm. Les protons géminés du CH_2 -6'' du glucose corrélerent en HMBC avec ce carbonyle.

Les corrélations HMBC et COSY de ces signaux, ainsi que les données de la littérature (Budzianowski and Skrzypczak, 1995; Jagan Mohan Rao et al., 2002) nous permettent d'établir la structure d'un groupement para-*E*-coumaroyl. (Figure 2.52) (Tableau 2.10).

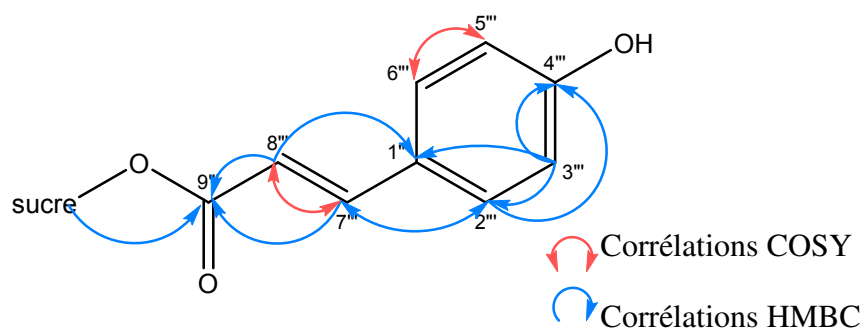


Figure 2.52 : Corrélations HMBC et COSY déterminantes pour l'élucidation du groupement coumaroyl de la molécule A12

La molécule A12 correspond à la **myricétine-3-*O*- β -D-(6''-*O*-*trans*-*p*-coumaroyl)-glucopyranoside**. L'ensemble des données spectrales coïncident avec les données présentées dans la seule publication pour cette structure (Liu et al., 2011).

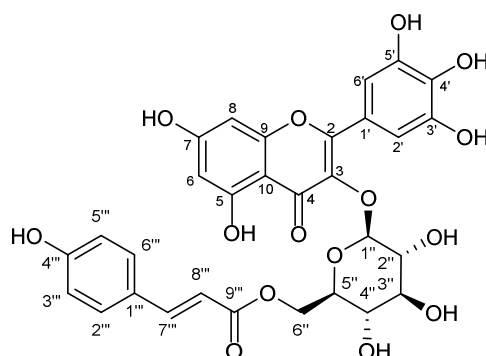


Figure 2.53 : Myricétine-3-*O*- β -D-(6''-*O*-*trans*-*p*-coumaroyl)-glucopyranoside (A12)

La présence de cette molécule naturelle n'a été reportée qu'une fois, dans l'espèce *Cedrus deodora* (Liu et al., 2011). Aucune activité biologique n'a été reportée pour cette molécule. Il s'agit d'un composé qui n'est pas nouveau mais original pas ubiquitaire.

b.1.2 Kaempférol monoglycosylé

❖ Détermination structurale du composé A7

Comme pour les hétérosides précédents, cet hétéroside flavonique est isolé sous forme d'une poudre de couleur jaune, et de couleur orange en CCM à 365 nm après révélation au Neu-PEG. Son spectre UV indique trois λ_{\max} de 199, 265, 346 nm, aussi caractéristique d'un flavonol (Markham, 1982).

L'analyse HRMS conduit à l'identification de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 433,1121, ce qui correspond à une formule brute de $C_{21}H_{20}O_{10}$. On observe un fragment à m/z 287, ce qui correspond à $[M-146]^+$, d'où la présence d'un désoxy-hexose.

Détermination de la structure de la génine:

Le spectre RMN 1H montre les deux doublets des protons aromatiques *meta* à δ ppm 6,20 (d, $J=2.1$ Hz) et 6,38 (d, $J=2.1$ Hz) du cycle A du squelette flavonol (Figure 2.54). Ces protons sont comme dans le cas de la myricétine en position respective 6 et 8. Une différence est observée au niveau du cycle B. En effet, on observe ici deux doublets s'intégrant chacun pour deux protons à δ ppm 6,94 (2H, d, 8.8 Hz) et 7,77 (2H, d, 8.8 Hz); il s'agit de protons aromatiques en position *ortho* qui forment un système AA'BB'. Le cycle B est donc hydroxylé en position 3' (Kim et al., 2004b). Cette aglycone semble être le kaempférol.

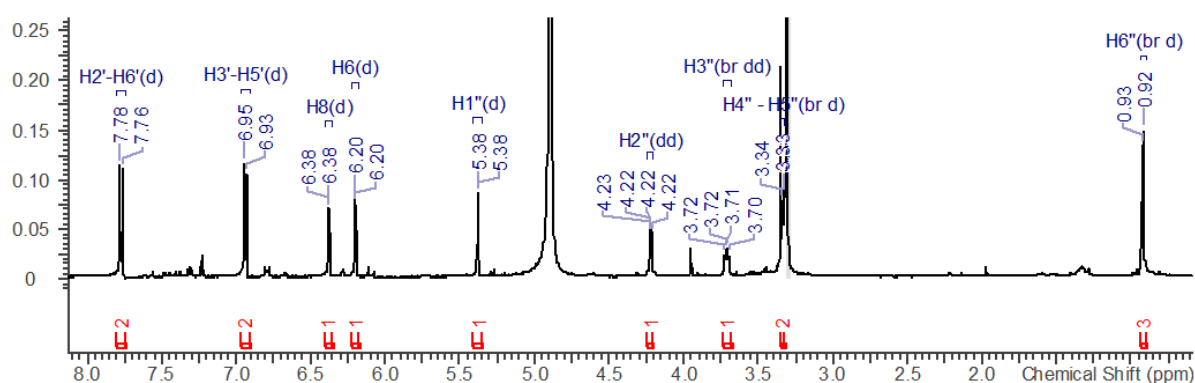


Figure 2.54 : Spectre RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) du composé A7

Le spectre 2D HSQC permet de visualiser les corrélations $^1J_{H-C}$ et ainsi de séparer en deux zones distinctes, les carbones osidiques et ceux du kaempférol comme pour les hétérosides à myricétine.

Le spectre RMN ^{13}C indique la présence de 21 carbones, dont 2 fois deux carbones équivalents à δ ppm 116,7 et 132,0 correspondant aux positions 3'-5' et 2'-6' (Kim et al., 2004b). On note également la présence du carbonyle C4 à δ ppm 179,7.

Le spectre DEPT montre la présence de 11 CH et donc 8 carbones quaternaires en plus du carbonyle pour l'aglycone. Parmi ces derniers, cinq portent de l'oxygène à 161.7 (C4'), 163.4 (C5), 166.2 (C7), 179.7 (C4) ppm.

Le spectre HMBC présente les mêmes corrélations que dans le cas de la myricétine (cycles A et C), avec en plus des corrélations des deux protons équivalents du cycle B : H3'-H5' avec les carbones C1' à 122.8 ppm et C4' à 161.7 ppm.

Une corrélation HMBC entre le proton anomérique et le carbone C3' est également observée, ce qui confirme la position du désoxy-hexose.

Sur le spectre COSY, on observe également une corrélation entre H2'-H6' et H3'-H5'. (Figure 2.55).

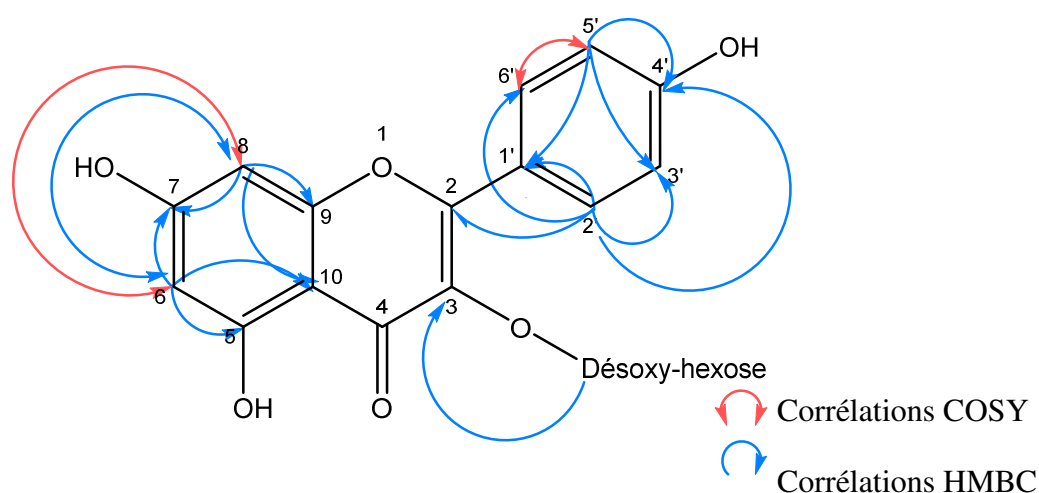


Figure 2.55 : Corrélations HMBC et COSY déterminantes pour l'élucidation structurale de la molécule A7

L'ensemble de ces informations obtenues grâce aux différents spectres RMN confirme que le flavonol est le kaempférol glycosylé en position 3.

Détermination de la structure de l'ose :

La présence d'un proton anomérique est détectée à δ ppm 5,38 (*d*, 1.8 Hz). Le méthyle à δ 0,92 est caractéristique d'un 6-désoxy-hexose.

La configuration α , le méthyle en position 6'' et les valeurs des déplacements chimiques ainsi que les constantes de couplage en comparaison avec la littérature (Jagan Mohan Rao et al., 2002; Jayaprakasha et al., 2006) confirment que le sucre est bien un α -L-rhamnopyranoside comme dans le composé **A9**.

La molécule **A7** est le **kaempférol-3-O- α -L-rhamnopyranoside** également appelée **afzeline** (Figure 2.56).

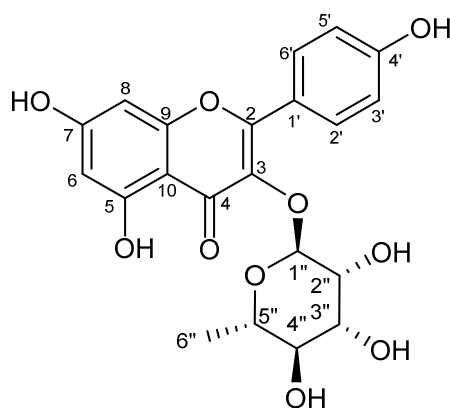


Figure 2.56 : Kaempférol-3-O- α -L-rhamnopyranoside (A7)

Cette molécule a déjà été identifiée dans de nombreuses plantes comme par exemple dans l'halophyte *Excoecaria agallocha* (Kaliampurthi and Selvaraj, 2016). Il est intéressant de noter que le rhamnose en position 3 semble inhiber certaines activités biologiques comme l'activité anti-inflammatoire ou encore dépigmentante (Choe et al., 2012; Rho et al., 2011)

❖ Détermination structurale du composé A11

Le composé présente une couleur verte en CCM à 365 nm après révélation au Neu-PEG, qui n'est pas une couleur caractéristique. Mais le spectre UV indique toujours trois λ_{\max} de 193, 267, 316 nm, légèrement déformé comme dans le cas de l'hétéroside **A12**.

L'analyse HRMS conduit à l'identification de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 595,1430 m/z et le $[M+Na]^+$ correspondant à m/z 617,1246, ce qui correspond à une formule brute de $C_{30}H_{26}O_{13}$.

Le spectre proton présente les signaux caractéristiques du kaempférol avec les deux protons en *meta* du cycle A ((6.14 ppm (d, $J=2.1$ Hz, H6), 6.31 ppm (d, $J=2.1$ Hz, H8)), et le système AA'BB' du cycle B (7.99 ppm (2 H, d, $J=9.0$ Hz, H2', H6'), 6.82 ppm (2 H, d, $J=9.0$ Hz, H3', H5')) (Figure 2.57).

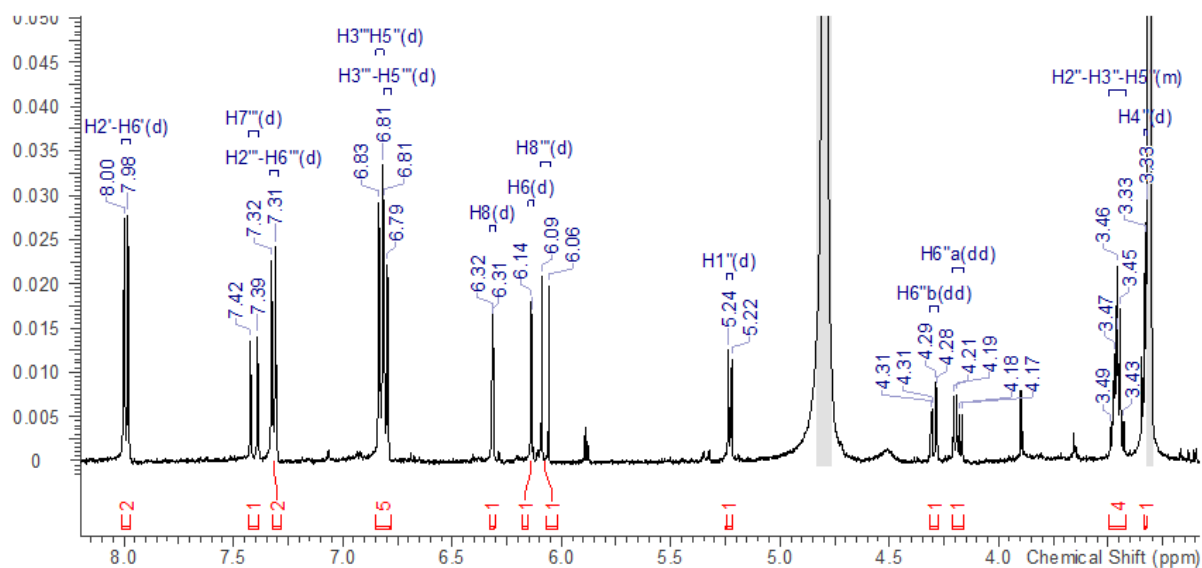


Figure 2.57 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de la molécule A11

On observe également un proton anomérique à δ ppm 5.23 (d, $J = 7.5$ Hz), qui en HMBC corrèle avec le C3 de la génine.

La COSY nous permet de déterminer un β -D-glucose (tableau 2.10) comme dans les composés A6 et A12 et par comparaison avec la littérature (Agrawal, 1992; Markham and Chari, 1982).

Comme pour l'hétéroside A12, les spectres de A11 possèdent des protons et carbones supplémentaires attribuables à un ester hydroxy-4-*E*-cinnamate (*para-E*-coumarate). Les corrélations HMBC et COSY, ainsi que la littérature (Budzianowski and Skrzypczak, 1995; Jagan Mohan Rao et al., 2002) nous permettent de confirmer le groupement *para-E*-coumaroyl en position 6 du glucose, comme dans la molécule A12 (Tableau 2.10).

Ainsi la molécule A11 est identifiée comme le **kaempférol-3-*O*- β -D-(6''-*O*-*trans-p*-coumaroyl)-glucopyranoside**, aussi appelé **tiliroside** (Figure 2.58). L'ensemble des données spectrales (Tableau 2.10) coïncident avec celles de la littérature (Budzianowski and Skrzypczak, 1995; Costa et al., 2007).

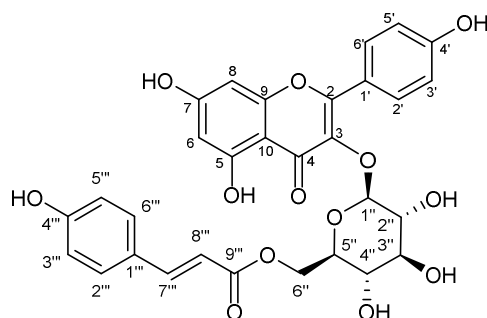


Figure 2.58 : Structure du kaempférol-3-O-β-D-(6''-O-trans-p-coumaroyl)-glucopyranoside (A11)

Le tiliroside est présent dans plusieurs plantes, mais il n'est pas ubiquitaire. On le retrouve notamment dans le genre *Helichrysum* (Schinella et al., 2007). De nombreuses activités biologiques lui sont attribuées, comme antioxydant et anti-inflammatoire (Sala et al., 2003), hépato-protecteur (Matsuda et al., 2002). Cette molécule est également citée dans une demande de brevet cosmétique qui revendique son association à un peptide (Courtin, 2009) pour une activité anti-âge et plus particulièrement la stimulation de la synthèse de collagène de type I.

b.1.3 Quercétine monoglycosylée

❖ Détermination structurale du composé A8

Le composé **A8** est obtenu sous forme d'une poudre jaune et développe une couleur orange en CCM à 365 nm après révélation au Neu-PEG. Son spectre UV est similaire à celui des composés précédents (λ_{\max} à 203, 256, 350 nm) (Markham, 1982).

L'analyse HRMS conduit à l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 449,107 soit une formule brute en $C_{21}H_{20}O_{11}$. On observe également un fragment à m/z 303, dû à la perte d'un désoxyhexose, comme dans le cas de l'afzeline **A7** et de la myricitrine **A9**. D'après le DNP, il pourrait s'agir d'une pentahydroxyflavone portant un rhamnose.

Détermination de la structure de la génine:

Les spectres de RMN montrent les protons et carbones caractéristiques des cycles A et C des aglycones précédentes : myricétine ou kaempférol. (Tableau 2.10).

Une différence est observée au niveau du cycle B (Figure 2.59). On observe deux doublets à δ 6,90 (*d*, 8.3 Hz) et 7,34 (*d*, 2.1 Hz) et un doublet dédoublé à 7,31 ppm (*dd*, 8.3, 2.1 Hz). Il s'agit d'un système ABX d'un cycle benzénique trisubstitué en *para* et *meta*. La petite constante de couplage indique un couplage entre protons en position *meta* et la grande constante de couplage, de protons en position *ortho*. Le cycle B est donc probablement hydroxylé aux positions 3' et 4' (Kim et al., 2004b).

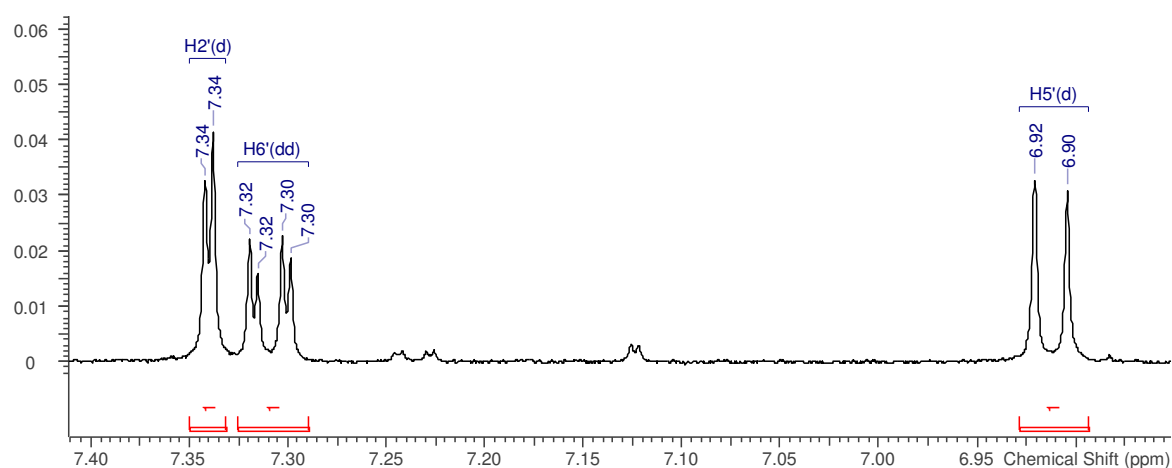


Figure 2.59 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de la molécule A8 (zoom sur les protons du cycle B du flavonoïde)

Les corrélations HMBC et COSY sont présentées sur la figure 2.60.

L'ensemble de ces informations et la comparaison avec les données de la littérature (Yan et al., 2002), confirment que le flavonol de A8 est la **quercétine**.

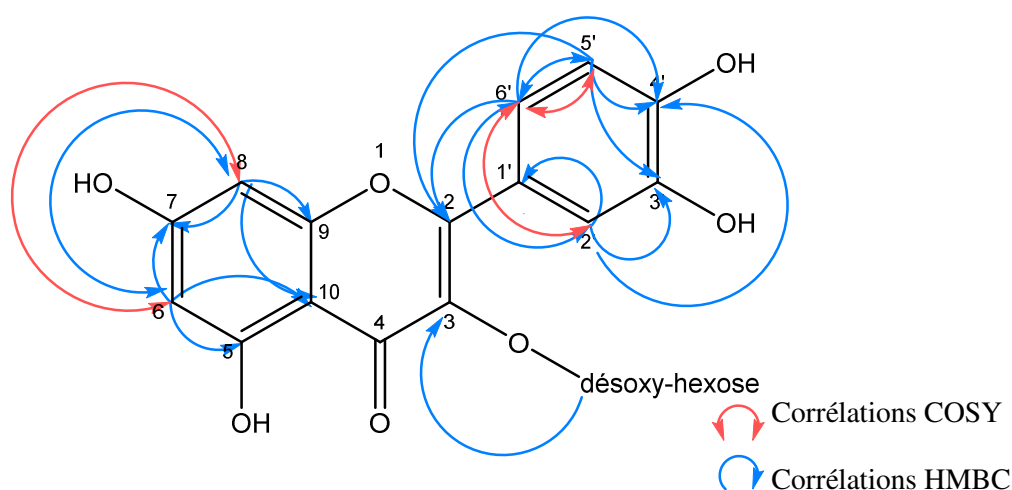


Figure 2.60 : Corrélations HMBC et COSY déterminantes pour l'élucidation structurale de la molécule A8

Détermination de la structure du sucre :

Les protons entre 3 et 4 ppm correspondent aux protons osidiques, ce qui est confirmé par la présence d'un proton anomérique à δ 5,35 ppm (*d*, 1,5 Hz). Le méthyle à δ 0,94 est caractéristique d'un 6-désoxy-hexose. Les constantes de couplage, multiplicités et corrélations présentées dans le tableau 2.10, ainsi qu'une comparaison avec la littérature (Jagan Mohan Rao et al., 2002; Jayaprakasha et al., 2006) nous permettent de confirmer que l'ose est bien un α -L-rhamnopyranose comme précédemment.

La molécule **A8** est donc la **quercétine-3-O- α -L-rhamnopyranoside** également appelée **quercitrine** (Figure 2.61).

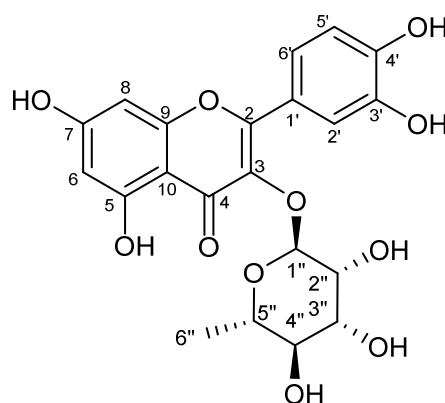


Figure 2.61 : Quercétine-3-O- α -L-rhamnopyranoside (A8)

Cette molécule a déjà été identifiée dans de nombreuses plantes dont le genre *Limonium* (Lin and Chou, 2000). Cette molécule présente des activités antivirale (Choi et al., 2009) et anti-inflammatoire (Erdemoglu et al., 2008).

❖ **Détermination structurale du composé A10**

L'analyse HRMS conduit à l'identification de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 491,1176 et l'adduit sodium correspondant $[M+Na]^+$ à m/z 513,0996, d'où une formule brute en $C_{23}H_{22}O_{12}$. Par rapport au composé **A8** précédent, on observe pour le composé **A10** un gain de 42 uma soit un acétate.

Les spectres RMN des deux composés **A8** et **A10** sont très proches et similaires pour la partie quercétine (Tableau 2.10).

Les différences portent sur le α -L-rhamnose où le proton H4'' est beaucoup plus déblindé à 4,81 ppm au lieu de 3,35 ppm, ce qui suggère une position estérifiée dans le composé **A10**.

On observe un méthyle singulet supplémentaire à 2,05 ppm, et sur le spectre ^{13}C , on détecte deux carbones supplémentaires, l'un à 172,5 (carbonyle d'ester) et le second à 19,6 ppm (méthyle). L'ensemble de ces signaux appartiennent à un groupe acétyle estérifiant la position 4 du rhamnose. Cette estérification est confirmée par une corrélation HMBC entre les protons de l'acétyle à 2,05 ppm et le carbone C 4 du rhamnose à 73,6 ppm.

Les données spectrales sont également comparées à la littérature (Masuda et al., 1991), ainsi la molécule **A10** a été identifiée à la **quercétine-3-O- α -L-(4''-O-acétyl)-rhamnopyranoside** (Figure 2.62).

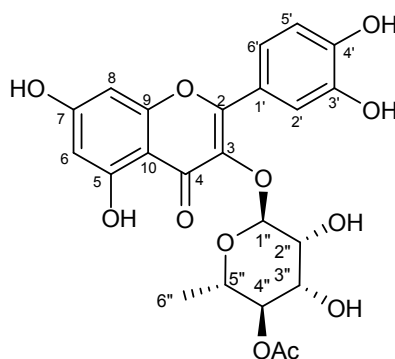


Figure 2.62 : Quercétine-3-O- α -L-(4''-O-acétyl)-rhamnopyranoside (A10)

L'acétylation de la partie osidique des flavonoïdes est quelque chose de relativement courant (Masuda et al., 1991; Timbola et al., 2002; Wojdyło et al., 2017). Cette structure a déjà été identifiée dans l'espèce *Polygonum capitatum* (Zhao et al., 2011) ou encore dans *Scurrula ferruginea* (Lohézic-Le Dévéhat et al., 2002). Des activités biologiques ne semblent pas décrites pour ce flavonoïde.

b.2 Hétérosides flavoniques di-glycosylés

b.2.1 Détermination structurale des génines

Parmi les dix hétérosides isolés :

- trois sont des hétérosides de myricétine : **B2, B5, B8**,
- deux sont des hétérosides de **kaempférol** : **B4 et B7**,
- trois sont des hétérosides de **quercétine** : **B3, B6, B9**.

Pour tous ces composés, la structure de l'aglycone a été établie comme précédemment, à partir de l'analyse des spectres de RMN 1H, 13C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, et par la mise en évidence des protons et carbones caractéristiques de chaque flavonol (Tableau 2.9).

Seul le composé **B10** possède la **syringétine** comme flavonol. Sur son spectre de RMN 1H, on observe les deux protons *meta* du cycle A à 6.14 ppm (2 H, d, $J=2.0$ Hz, H6) et 6.33 ppm (2 H, d, $J=1.8$ Hz, H8), ainsi que le singulet du cycle B à 7.56 ppm (2 H, s, H2', H6') comme dans le cas de la myricétine (Figure 2.63).

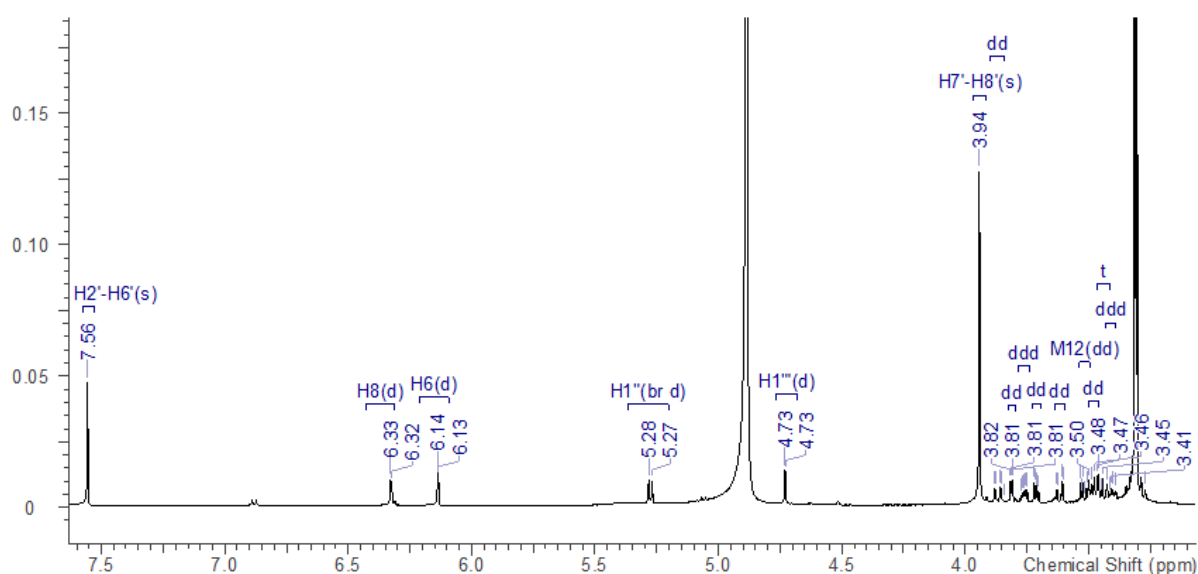
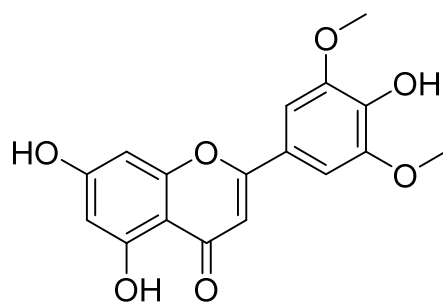
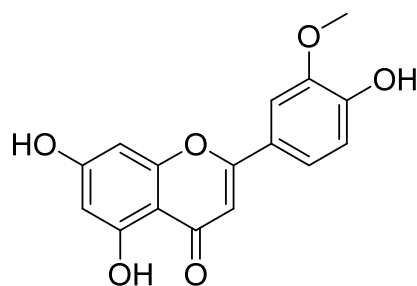


Figure 2.63 : Spectre RMN 1H (500 MHz, CD₃OD) de la molécule B10

De plus, un méthyle singulet est détecté à δ 3.94 (6 H, s) dont le déplacement chimique est caractéristique d'un méthoxy. Le fait que ce signal s'intègre pour 6 protons, signifie que l'on a deux méthoxy équivalents en position 3' et 5' de la myricétine puisque la symétrie du noyau B est conservée. Ceci est confirmé par une corrélation HMBC entre le singulet des méthoxy et les C3' et C5'. On observe également un effet nOe entre H2'-H6' et les protons des méthoxy. L'HSQC nous indique que les carbones des méthoxy sont équivalents à δ ppm 55,3. Pour confirmer la présence de la syringétine, les données sont comparées à celles de la littérature (Guo et al., 1998).

**Figure 2.64 : Syringétine**

De même seul le composé **B11** est un hétéroside d'**isorhamnétine**. Dans son spectre de RMN ^1H , on retrouve les signaux caractéristiques de la quercétine : les deux protons en *meta* du cycle A à δ ppm 6.14 (1 H, d, $J=3.5$ Hz, H6) et 6.32 (1 H, d, $J=3.5$ Hz, H8), et pour le cycle B les deux doublets à δ ppm 6.91 (1 H, br d, $J=8.2$ Hz, H2') et 7.95 (1 H, br d, $J=1.7$ Hz, H5') et un doublet de doublets à δ ppm 7.63 (1 H, dd, $J=8.4, 1.4$ Hz, H6'). Néanmoins, on observe également un méthoxy singulet δ 3.95 (3 H, s). La position du méthoxy sur le C3' est obtenue par une corrélation HMBC entre les protons du méthoxy et le C3'. L'HSQC nous indique que ces protons sont portés par un carbone à δ ppm 56,8. On observe également un effet nOe entre H2'-H6' du cycle et les protons du méthoxy. Pour confirmer la structure de l'isorhamnétine, et notamment la position du méthoxy entre la position 3' et 4' les données sont comparées à celle de la littérature (Carotenuto et al., 1997).

**Figure 2.65 : Isorhamnétine**

b.2.2 Détermination de l'enchaînement α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucofuranose (rutinose) et structure des composés B2, B3, B4, B11

Quatre hétérosides possèdent le même enchaînement diglycosidique α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucofuranose, lié à l'hydroxyle du carbone C3 du flavonol. Il s'agit des composés **B2**, **B3**, **B4**, **B11**.

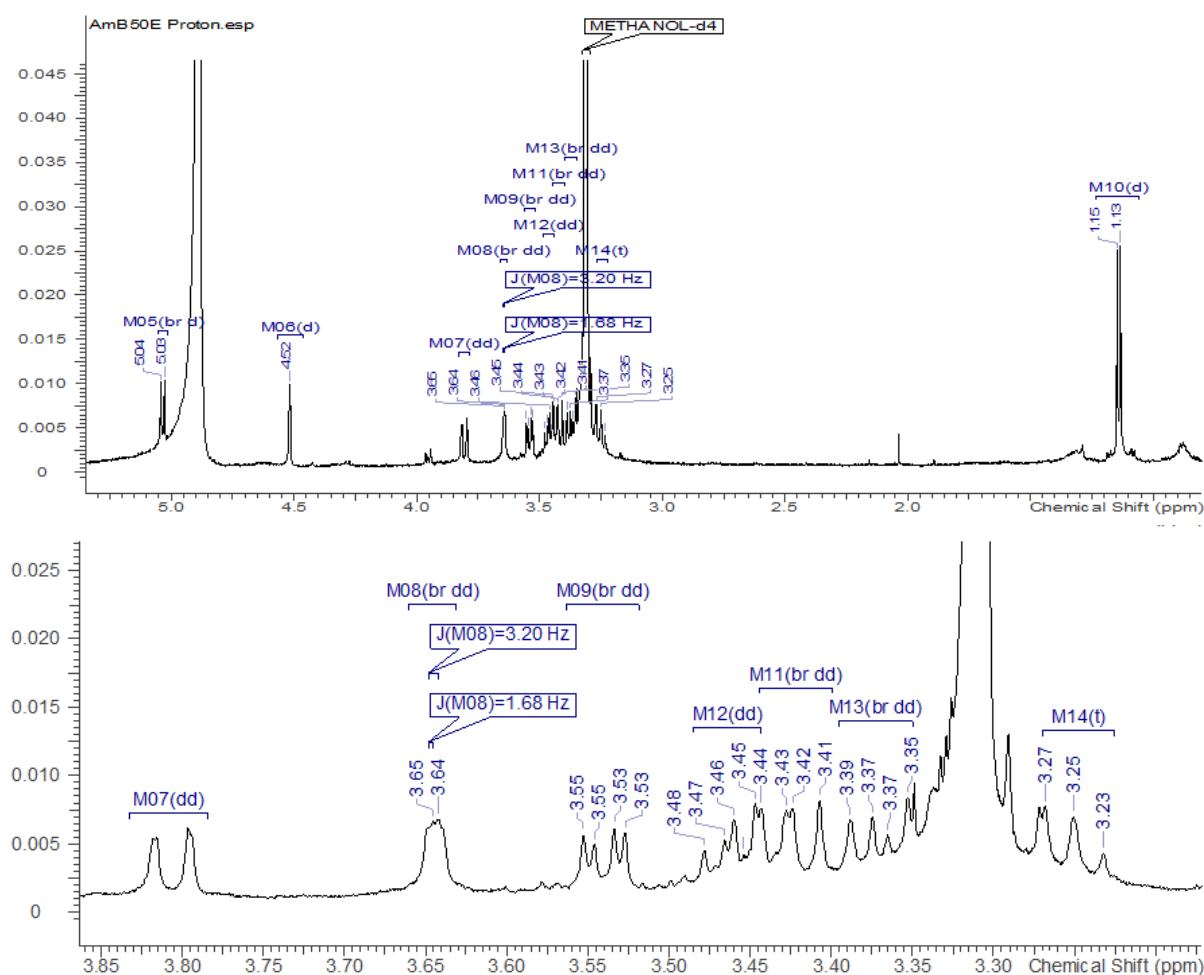


Figure 2.66 : Spectre RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) de la partie osidique de flavonol-rutinose (cas du B4)

❖ Démonstration de l'élucidation structurale du rutinose - cas de B2

Le spectre HRMS montre un ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 627, 1552 ($[M+Na]^+$ à m/z 649, 1366), pour une formule brute en C₂₇H₃₀O₁₇ (Figure 2.67). Deux fragments sont observés à m/z 481 et 319 du fait de la perte successive des unités osidiques : une de 146 Da pour un 6-désoxy-hexose terminal (rhamnose) et une seconde de 162 Da pour l'hexose (glucose) lié au flavonol.

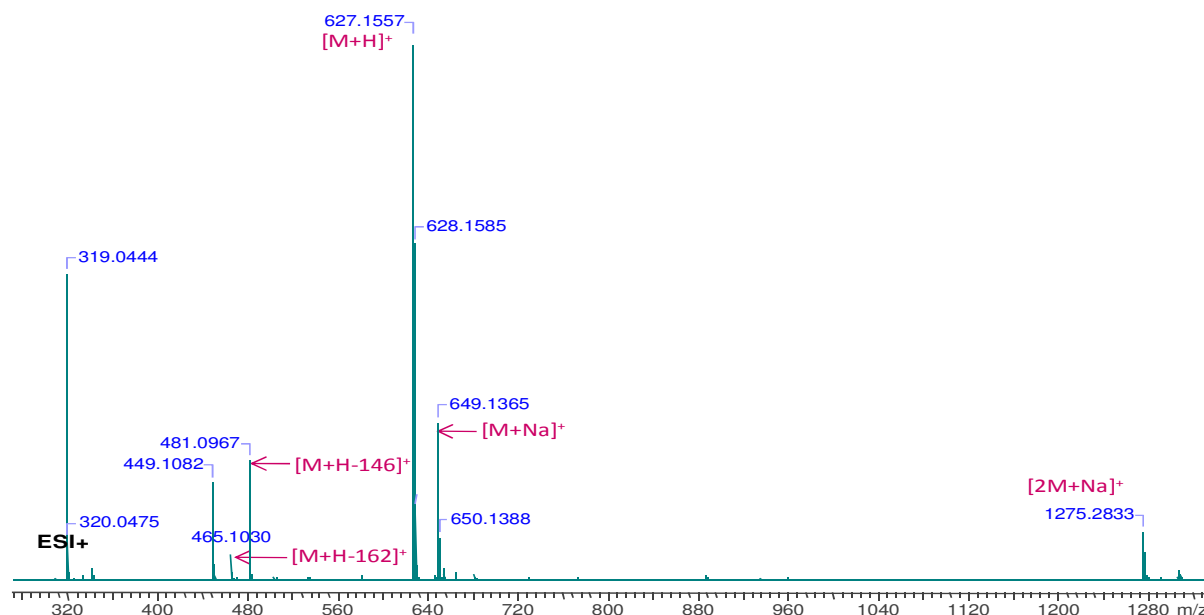


Figure 2.67 : Spectre de masse (ESI⁺-QTOF) de la molécule B2

Sur le spectre de RMN ¹H, on détecte deux protons anomériques à δ 4.53 ppm (d, $J=1.2$ Hz, H1''') et 5.08 (1 H, d, $J=7.8$ Hz, H1''). Le proton à 5,08 ppm est lié au flavonol puisqu'il corrèle en HMBC avec le C3 de la myricétine.

L'analyse du spectre COSY permet de déterminer les enchaînements protonés des deux unités osidiques, et ainsi de faire leurs attributions. Les corrélations ¹J_{H-C} déterminées à partir du spectre HSQC permettent d'attribuer les carbones osidiques (Tableau 2.11).

L'anomère à 5,08 ppm est celui d'un β-D-glucopyranose avec des protons en position axiale, et le second anomère à 4,53 ppm est attribué à un α-L-rhamnopyranose (Agrawal, 1992; Scharbert et al., 2004). Pour ce 6-désoxyhexose, on observe un effet nOe entre son H1''' et les protons H6'' du glucose, ce qui établit la séquence α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)- β-D-glucopyranose (rutinoside). Cet enchaînement est confirmé en HMBC par l'observation d'une corrélation entre H1'''' du rhamnose et le CH₂-6'' à 68.7 ppm du glucose.

La molécule **B2** est identifiée comme étant la **myricétine-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1'''→6'')-β-D-glucopyranoside**, aussi appelée **myricétine-3-O-rutinoside** (Figure 2.68) (Scharbert et al., 2004).

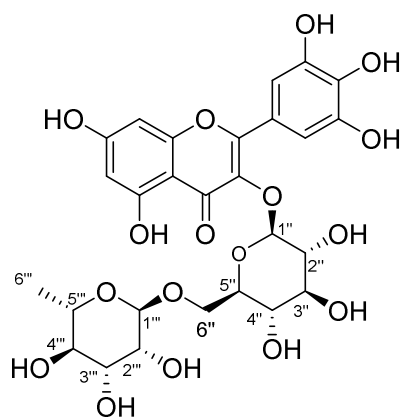


Figure 2.68 : Myricétine-3-*O*-rutinoside (B2)

La myricétine-3-*O*-rutinoside est un hétéroside de flavonol assez répandu. On le retrouve dans des familles très différentes comme les Fabaceae (Kazuma et al., 2003), les Euphorbiaceae (Camero et al., 2017) ou encore dans différentes baies (Tian et al., 2017).

❖ Structures des hétérosides B3, B4 et B11 :

La molécule **B3** a été de la même façon identifiée comme étant la **quercétine-3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside**, aussi appelée **quercétine-3-*O*-rutinoside** ou plus simplement **rutine** (Figure 2.69) (Scharbert et al., 2004).

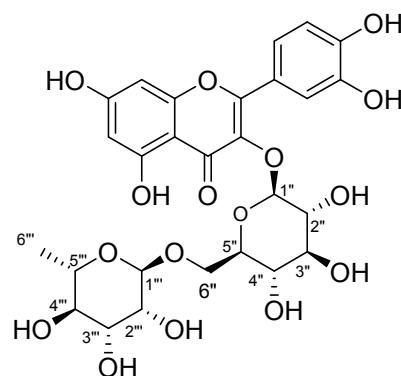


Figure 2.69 : Quercétine-3-*O*-rutinoside (B3)

La rutine est une molécule très largement distribuée dans le règne végétal. Elle a été, entre autres, identifiée dans la famille des Plumbaginaceae, dans le genre *Limonium* notamment (Korul'kina et al., 2004). Une étude a montré que la rutine pouvait présenter une activité anti-inflammatoire plus importante que son aglycone (Guardia et al., 2001).

La molécule **B4** est identifiée comme étant le **kaempférol-3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1'' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside**, aussi appelée **kaempférol-3-*O*-rutinoside** ou plus simplement la **nicotiflorine** (Figure 2.70) (Scharbert et al., 2004).

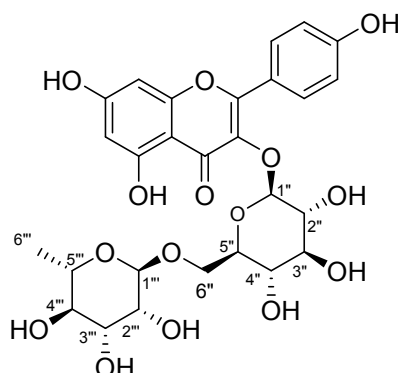


Figure 2.70 : Kaempférol-3-*O*-rutinoside (B4)

La nicotiflorine est également une molécule très largement distribuée dans le règne végétal qui présente également une activité anti-inflammatoire (Sekine et al., 1993) et neuroprotective (Li et al., 2006).

Après comparaison des données spectrales avec la littérature (Kim et al., 2009), la molécule **B10** est identifiée comme étant la **3'-methoxy-quercétine-3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside**, aussi appelée **isorhamnetine-3-*O*-rutinoside** (Figure 2.71).

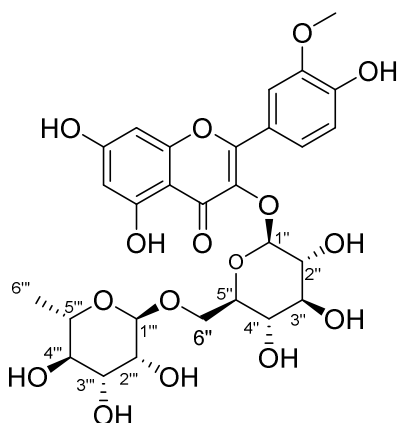


Figure 2.71 : Isorhamnetine-3-*O*-rutinoside (B11)

Cette molécule a déjà été identifiée dans de nombreuses plantes comme par exemple dans l'argousier (Guo et al., 2017) ou encore le calendula (Moraes et al., 2016).

b.2.3 Détermination de l'enchaînement α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranose (vicianose) et structure de B5, B6 et B7

Trois hétérosides possèdent le même enchaînement diglycosidique α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside, lié à l'hydroxyle du carbone C3 du flavonol. Il s'agit des composés **B5**, **B6** et **B7**.

❖ Démonstration de l'élucidation structurale du vicianose - cas de B5

L'analyse HRMS de **B5** conduit à l'identification des ions pseudo-moléculaires $[M+H]^+$ à m/z 613,1392 et $[M+Na]^+$ à m/z 635,1211, d'où une formule brute de $C_{26}H_{28}O_{17}$. Deux pertes caractéristiques sont observées, une de 132 Da (fragment à m/z 481) pour un pentose terminal et une seconde de 162 Da (fragment à m/z 319) correspondant à un hexose.

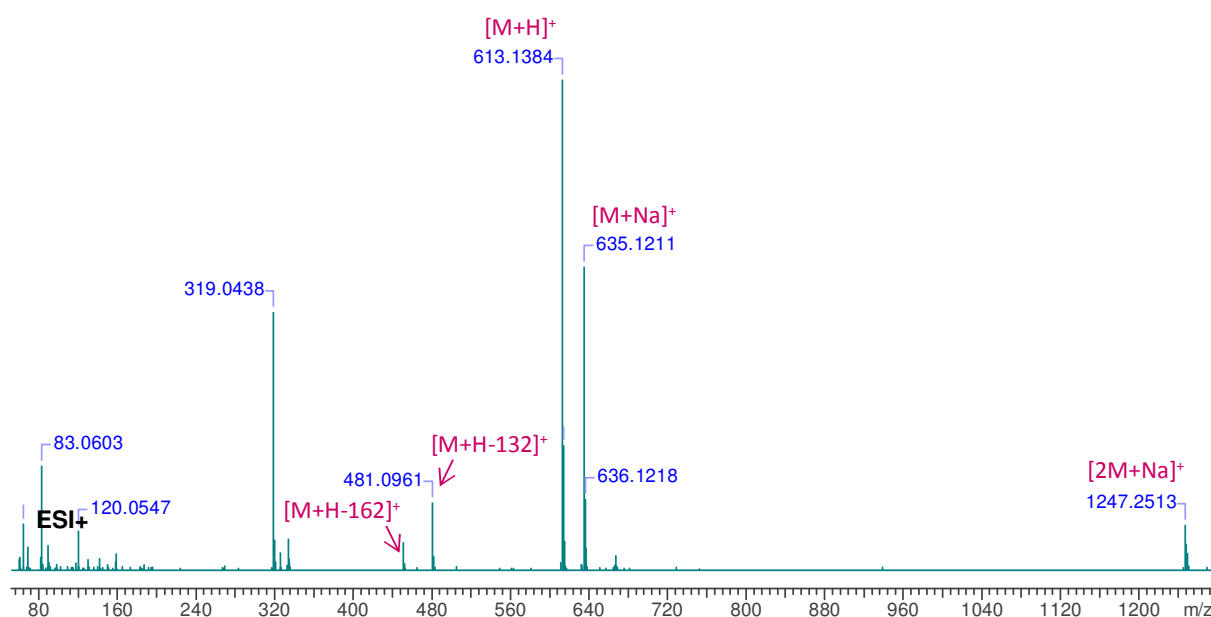


Figure 2.72 : Spectre de masse (ESI⁺-QTOF) de la molécule B5

On observe sur le spectre de RMN 1H, la présence de deux protons anomériques à δ ppm 4.04 (1 H, d, $J=7.2$ Hz, H1'''), 5.19 (1 H, d, $J=7.9$ Hz, H1''). Les deux protons présentent une constante de couplage caractéristique de protons H1 et H2 *trans* di-axiaux. Sur le spectre HMBC, le proton à 5,19 ppm corrèle avec le C3 du flavonol (ici myricétine) ; quant au proton à 4,04 ppm, il corrèle avec un CH₂ à 69,4 ppm probablement le C6 de l'hexose. Ainsi nous

pouvons déjà dire qu'il s'agit d'une myricétine glycosylée en position 3 par une chaîne pentose-(1-6)-hexose.

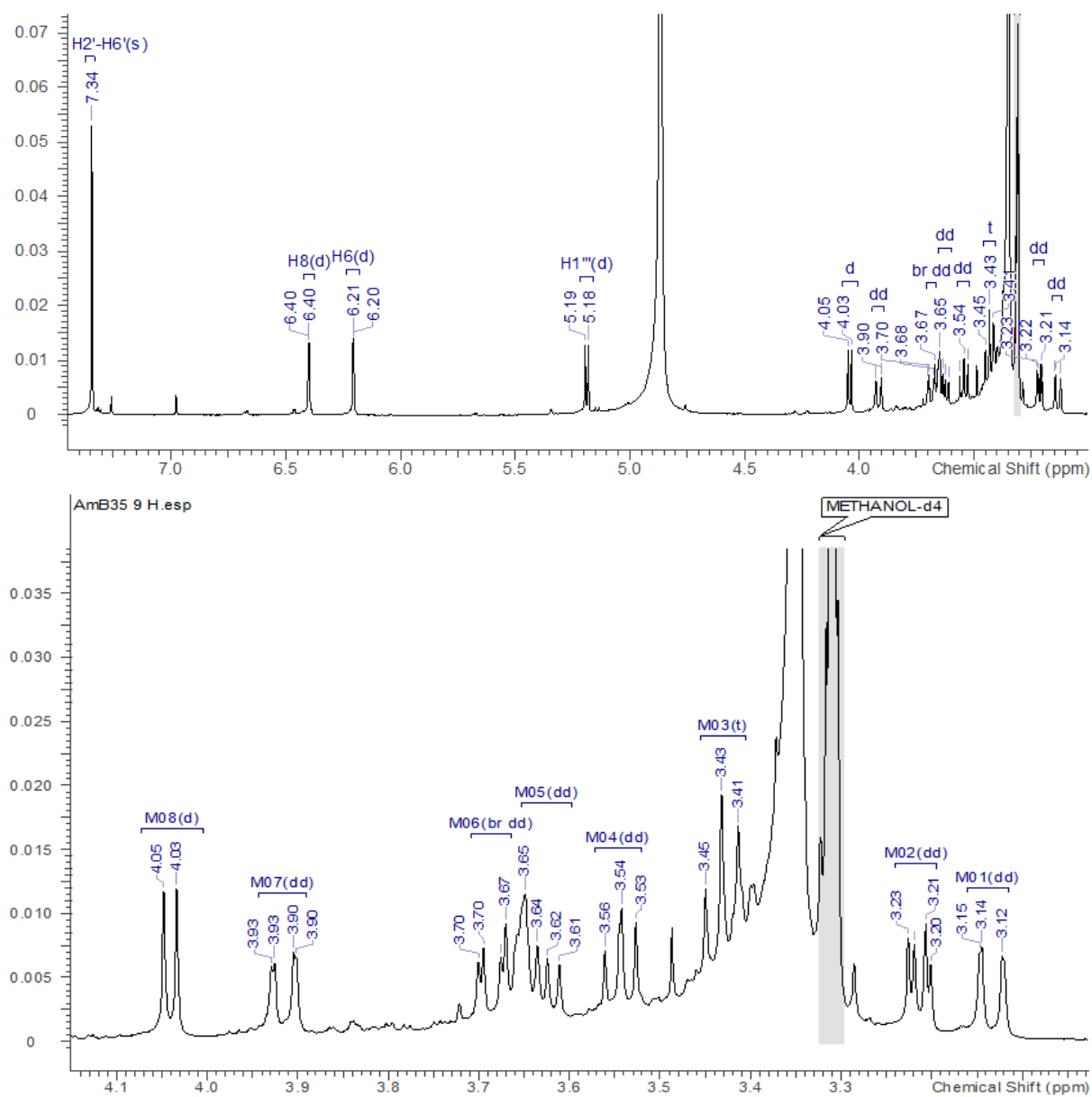


Figure 2. 73 : Spectre RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) de la molécule B5

Des analyses de TOCSY sélective 1D ont été réalisées pour distinguer les systèmes de spins appartenant à chacune des deux unités osidiques ; pour ce faire on sélectionne les protons anomériques qui sont isolés. La TOCSY 1D apporte des informations fiables sur la multiplicité et les constantes de couplage des signaux susceptibles d'être superposés (Figures 2.74 et 2.75). L'analyse conjointe du spectre COSY est nécessaire pour déterminer l'ordre d'enchaînement entre les différents protons osidiques. (Tableau 2.12).

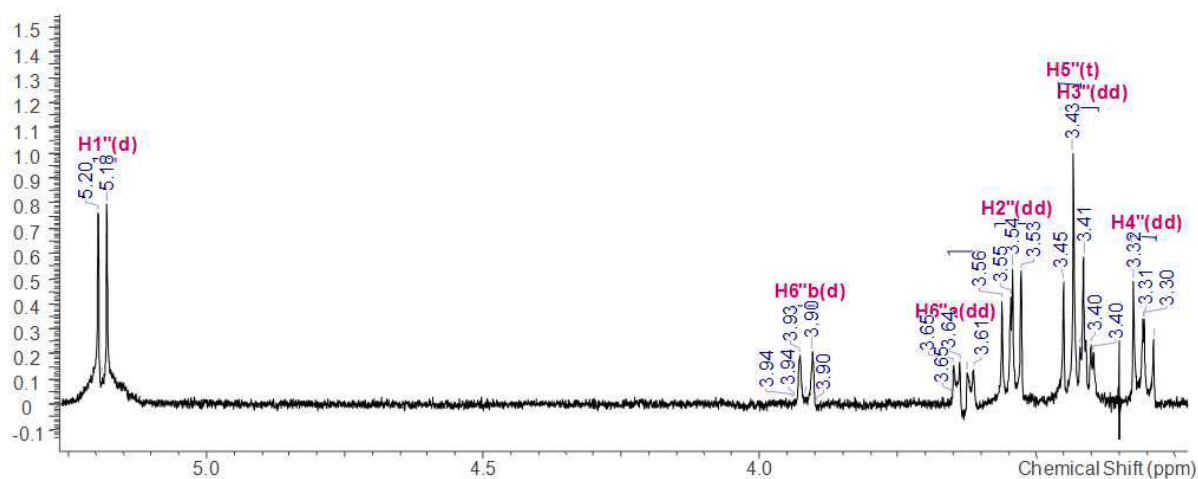


Figure 2.74 : Spectre RMN TOCSY 1D (500 MHz, CD₃OD) du sucre 1 de B5

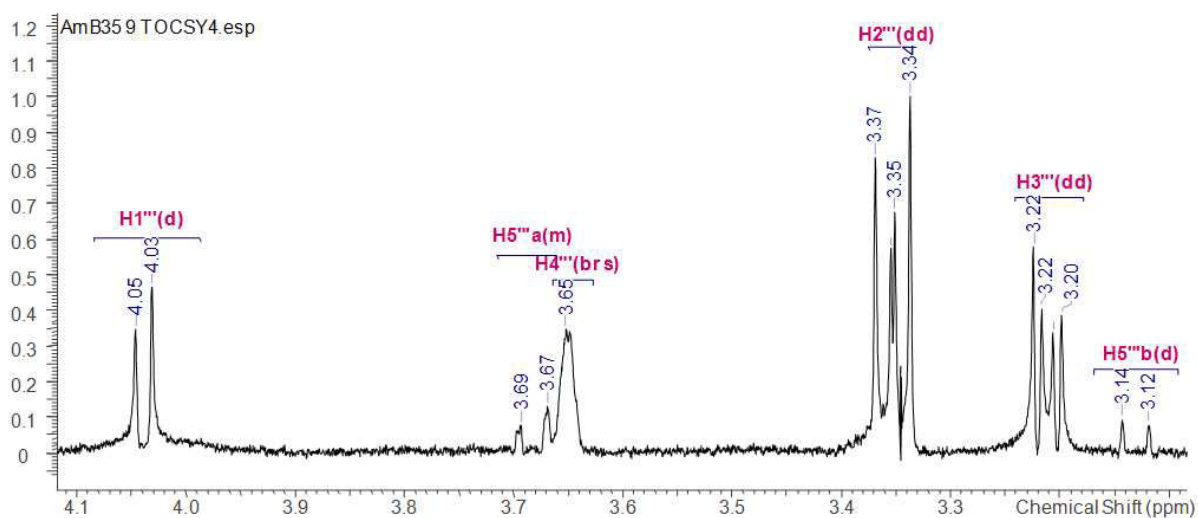


Figure 2.75 : Spectre RMN TOCSY 1D (500 MHz, CD₃OD) du sucre 2 de B5

Pour l'hexose, toutes les constantes de couplages mesurées sont ≥ 8 Hz, et les protons sont tous en position axiale. Le spectre NOESY montre un effet nOe entre les protons α -axiaux du pyranose : H1'' et H3'', H5''. L'ensemble des données comparées à celle de la littérature (Agrawal, 1992; Movsumov et al., 2006) confirme qu'il s'agit bien du β -D-glucopyranose.

Pour le pentose, les J_{H1-H2} J_{H2-H3} sont de 7,2 et 9,8 Hz respectivement, ce qui signifie que les trois protons H1''', H2''', H3''' sont en position *trans* di-axiale. La J_{H3-H4} est de 3,6 Hz, ce qui est caractéristique d'une relation protonée axiale-équatoriale, donc H4''' est en position équatoriale. Un effet nOe est observé entre H1''' H5'''b, ce qui signifie que ce dernier est en position axiale. Le C5''' étant assez déblindé, il semble que celui-ci soit en α de l'oxygène de l'hétérocycle. Toutes ces données convergent vers un pentopyranose : l' α -L-arabinopyranose.(Tableau 2.12) (Agrawal, 1992; Movsumov et al., 2006).

La molécule B5 a été identifiée à la **myricétine-3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1'''' \rightarrow 6'')- β -D-glucofuranoside**, pouvant également être appelée myricétine-3-*O*-vicianoside (Figure 2.76).

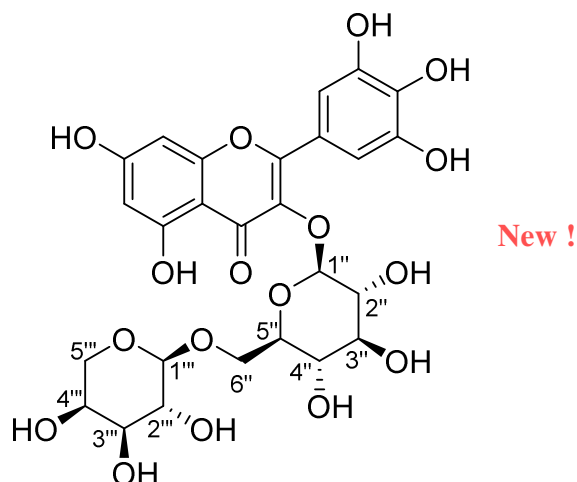


Figure 2.76 : Myricétine-3-*O*-vicianoside (B5)

Cette molécule est un hétéroside flavonique original non isolé ni caractérisé auparavant. En effet, sa présence n'a jamais été signalée dans la littérature bien que la myricétine soit un flavonol courant et que le vicianose ait déjà été décrit sur d'autres flavonoïdes (cf. B6 et B7).

❖ Structures des hétérosides B6 et B7 :

Une analyse similaire des données spectrales de B6 et B7, nous a permis de conclure que :

- le composé B6 est la quercétine-3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucofuranoside, également appelée quercétine-3-*O*-vicianoside ou peltatoside (Figure 2.77).

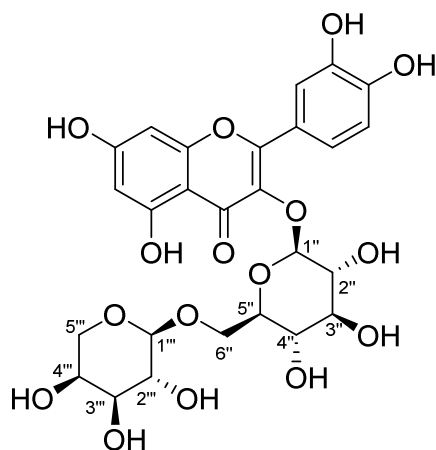


Figure 2.77 : Quercétine-3-*O*-vicianoside (B6)

Cette molécule a déjà été identifiée dans différentes familles botaniques et notamment dans l'espèce halophile *Atriplex lindleyi* (Souda et al., 2015). Peu d'études biologiques ont été faites sur cette molécule, néanmoins elle s'est révélée être anti-nociceptive (Oliveira et al., 2017).

- le composé B7 est le kaempférol-3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside, encore appelé **kaempférol-3-*O*-vicianoside** (Figure 2.78).

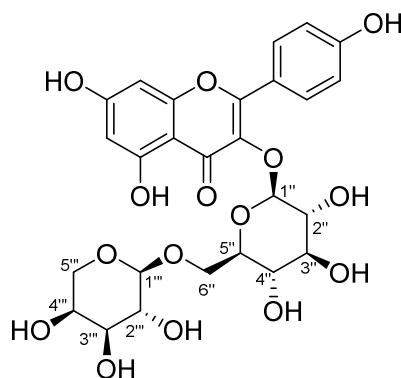


Figure 2.78 : Kaempférol-3-*O*-vicianoside (B7)

La présence du kaempférol-3-*O*-vicianoside n'a été signalée que quatre fois dans la littérature, notamment dans *Corydalis bungeana* (Xie et al., 2004) et *Helianthemum sessiliflorum* (Benabdelaziz et al., 2017). Aucun test d'activité biologique n'a été réalisé sur cette molécule.

b.2.4 Détermination de l'enchaînement α -L-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranose, et structures de B8, B9 et B10

Trois hétérosides flavoniques B8, B9 et B10 se composent respectivement de myricétine, de kaempférol, et de syringitine, glycosylés par une chaîne disaccharidique similaire à celle α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside, mais où l'arabinose est un furanose.

Ainsi les hétérosides B8 et B9 sont des isomères des hétérosides B5 et B6 et possèdent des spectres de HRMS identiques.

❖ **Démonstration de l'élucidation structurale du α -L-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside - cas de B8**

Sur le spectre de RMN ^1H de B8, on observe bien la présence des deux protons anomériques à δ ppm 4.76 (1 H, d, $J=1.3$ Hz, H1''') pour l'arabinose et 5.14 (1 H, d, $J=8.0$ Hz, H1'') pour le glucose. La constante de couplage $J_{\text{H1}'''\text{-H2}''}$ est beaucoup plus faible que celle précédemment mesurée pour l' α -L-arabinopyranose.

On détecte sur les spectres DEPT et HSQC, le CH_2OH de l'arabinofuranose à 62,8 ppm, à un déplacement blindé par rapport à la valeur observée dans la molécule B5 (66,9 ppm) qui s'explique par la position libre du CH_2OH en dehors du cycle, en β de l'oxygène hémiacétalique. De façon inverse le C4''' est fortement déblindé à 85.7 ppm (au lieu de 69.7 ppm dans B5 ; $\Delta = +16$ ppm) du fait de sa participation dans le cycle furanique.

Toutes les constantes de couplage des protons H1''', H2''', H3''', H4''' sont faibles, ≤ 5.6 Hz ce qui indique des angles dièdres entre 45° et 90° .

L'ensemble des données (Tableau 2.13) sont comparées à celles de la littérature (Agrawal, 1992; Markham and Chari, 1982; Yang et al., 2003) et confirment qu'il s'agit bien de l' α -L-arabinofuranose.

La molécule B8 est identifiée comme étant la **myricétine-3-O- α -L-arabinofuranosyl-(1''' \rightarrow 6')- β -D-glucopyranoside**.

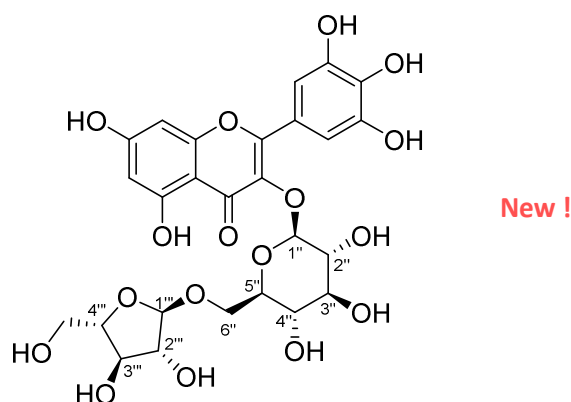


Figure 2.79 : Myricétine-3-O- α -L-arabinofuranosyl-(1''' \rightarrow 6')- β -D-glucopyranoside (B8)

Cette structure n'a jamais été signalée dans la littérature. Cette molécule a donc été décrite ici pour la première fois. L'enchaînement osidique avait déjà été identifié dans la gossypétine (7-hydroxyquercétine) en position 7 (Yang et al., 2003).

❖ Structure des hétérosides B9 et B10

La molécule B9 est identifiée à la **quercétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside** (Figure 2.80).

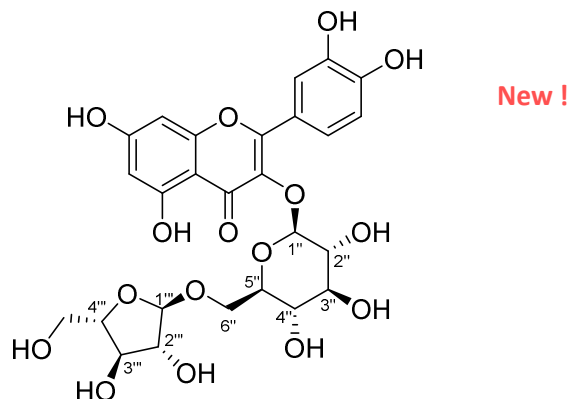


Figure 2.80 : Quercétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside (B9).

Cette structure n'a jamais été signalée dans la littérature. Cette molécule a donc été identifiée ici pour la première fois.

La molécule B10 est identifiée comme étant la 3'-5'-diméthoxy-myricétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside, aussi appelée **syringétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside** (Figure 2.81).

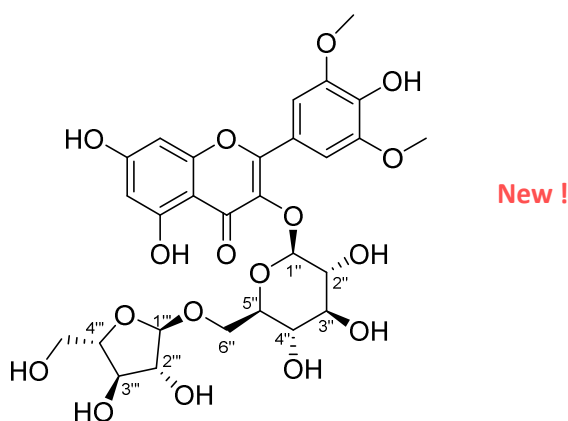


Figure 2.81 : Syringétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside (B10)

Cette structure n'a jamais été signalée dans la littérature. Cette molécule a donc été identifiée ici pour la première fois.

Tableau 2.9 : Déplacement chimiques des 5 aglycones de flavonol d'*A. maritima*

Position	Kaempférol (A7)		Quercétine (A10)		Myricétine (B8)		Isorhamnétine (B11)		Syringétine (B10)	
	δ C	δ H, m (J/Hz)	δ C	δ H, m (J/Hz)	δ C	δ H, m (J/Hz)	δ C	δ H, m (J/Hz)	δ C	δ H, m (J/Hz)
2	158,7		158,2		159,5		158,5		158,1	
3	136,3		134,1		135,8		135,5		135,6	
4	179,7		178,1		179,6		179,0		178,9	
5	163,4		161,8		163,2		162,9		163,0	
6	100	6.20, d (2.1)	98,5	6.21, d (2.1)	100	6.20, d (2.0)	101,5	6.14, d (3.5)	101,5	6.14, d (2.0)
7	166,2		164,5		166,1		170,5		170,4	
8	94,9	6.38, d (2.1)	93,4	6.38, d (2.1)	94,9	6.39, d (2.0)	96,0	6.32, d (3.5)	96,0	6.33, d (1.8)
9	159,4		157,2		158,6		159,0		158,9	
10	106		104,5		105,9		104,6		104,7	
1'	122,8		121,5		122,3		124,1		122,0	
2'	132	7.77, d (8.9)	115,5	7.31, d (2.0)	110,4	7.26, s	114,6	7.95, d (1.5)	108,3	7.56, s
3'	116,7	6.94, d (8.9)	145,2		146,5		151,2		148,9	
4'	161,7		148,4		138,2		148,5		140,2	
5'	116,7	6.94, d (8.9)	114,9	6.92, d (8.3)	146,5		116,3	6.91, d (8.3)	148,9	
6'	132	7.77, d (8.9)	121,3	7.26, dd (8.3, 2.0)	110,4	7.26, s	123,1	7.63, dd (8.3, 1.5)	108,3	7.56, s
7'							56,8	3.95, s	57,2	9.94, s
8'									57,2	9.94, s

Tableau 2.10 : Déplacements chimiques de la partie osidique des sept monoglycosides d'*A. marina*

Position	A11		A6		A12		A7		A9		A10		A8
	δ C	δH, m (J Hz)	δ C	δH, m (J Hz)	δ C	δH, m (J Hz)	δ C	δH, m (J Hz)	δ C	δH, m (J Hz)	δ C	δH, m (J Hz)	δH, m (J Hz)
1"	104	5.23, d (7.5)	104,4	5.25, d (7.9)	103,5	5.28, d (7.9)	103,6	5.38, d (1.8)	103,8	5.32, d (1.5)	101,1	5.49, d (1.6)	5.35, d (1.5)
2"	76,2	3.46, m	75,9	3.51, t (9.0)	75,6	3.55 t (8.5)	72,1	4.22, dd (3.3, 1.8)	72,0	4.23, dd (3.2, 1.5)	70,3	4.21, dd (3.2, 1.6)	4.22, dd (3.3, 1.5)
3"	78,4	3.46, m	78,4	3.44, t (9)	78,0	3.45	72,2	3.71, dd (9.0, 3.3)	72,2	3.80, dd (9.5, 3.2)	68,7	3.88, dd (9.7, 3.2)	3.75, dd (9.4, 3.3)
3 ^{se}	72,1	3.33, d (1.7)	71,2	3.39, t (9)	71,7	3.36	73,3	3.34, m	73,5	3.35, t (9.6)	73,6	4.81, m	3.33, m
	76,1	3.46, m	78,5	3.23, ddd (7.3, 4.5, 2.3)	75,9	3.45	72,2	3.34, m	72,3	3.52, dq (9.6, 6.2)	68,2	3.35, m	3.42, m
6"	64,6	4.19, dd (11.8, 6.6) 4.29, dd (11.8, 3.0)	62,3	3.62, dd (12.5, 4.5) 3.73, dd (12.5, 4.5)	64,5	4.22, dd (11.6, 7.0) 4.32, dd (11.6, 1.5)	17,8	0.92, d (5.8)	17,8	0.97, d (6.2)	16,2	0.79, d (6.3)	0.94, d (6.1)
coumaroyl	1 ^{'''}	128			127,1								
	2 ^{'''} -6 ^{'''}	132	7.32, d (8.6)		131,2	7.32, d (8.9)							
	3 ^{'''} -5 ^{'''}	117	6.8, m		116,7	6.79, d (8.9)							
	4 ^{'''}	162			161,1								
	7 ^{'''}	147	7.41, d (16.0)		146,5	7.39, d (16.1)							
8 ^{'''}	115	6.07, d (16.0)		114,7	6.10, d (16.1)								
9 ^{'''}	169			168,9									
OAc	1 ^{'''}										171,1		
	2 ^{'''}										19,6	2.05, s	

Tableau 2.11 : Déplacements chimiques de la partie osidique des quatre hétérosides possédant un enchaînement osidique de type rutinosé

Position	B2		B3		B4		B11	
	δ C	δ H, m (JHz)	δ C	δ H, m (JHz)	δ C	δ H, m (JHz)	δ C	δ H, m (JHz)
1''	105.0	5.08, d (7.8)	105.1	5.07, d (7.6)	105.3	5.04, br d (7.5)	105.0	5.16, d (7.5)
2''	75.8	3.50, dd (9.1, 7.8)	75.9	3.47, t (8.7)	75.9	3.44, dd (9.6, 2.0)	76.1	3.45, m
3''	78.4	3.42, t (9.1)	78.4	3.41, t (8.7)	78.4	3.41, t (8.8)	78.4	3.44, m
4''	71.5	3.28, t (9.1)	71.5	3.26, t (8.7)	70.8	3.25, t (8.8)	71.7	3.25, t (8.5)
5''	77.4	3.33, m	77.3	3.31, m	77.3	3.32, m	77.5	3.38, m
6''	68.7	3.40, dd (10.9, 5.5) 3.81, dd (10.9, 3.0)	68.7	3.81, dd (11.1, 1.2) 3.39, dd (11.1, 6.1)	68.7	3.37, dd (11.0, 6.7) 3.81, dd (11.0, 1.1)	68.7	3.42, dd (9.0, 5.0) 3.82, dd (9.0, 1.0)
1'''	102.6	4.53, d (1.0)	102.6	4.52, d (1.3)	102.6	4.52, d (1.3)	102.7	4.53, d (1.1)
2'''	72.3	3.63, dd (3.3, 1.0)	72.2	3.64, dd (3.5, 1.3)	72.2	3.64, d (1.3)	72.2	3.62, dd (3.4, 1.1)
3'''	72.3	3.55, br dd (9.3, 3.3)	72.4	3.55, dd (9.5, 3.5)	72.4	3.54, dd (9.4, 3.3)	72.4	3.49, dd (9.3, 3.4)
4'''	74.1	3.30, m	74.1	3.55, dd (9.5, 3.5)	74.1	3.29, m	74.0	3.26, t (9.3)
5'''	69.9	3.44, m	69.9	3.55, dd (9.5, 3.5)	69.9	3.46, dd (9.3, 6.3)	69.9	3.42, m
6'''	18.0	1.12, br d (6.2)	17.9	3.55, dd (9.5, 3.5)	18.1	1.14, d (6.3)	18.0	1.11, d (6.3)

Tableau 2.12 : Déplacements chimiques de la partie osidique des trois hétérosides possédant un enchaînement osidique de type vicianose

	B5		B6		B7		
	Position	δ C	δ H, m (J/Hz)	δ C	δ H, m (J/Hz)	δ C	δ H, m (J/Hz)
β -D-gluco- pyranose	1"	104,3	5.19, d (7.9)	104,2	5.20, d (7.7)	104,8	5.13, br d (7.7)
	2"	75,8	3.54, dd (9.5, 7.8)	75,9	3.51, dd (9.7, 7.7)	75,9	3.48, dd (9.0, 7.7)
	3"	78,3	3.41, t (9.5)	78,4	3.40, t (9.7)	78,2	3.41, t (9.0)
	4"	71,6	3.31, dd (9.5, 8.9)	71,6	3.33, dd (9.8, 8.8)	71,6	3.31, t (9.0)
	5"	78,5	3.43, m	78,2	3.42, t (8.8)	78,3	3.40, m
	6"	69,4	3.62, dd (12.3, 3.3) 3.92, dd (12.1, 1.5)	69,3	3.61, dd (12.2, 6.2) 3.91, dd (12.2, 1.8)	69,2	3.61, dd (12.0, 6.1) 3.90, dd (12.0, 1.8)
α -L-arabino- pyranose	1'''	105,0	4.04, d (7.3)	105,0	4.05, d (7.0)	105,5	4.06, d (7.1)
	2'''	72,6	3.36, dd (9.8, 7.3)	72,6	3.37, dd (8.9, 7.0)	72,5	3.39, dd (8.7, 7.1)
	3'''	74,2	3.21, dd (9.8, 3.6)	74,2	3.20, dd (9.1, 3.4)	74,1	3.19, dd (8.7, 3.7)
	4'''	69,7	3.66, m (W 1/2) = 7	69,7	3.65, m	69,7	3.64, m
	5'''	66,9	3.69, br dd (12.4, 2.8) 3.13, dd (12.4, 1.1)	66,8	3.69, dd (12.3, 3.1) 3.14, dd (12.3, 1.4)	68,7	3.69, dd (12.3, 2.90) 3.17, dd (12.3, 1.53)

Tableau 2.13 : Déplacements chimiques de la partie osidique des trois hétérosides possédant un enchaînement osidique de type α -L-arabinofuranosyl-(1'' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside.

		B8		B9		B10	
	Position	δ C	δ H, m (J Hz)	δ C	δ H, m (J Hz)	δ C	δ H, m (J Hz)
β -D-glucopyranose	1''	104,5	5.14, d (7,9)	104,4	5.16, d (7,8)	104,5	5.28, br d (7.3)
	2''	75,8	3.51, dd (9.5, 7,9)	75,8	3.47, dd (9,2; 7,8)	76,1	3.49, m
	3''	78,2	3.42, t (9.5)	78,2	3.41, t (9,2)	78,3	3.45, t (9.3)
	4''	72,0	3.29, dd (9.5, 9.1)	72,0	3.29, dd (9,2; 8,8)	72,0	3.29, m
	5''	77,4	3.38, ddd (9.1, 6.3, 2.3)	77,4	3.47, m	77,6	3.41, ddd (8.4, 6.0, 2.3)
	6''	68,4	3.46, dd (11.0, 6.3)	68,4	3.85, dd (11.2, 1.70)	68,3	3.87, dd (11.5, 2.3)
α -L-arabinofuranose	1'''	109,8	4.76, d (1.0)	109,8	4.75, d (1,3)	109,9	4.73, d (1.7)
	2'''	83,0	3.84, dd (3.2, 1.0)	83,0	3.83, dd (3,4; 1,3)	83,2	3.81, dd (3.7, 1.7)
	3'''	78,7	3.74, dd (5.6, 3.2)	78,7	3.74, dd (5,4; 3,4)	78,5	3.71, dd (6.3, 3.7)
	4'''	85,7	3.81, ddd (5.6, 5.0, 3.1)	85,8	3.81, m	85,4	3.76, ddd (6.3, 5.0, 3.0)
	5'''	63,0	3.56, dd (11.9, 5.0)	63,0	3.65, dd (11,9; 3,0)	62,9	3.52, dd (12.0, 5.0)
			3.66, dd (11.9, 3.1)		3.56, dd (11,9; 4,9)		3.62, dd (12.0, 3.0)

c. Conclusion

Tous les flavonoïdes isolés dans *A. maritima* sont exclusivement des hétérosides de flavonols, en accord avec l'étude phytochimique préliminaire de l'espèce (Lauranson et al., 1995). Parmi ceux-ci, il y a **5 flavonols monoglycosylés**, tous isolés à partir de l'extrait AmA. Ce sont des molécules ubiquitaires. Nous avons isolé dans cet extrait deux flavonol coumaroyl-glucosides qui sont des molécules peu courantes : la myricétine-3-*O*- β -D-(6''-*O*-*trans*-*p*-coumaroyl)-glucopyranoside n'avait été décrite qu'une seule fois auparavant.

Enfin, **10 flavonols diglycosylés** ont été isolés à partir de l'extrait AmB, parmi lesquels 3 flavonol-3-rutiosides bien connus et **4 nouvelles molécules** qui sont la myricétine-3-*O*-vicianoside, la myricétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside, la quercétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside et la syringétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside. A noter que l'extrait AmB était le plus important (en termes de masse), ce qui signifie que **les diglycosides de flavonols sont les métabolites secondaires majoritaires d'*A. maritima* et plus particulièrement la myricétine-3-*O*-vicianoside, la myricétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside et la myricitrine.**

Comme pour les acides phénoliques, les flavonols et plus largement les flavonoïdes sont des composés très étudiés et pour lesquels de nombreuses activités biologiques ont déjà été évaluées (Nijveldt et al., 2001). Par exemple, les flavonoïdes jouent un rôle dans la prévention des cancers (Burkard et al., 2017; George et al., 2017; Le Marchand, 2002), ils sont aussi anti-fongiques (Seleem et al., 2017) ou encore antioxydants (Pietta, 2000). Il serait cependant intéressant d'étudier l'activité biologiques des hétérosides de flavonols isolés sur des cibles dermo-cosmétiques et particulièrement les métabolites majoritaires ainsi que les molécules nouvellement identifiées.

3. Les lignanes

a. Biosynthèse

Les lignanes sont des métabolites secondaires issus de la condensation d'unités phénylpropaniques, provenant de la voie du shikimate. Ces unités phénylpropaniques sont le plus souvent des alcools 4-hydroxycinnamique, coniférylique ou encore synapylique (Dewick, 2009). Par exemple, le pinorésinol provient d'un couplage radicalaire entre deux alcools coniféryliques conduisant à une double cyclisation 7-O-7' et 9-O-9' (Figure 2.82). Cette double cyclisation donne systématiquement naissance aux lignanes furano-furaniques.

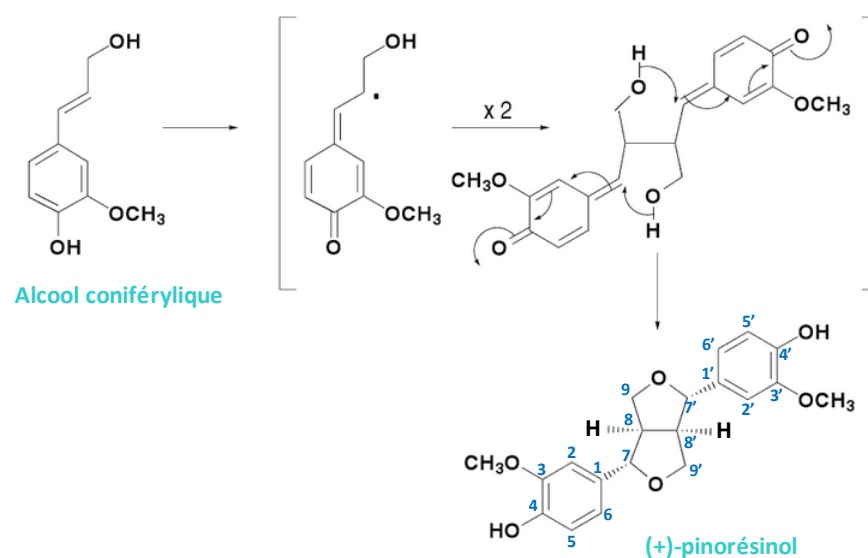


Figure 2.82 : Biosynthèse d'un lignane furanofuranique : le (+)-pinorésinol

(Bruneton, 2009)

A côté des lignanes dits « vrais », existe aussi un groupe appelé néolignanes. Celui-ci est constitué de composés pour lesquels le couplage des unités phénylpropanoïques n'implique au maximum qu'un seul carbone β (8). (Bruneton, 2009)

b. Elucidations structurales

❖ Détermination structurale du composé D4

Le spectre UV indique trois λ_{\max} à 199, 230 et 281 nm.

L'analyse HRMS conduit à l'identification d'un adduit sodium $[M+Na]^+$ à m/z 381,1296, ce qui correspond à une formule brute de C₂₀H₂₂O₆.

Sur le spectre de RMN ^1H , on observe trois protons formant le système ABX d'un cycle aromatique tri-substitué, le premier à δ ppm 6.77 (1 H, d, $J=8.0$ Hz, H5), le second en *ortho* à δ ppm 6.81 (1 H, dd, $J=8.0, 1.8$ Hz, H6) et le troisième en *para* à δ ppm 6.95 (1 H, d, $J=1.8$ Hz, H2) (Figure 2.83). La molécule possède également un groupement méthoxyle à δ ppm 3.86 (3 H, s). On observe 4 autres signaux couplés à δ ppm 3.15 (1 H, m, H8), 3.84 (1 H, dd-like, $J=9.2, 3.7$ Hz, H9b), 4.23 (1 H, dd-like, $J = 8.9, 6.7$ Hz, H9a), 4.71 (1 H, d, $J=4.3$ Hz, H7) (Figure 2.83).

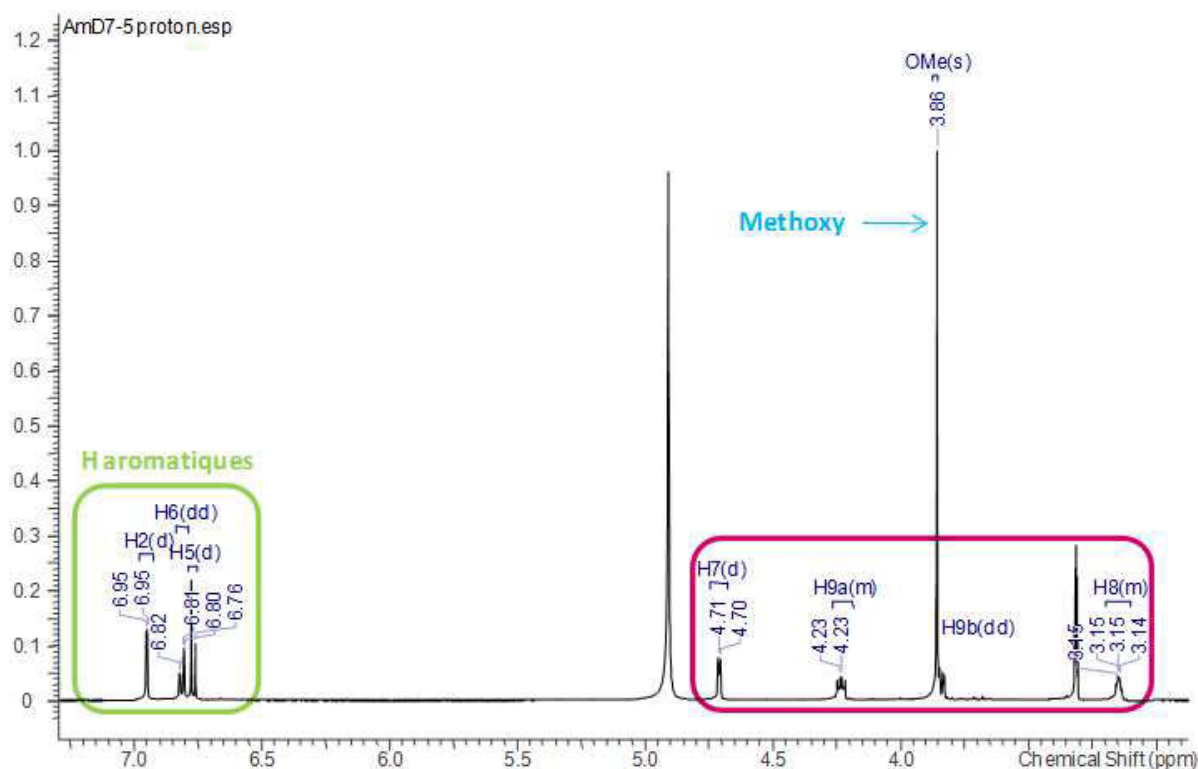


Figure 2.83 : Spectre ^1H (MeOD, 500 MHz) de la molécule D4

Le spectre de RMN ^{13}C présente seulement 10 signaux alors que la formule brute indique 20 atomes de carbones. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette molécule est symétrique.

L'analyse des spectres DEPT (Figure 2.84) nous permet de confirmer que la molécule contient un OCH_3 à δ ppm 56,5. On observe aussi un CH_2 à δ ppm 72,7 et le spectre HSQC indique que ce carbone porte les deux protons à δ ppm 4,23 et 3,84. On observe également cinq CH, dont les trois aromatiques du cycle tri-substitué.

On dénombre 3 carbones quaternaires aromatiques. Les protons du méthoxyle corrélient en HMBC avec celui à 149,2 ppm. Sur le spectre NOESY, un seul effet est observé entre le

OCH₃ et le H₂, permettant de placer le méthoxy en position 3 du cycle aromatique, et un OH adjacent en position 4. Les corrélations HMBC confirment cette substitution aromatique.

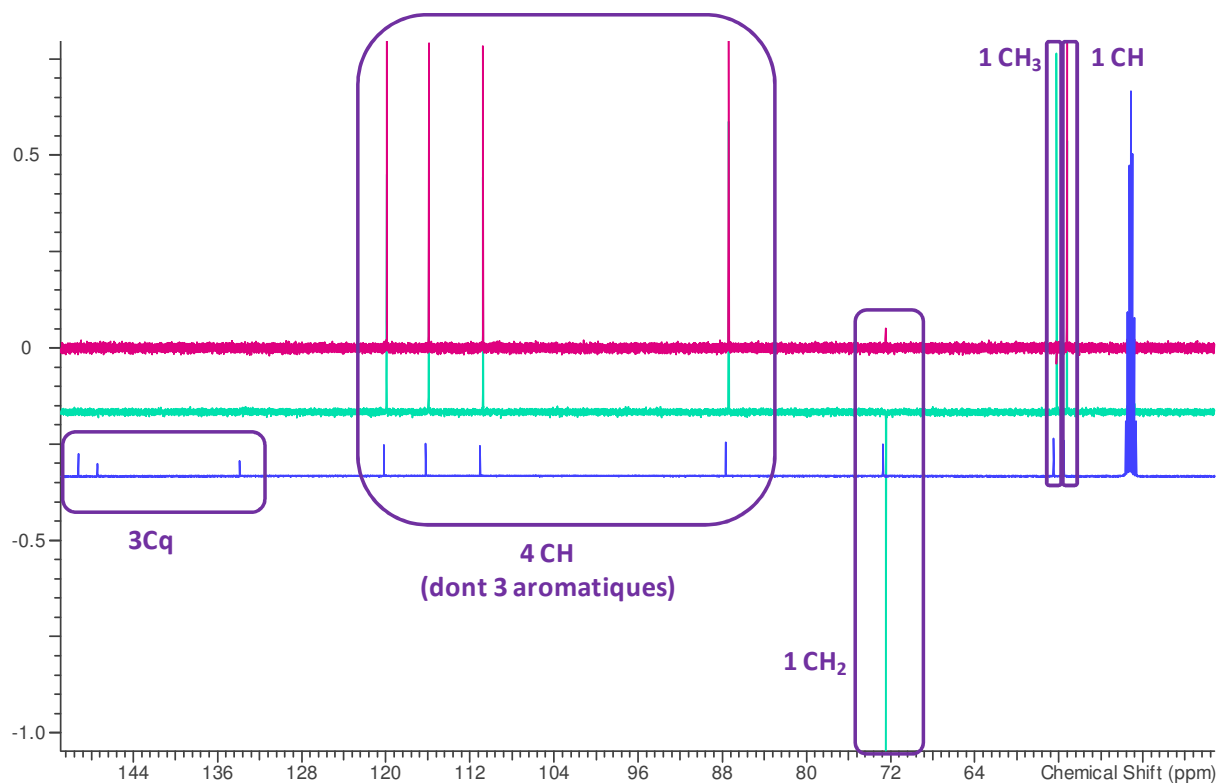


Figure 2.84 : Spectre DEPT (MeOD, 126 MHz) du composé D4

Le proton non aromatique H₇ à 4,71 corrèle en HMBC au carbone aromatique quaternaire blindé à 133,9 ppm (C₁). En COSY ce proton corrèle au proton à 3,15 ppm (H₈), qui lui-même corrèle avec les deux protons du CH₂ (H₉).

Ces données sont comparées avec celle de la littérature : il s'agit d'un **pinorésinol** (Figure 2.85) (Brenes et al., 2000; Rahman et al., 1990; Fonseca et al., 1979). Le pouvoir rotatoire de **D4** est de 1°, soit pratiquement nul, alors que dans la littérature, le pinorésinol possède un $[\alpha]_D = \pm 70$ (Tsukamoto et al., 1984; Xie et al., 2003). Nous avons donc un mélange racémique qui correspond à un mélange 50/50 des deux énantiomères.

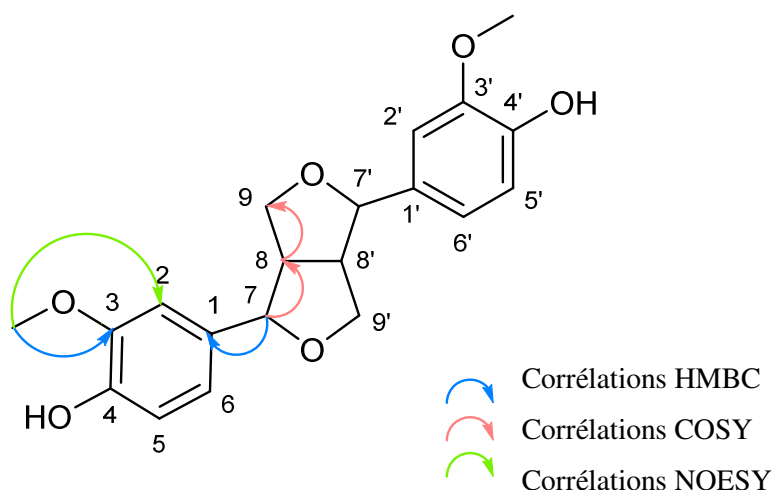


Figure 2.85 : Corrélations HMBC, COSY et NOESY déterminantes pour l'élucidation structurale du pinorésinol

Le pinorésinol est un lignane courant. On le retrouve notamment dans des halophytes comme *Frankenia thymifolia* (Ben Mansour et al., 2016) et *Limonium densiflorum* (Medini et al., 2016).

❖ Détermination structurale du composé **D5**

Le spectre UV de **D5** est similaire à celui de **D4** avec trois λ_{\max} de 202, 234 et 281 nm.

L'analyse HRMS conduit à une formule brute de $C_{20}H_{20}O_7$ ($[M+H]^+$ à m/z 373,1289 et $[M+Na]^+$ à m/z 395,1210).

Beaucoup de similarités sont observées avec la molécule précédente. Néanmoins, la symétrie n'est pas conservée, puisqu'on observe sur le spectre RMN 1H , 6 protons aromatiques à δ ppm 6.79 (1 H, d, $J=7.9$ Hz, H5), 6.83 (1 H, m, H5'), 6.83 (1 H, m, H6'), 6.85 (1 H, dd, $J=7.9, 2.1$ Hz, H6), 6.95 (1 H, d, $J=1.8$ Hz, H2'), 6.97 (1 H, d, $J=2.1$ Hz, H2) pour deux noyaux aromatiques trisubstitués. On observe également deux méthoxy à δ ppm 3.86 (3 H, s, OMe') et 3.87 (3 H, s, OMe). On détecte aussi deux doublets à δ ppm 5.24 (1 H, d, $J=4.0$ Hz, H7), 5.40 (1 H, d, $J=4.0$ Hz, H7'), pouvant correspondre aux positions 7 et 7' comme dans la molécule **D4**.

Contrairement à **D4**, le composé **D5** ne comprend qu'un seul CH_2 , et un carbonyle de cétone est visible à 179,85.

Les corrélations NOESY et HMBC permettent d'attribuer sans ambiguïté les deux méthoxy en position 3 de chaque système aromatique. Les corrélations HMBC et COSY permettent de confirmer qu'une cétone se trouve en position 9 (Figure 2.86).

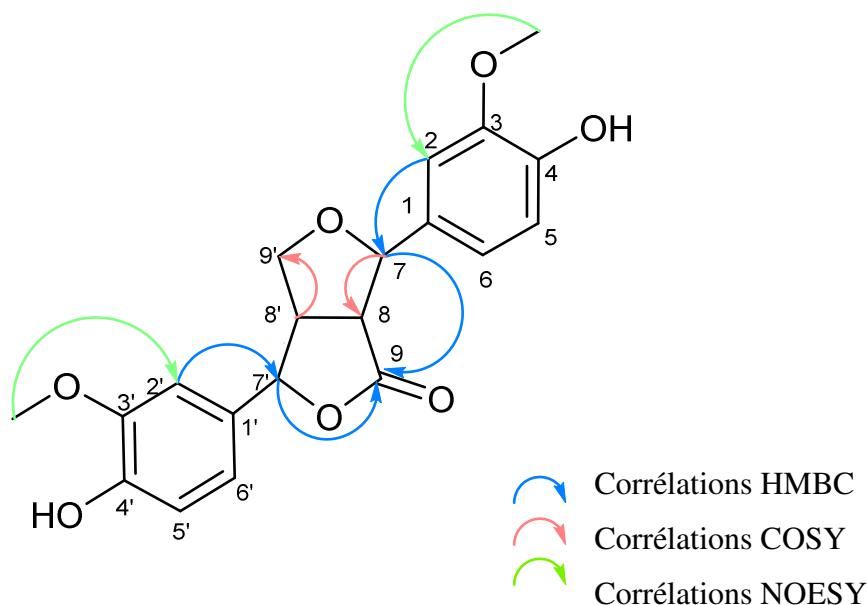


Figure 2.86 : Corrélations HMBC, COSY et NOESY déterminantes pour l'élucidation structurale de la molécule D5

L'ensemble des données a été comparé à celles de la littérature (Ma et al., 2013; Otsuka et al., 1989). Elles sont identiques, excepté pour les positions 8 et 8' où on observe une inversion d'attribution. La molécule **D5** a donc été identifiée comme étant le **7,9'-époxy-4,4'-dihydroxy-3,3'-diméthoxy-9,7'-lignanolate**, également appelée **balanophonine B** (Figure 2.87).

Le pouvoir rotatoire mesuré pour le composé **D5** est de + 8 (c 0.05, MeOH, 25°C). Dans la littérature $[\alpha]_D = +18,6^\circ$ (Ma et al., 2013). Nous ne pouvons donc pas conclure sur la configuration absolue de notre molécule. Néanmoins, la très faible concentration à laquelle nous avons dû mesurer le pouvoir rotatoire compte tenu de la très faible quantité de molécule isolée et la faible sensibilité du polarimètre utilisé peuvent expliquer cette différence. Par contre, le spectre NOESY nous apporte des informations sur la stéréochimie relative, les corrélations décisives étant présentées ci-contre.

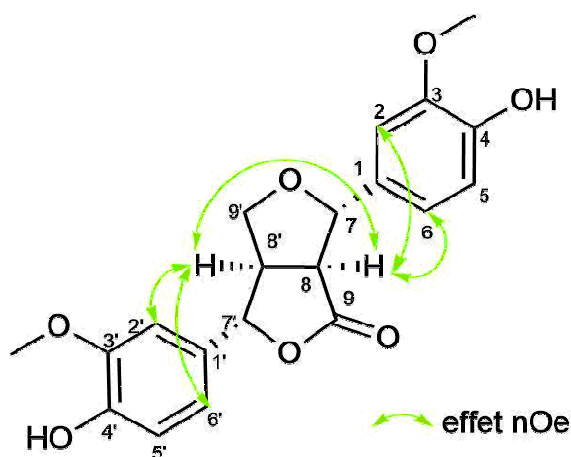


Figure 2.87 : Configuration relative de la balanophonine B

❖ Détermination structurale du composé D6

Son spectre UV indique trois λ_{max} de 202, 218 et 275 nm, et diffère quelque peu de celui des molécules **D4** et **D5**.

L'analyse HRMS conduit à l'identification de l'ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 347,1117, ce qui correspond à une formule brute de $C_{18}H_{18}O_7$.

Sur le spectre RMN 1H , on observe deux parties aromatiques :

- d'une part deux protons aromatiques *mé*ta à δ ppm 7.53 (1 H, br s, H2) et 7.57 (1 H, br s, H4),
- d'autre part un phénylpropane avec un système ABX avec δ ppm 6.77 (1 H, d, $J=8.0$ Hz, H5'), 6.83 (1 H, br dd, $J=8.0, 1.9$ Hz, H6'), 6.95 (1 H, d, $J=1.9$ Hz, H2'), et un enchaînement de quatre protons corrélés en COSY: un doublet à 5.61 ppm (1 H, d, $J=6.1$ Hz, H7'), couplé à un multiplet à 3.54 ppm (1 H, m, H8'), couplé à un CH_2OH à 3,86 ppm et 3,80 ppm.
- deux méthoxy à δ ppm 3.81 (3 H, s, OMe'), 3.90 (3 H, s, OMe).

Les spectres DEPT et carbone nous confirment la présence de deux méthoxy et un carbone à 175,1 ppm caractéristique d'un acide carboxylique. Les deux OCH_3 et le $COOH$ sont placés sur les cycles aromatiques grâce à leurs corrélations HMBC qu'ils développent avec les différents protons aromatiques (Figure 2.88) :

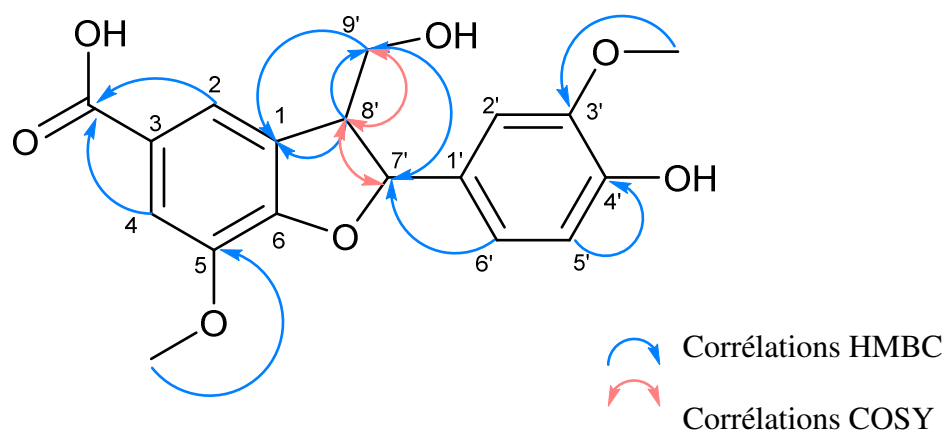


Figure 2.88 : Corrélations HMBC et COSY déterminantes pour l'élucidation structurale de la molécule D6

L'ensemble de ces données ont été comparées à la littérature (Jia et al., 2010) pour confirmer que la molécule **D6** est un **ceplignane** (Figure 2.88).

Le pouvoir rotatoire mesuré pour cette molécule est de $+10^\circ$ (c 0.08, MeOH, 25°C). Dans la littérature $[\alpha]_D = +29$ ou $-5,42$ pour les deux énantiomères (Liang et al., 2015). Normalement, les valeurs absolues sont identiques, ce qui n'est pas le cas. Nous ne pouvons donc pas conclure sur la configuration absolue de notre molécule. Néanmoins la très faible concentration à laquelle nous avons dû mesurer le pouvoir rotatoire compte tenu de la très faible quantité de molécule isolée et la faible sensibilité du polarimètre utilisé peuvent expliquer cette différence. Le spectre NOESY, n'était pas de suffisamment bonne qualité pour tirer des conclusions quant à la stéréochimie relative des positions 7' et 8'.

c. Conclusion

Trois lignanes ont été isolés dont **deux lignanes furano-furaniques** et un **néolignane**. A noter que les fractions issues de l'extrait AmD n'ont pas toutes été analysées, par manque de temps. Nous ne pouvons pas écarter la présence de lignanes supplémentaires dans les autres fractions. Il serait judicieux de poursuivre l'étude de cet extrait dichlorométhanique.

Etant donnée la diversité structurale de cette famille, les activités biologiques qui lui sont attribuées sont assez diversifiées (MacRae and Towers, 1984). Il serait donc intéressant d'évaluer leurs activités sur des cibles dermo-cosmétiques

4. Les megastigmanes

a. Biosynthèse

Les mégastigmanes appartiennent à la famille des norisoprénoïdes (Peinado, 2012). Les norisoprénoïdes sont des molécules aromatiques qui dérivent des caroténoïdes (Baumes et al., 2002; Hampel et al., 2007), les plus connus étant la β -ionone et la β -damascenone. Ces molécules ont été très étudiées dans le raisin (Kotseridis et al., 1999; Sefton et al., 2011). Les caroténoïdes sont des tétraterpènes provenant initialement du phytoène qui résulte du couplage oxydatif entre deux unités géranylgeranyl diphosphate (GGPP) (Bruneton, 2009). Le GGPP est issu de la voie du mévalonate. Les caroténoïdes peuvent aussi provenir du 1-deoxy-d-xylulose (DOX) (Arigoni et al., 1997).

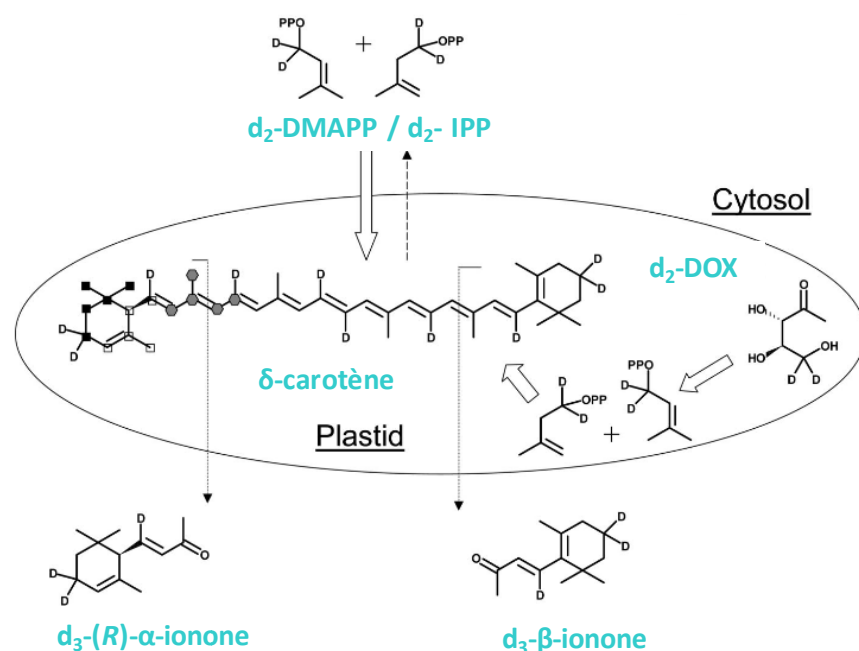


Figure 2.89 : Biosynthèse des norisoprénoïdes .

DMAPP : Diphosphate diméthylallyle , IPP : diphosphate isopentényle , DOX : 1-deoxy-D-xylulose.
Les unités isoprènes intégrées dans le carotènes sont représentées par des symboles.

(Hampel et al., 2007)

b. Elucidations structurales

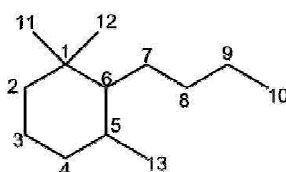


Figure 2.90 : Squelette carboné de base des mégastigmanes

❖ Détermination structurale du composé D7

Le spectre UV indique un λ_{\max} à 241 nm.

L'analyse HRMS conduit à l'identification de l'ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 223,1343 et $[M+Na]^+$ à 245,1142, ce qui correspond à une formule brute de $C_{13}H_{18}O_3$.

Le spectre proton montre la présence de 4 groupements méthyles à δ ppm 1.02 (3 H, s, H12), 1.06 (3 H, s, H11), 1.90 (3 H, d, $J=1.2$ Hz, H13), 2.31 (3 H, s, H10). L'HMBC nous montre que les CH_3 -11 et CH_3 -12 sont géminés et portés par le même carbone (C1). Les protons CH_3 -10 et CH_3 -13 sont plus déblindés, du fait de leur position sur des insaturations (CH_3 -CO et CH_3 -C=C).

On observe trois protons éthyléniques dont deux à δ ppm 6.44 (1 H, d, $J=15.7$ Hz, H8) et 6.99 (1 H, d, $J=15.7$ Hz, H7) caractéristiques d'une double liaison *trans*, et un troisième, singulet à δ 5.94 (H4).

L'HSQC nous permet également d'identifier deux protons géminés d'alcane à δ ppm 2.28 (1 H, d, $J=17.1$ Hz, H2a) et δ 2.60 (1 H, br d, $J=17.1$ Hz, H2b) (Figure 2.91).

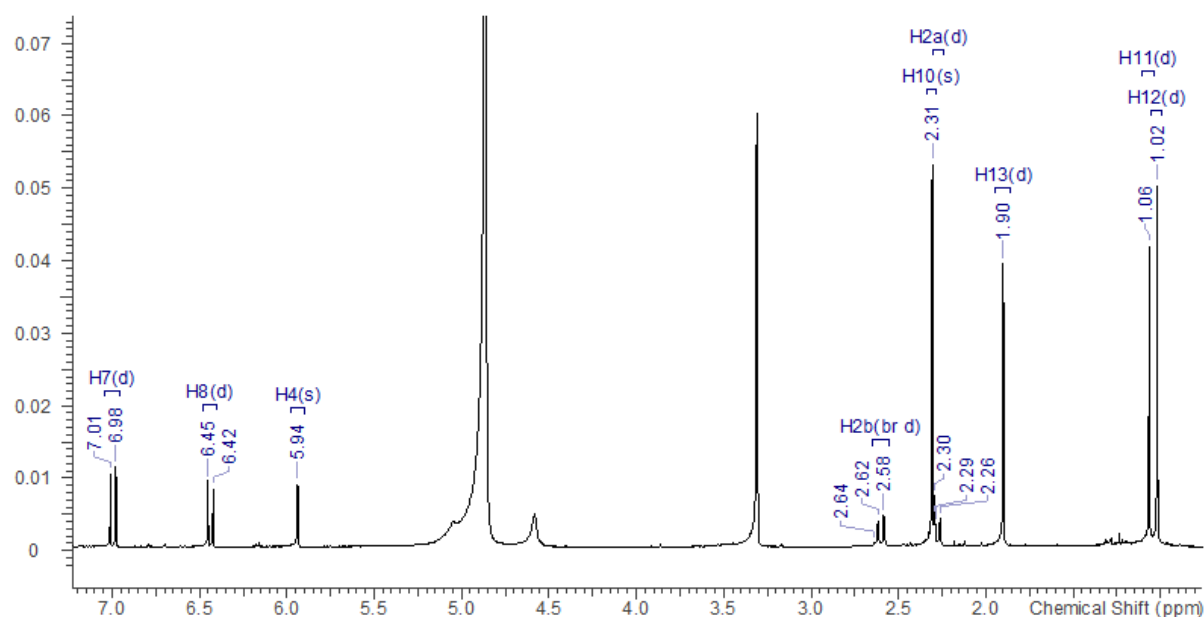


Figure 2.91 : Spectre 1H (MeOD, 500 MHz) de la molécule D7

Le spectre carbone indique la présence de deux fonctions cétone à 200.5 ppm (C3) et 200.9 ppm (C9). L'HMBC montre que les H2a et H2b corrélient avec le C3 et que les protons de la double liaison *trans*, ainsi que le méthyle C10 corrélient avec le C9. Les spectres COSY et HMBC montrent que les deux méthyles géminés (C11, C12) corrélient avec les deux protons

gémés (C2). H7, H11, H12 et le quatrième méthyle H13 corrént en HMBC avec le carbone quaternaire à 80,1 ppm (C6) (Figure 2.92).

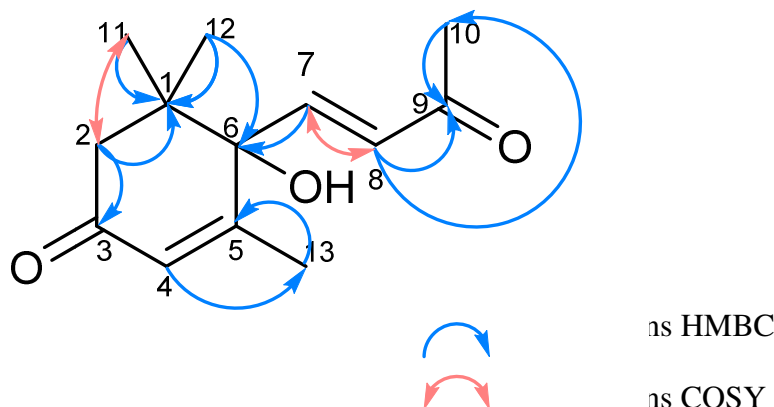


Figure 2.92 : Corrélations HMBC et COSY déterminantes pour l'élucidation structurale de la molécule D7

Après comparaison des données obtenues avec la littérature (Kisiel et al., 2004), le composé **D7** a été identifié comme étant le **déhydrovomifoliol**.

Le pouvoir rotatoire mesuré pour cette molécule est de + 46 (c 0.05, MeOH, 25°C). Dans la littérature $[\alpha]_D = \pm 220^\circ$ (Häusler and Montag, 1989; Serra et al., 2007). Nous ne pouvons donc pas conclure sur la configuration absolue de notre molécule.

On observe un effet nOe entre H7 et H12, ce qui nous permet d'en déduire une stéréochimie relative représentée sur la figure ci-dessous :

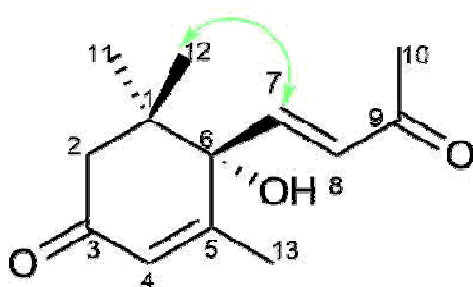


Figure 2.93 : Configuration relative du composé D7 (effet nOe)

❖ Détermination structurale du composé **D8**

Comme pour **D7**, le spectre UV de **D8** indique un λ_{max} à 237 nm dû à une cétone α,β -insaturée.

L'analyse HRMS conduit à l'identification de l'ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ à 225,1509 m/z et $[M+Na]^+$ à 247,1294 m/z , ce qui correspond à une formule brute de $C_{13}H_{20}O_3$ soit une insaturation en moins par rapport à **D7**.

Comme pour le déhydrovomifoliol, le spectre proton de **D8** montre la présence des 4 méthyles à δ ppm 0.96 (3 H, s, H11), 1.18 (3 H, s, H12), 1.19 (3 H, s, H13), 1.27 (1 H, m, H2a), 2.29 (3 H, s, H10) avec des déplacements chimiques très similaires. On observe aussi les deux protons éthyléniques *trans* à δ ppm 6.18 (1 H, d, $J=15.9$ Hz, H8), 7.17 (1 H, d, $J=15.9$ Hz, H7).

L'HSQC nous permet d'identifier pour **D8** deux CH_2 à δ ppm 1.27 (1 H, m, H2a) et 1.58 (1 H, ddd, $J=12.8, 3.4, 1.8$ Hz, H2b) d'une part, et à δ ppm 1.66 (1 H, dd, $J=16.0, 9.2$ Hz, H4a), 2.30 (1 H, ddd, $J=16.0, 4.9, 1.8$ Hz, H4b) d'autre part. En plus, on observe un proton déblindé à δ ppm 3.77 (1 H, m, H3) appartenant à une fonction alcool secondaire.

Le spectre carbone de **D8** montre la présence d'une seule fonction cétone à 200.4 ppm (C9) mais on observe trois carbones sp^3 oxygénés 64.5 (C3), 68.9 (C5), 71.0 (C6).

Les spectres 2D montrent les mêmes corrélations que pour la molécule **D7**. Des corrélations supplémentaires sont observées et présentées dans la figure ci-dessous, elles permettent ainsi de confirmer la présence d'un hydroxyle en C3, d'un CH_2 en position 4, et d'une fonction époxy entre les positions 5 et 6. (Figure 2.94).

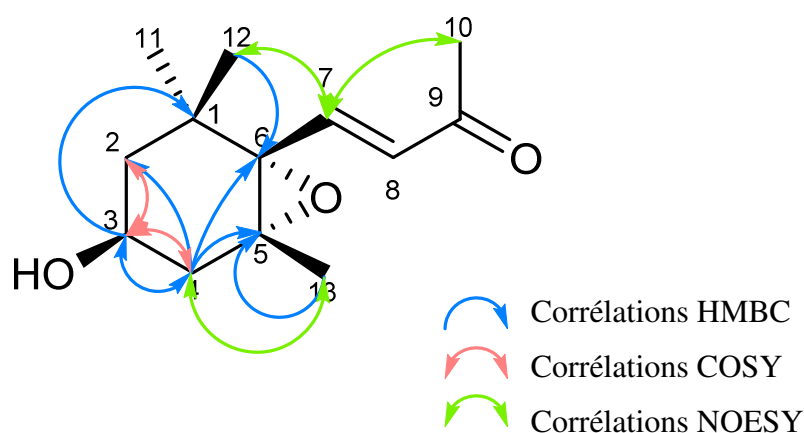


Figure 2.94 : Corrélations HMBC et COSY déterminantes pour l'élucidation structurale de la molécule **D8**

Après comparaison des données obtenues avec la littérature (Duan et al., 2002; Kurokawa et al., 1998), le composé **D8** a été identifié comme étant le **3-hydroxy-5,6-epoxy- β -ionol**. (Figure 2.94).

Le pouvoir rotatoire mesuré pour **D8** est de - 83 (c 0.1, MeOH, 25°C), ce qui correspond exactement à la valeur de la littérature (Kurokawa et al., 1998). Ceci nous a permis de conclure que la configuration absolue de cette molécule est 6S et 5R (Figure 2.94).

c. Conclusion

Deux mégastigmanes ont été isolés à partir d'*A. maritima*. Comme pour les lignanes, les fractions issues de l'extrait AmD n'ayant pas toutes été analysées, il se peut que d'autres mégastigmanes soient présents dans la plante.

Les mégastigmanes sont connus notamment pour leurs propriétés odorantes dans le vin (Pineau et al., 2007; Sefton et al., 2011).

Quelques activités biologiques sont décrites dans la littérature comme l'activité anti-inflammatoire du déhydrovomifoliol (Kim et al., 2015).

5. Les lipides et terpènes

Des analyses GC-MS couplées à l'utilisation de bases de données de type NIST ont permis de mettre en évidence la présence de certains composés ubiquitaires dans la fraction cyclohexanique AmC (Figure 2.95).

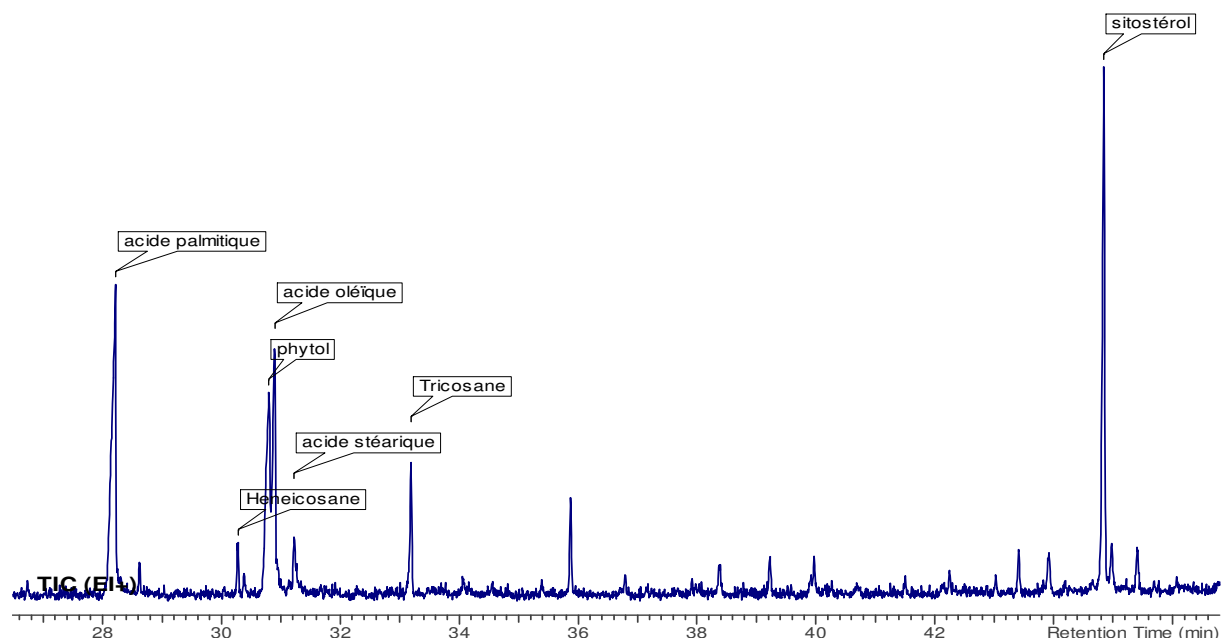


Figure 2.95 : Zoom sur le chromatogramme GC-MS de la fraction AmC

Ont été notamment trouvés des acides gras comme les **acides tétradécanoïque, palmitique, linoléique, stéarique, oléique**. On a aussi détecté la présence du **sitostérol** qui est un triterpène (également identifié en CCM dans la fraction AmD) et du **phytol** qui est un diterpène acyclique (Figure 2.96).

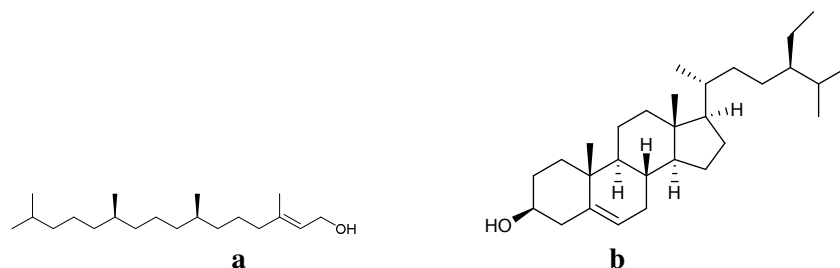


Figure 2.96 : Structures de terpènes identifiés dans l'extrait AmC
(a : phytol, b : sitostérol)

Des essais ont été réalisés en dérivant préalablement l'échantillon AmC avec du N-méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide pour tenter de détecter d'autres composés, initialement moins volatiles, mais aucune différence probante n'a été observée.

D. Conclusion de l'investigation phytochimique d'*A. maritima*

31 molécules ont été isolées dans *A. maritima* : **9 phénols** (Figure 2.96 b), **7 flavonols monoglycosylés** (Figure 2.96 b), **9 flavonols diglycosides** parmi lesquels **4 nouvellement décrits** (Figure 2.96 c), **3 lignanes** et **2 mégastigmanes** (Figure 2.96 a).

Toutes ces molécules ont été **isolées pour la première fois dans le genre *Armeria***. La richesse en flavonoïdes avait déjà été démontrée dans des espèces de la famille des Plumbaginaceae comme par exemple dans les genres *Limonium* et *Limoniastrum* (cf § I.A.4).

Cette étude confirme l'intérêt des halophytes comme source de polyphénols, molécules au fort potentiel biologique.

Ce travail a été centré sur les métabolites secondaires, mais pour obtenir une empreinte phytochimique globale de la plante, il serait nécessaire de s'intéresser également aux métabolites primaires, notamment en recherchant des osmo-régulateurs.

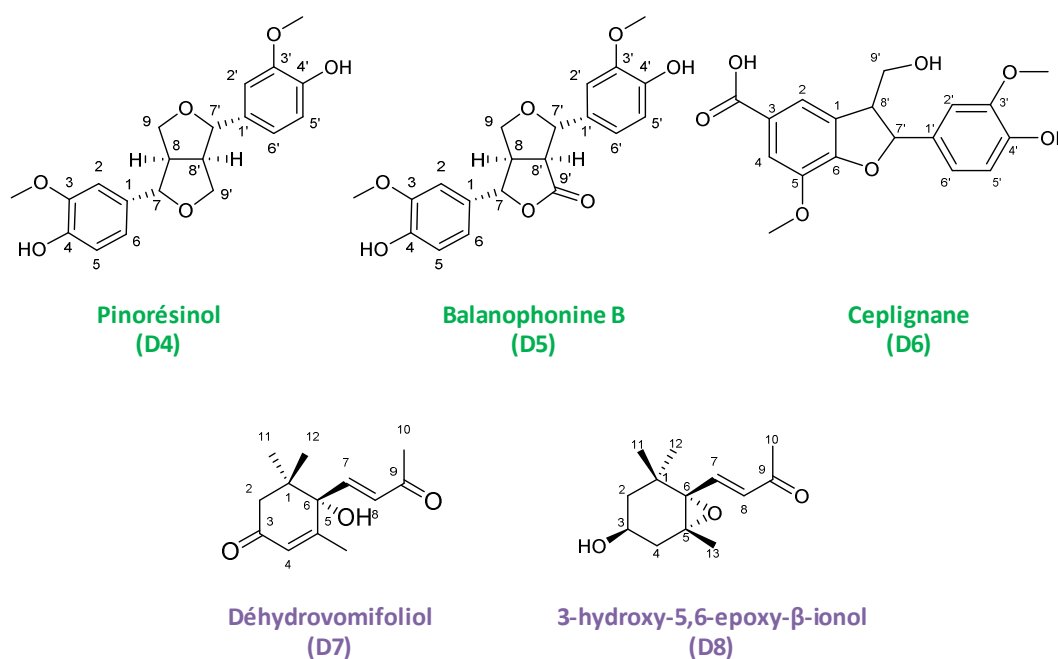
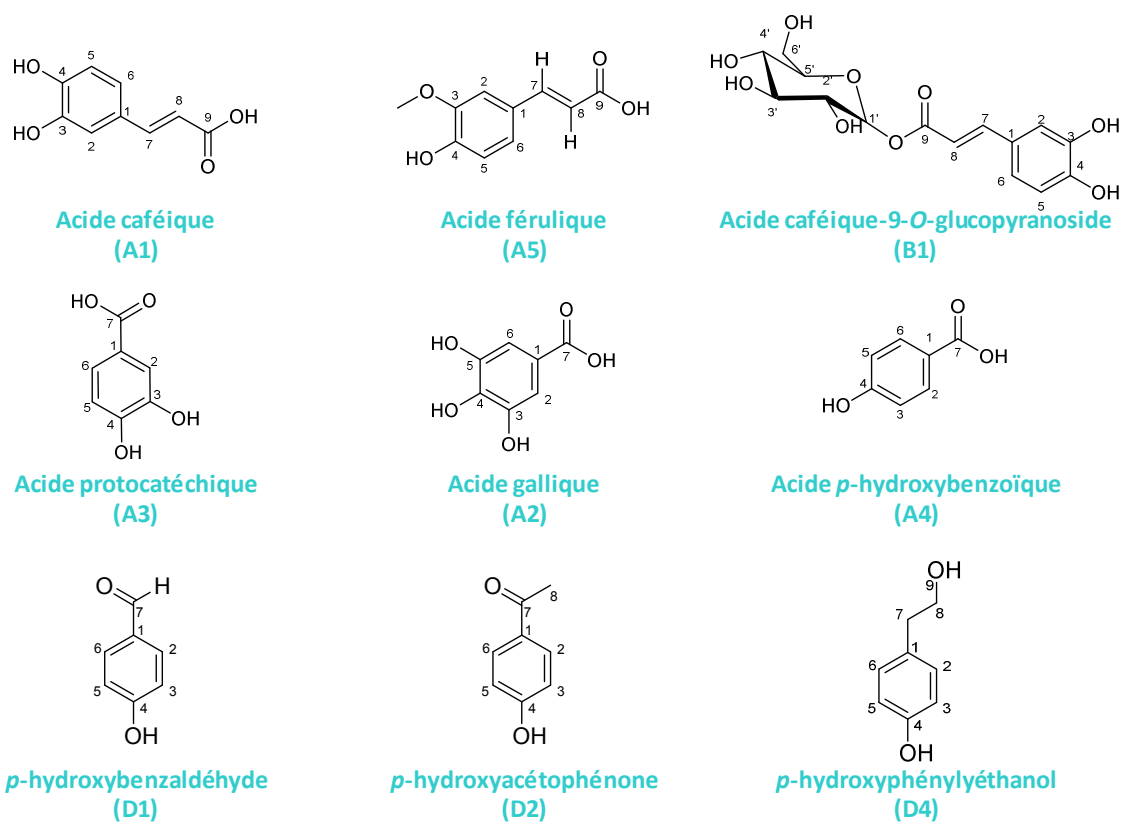


Figure 2.96 a : Lignanes (vert) et mégastigmanes (violet) isolés dans *A. maritima*

Figure 2.96 b : Phénols isolés dans *A. maritima*

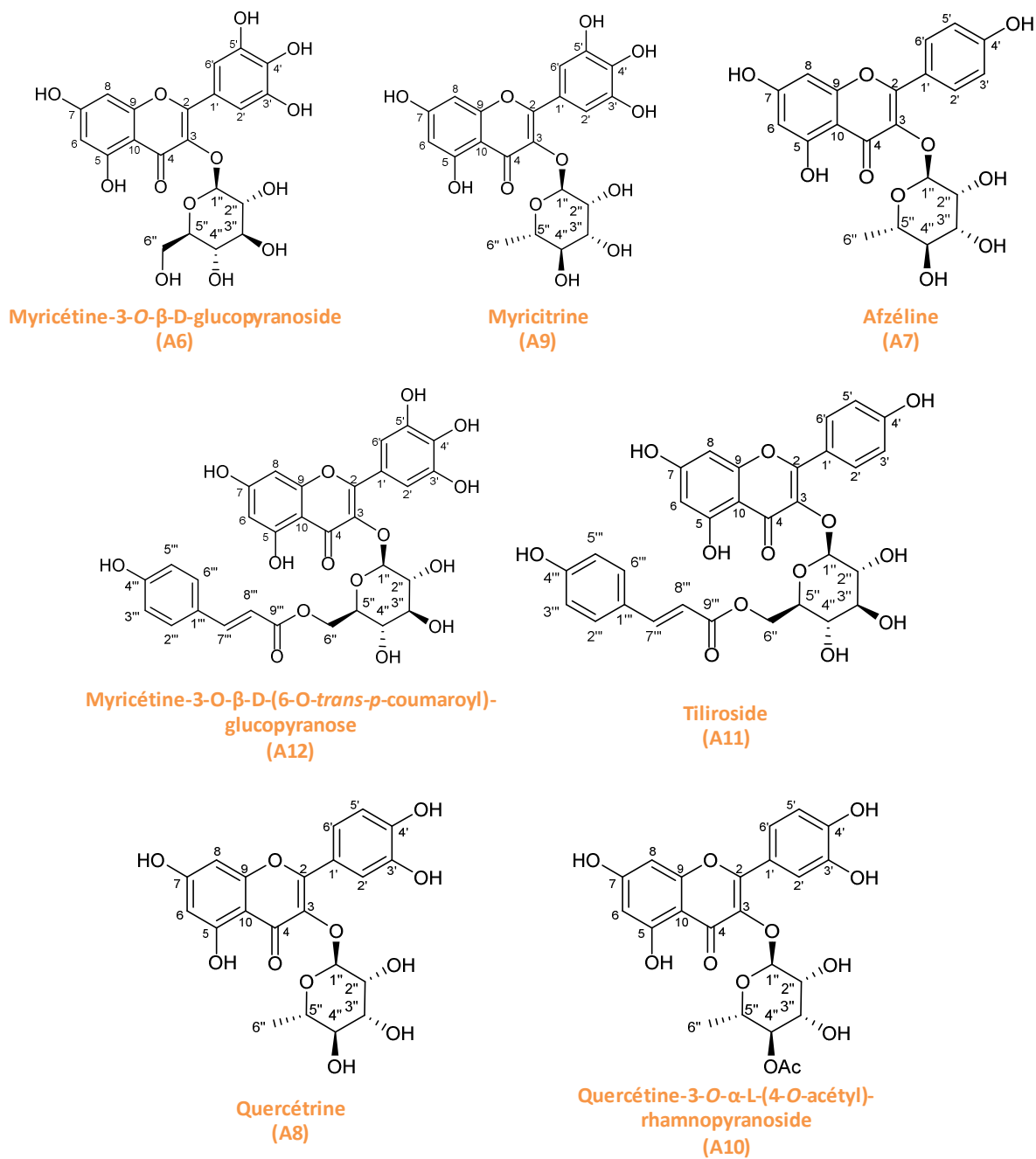


Figure 2.96 b : Flavonols monoglycosylés isolés dans *A. maritima*

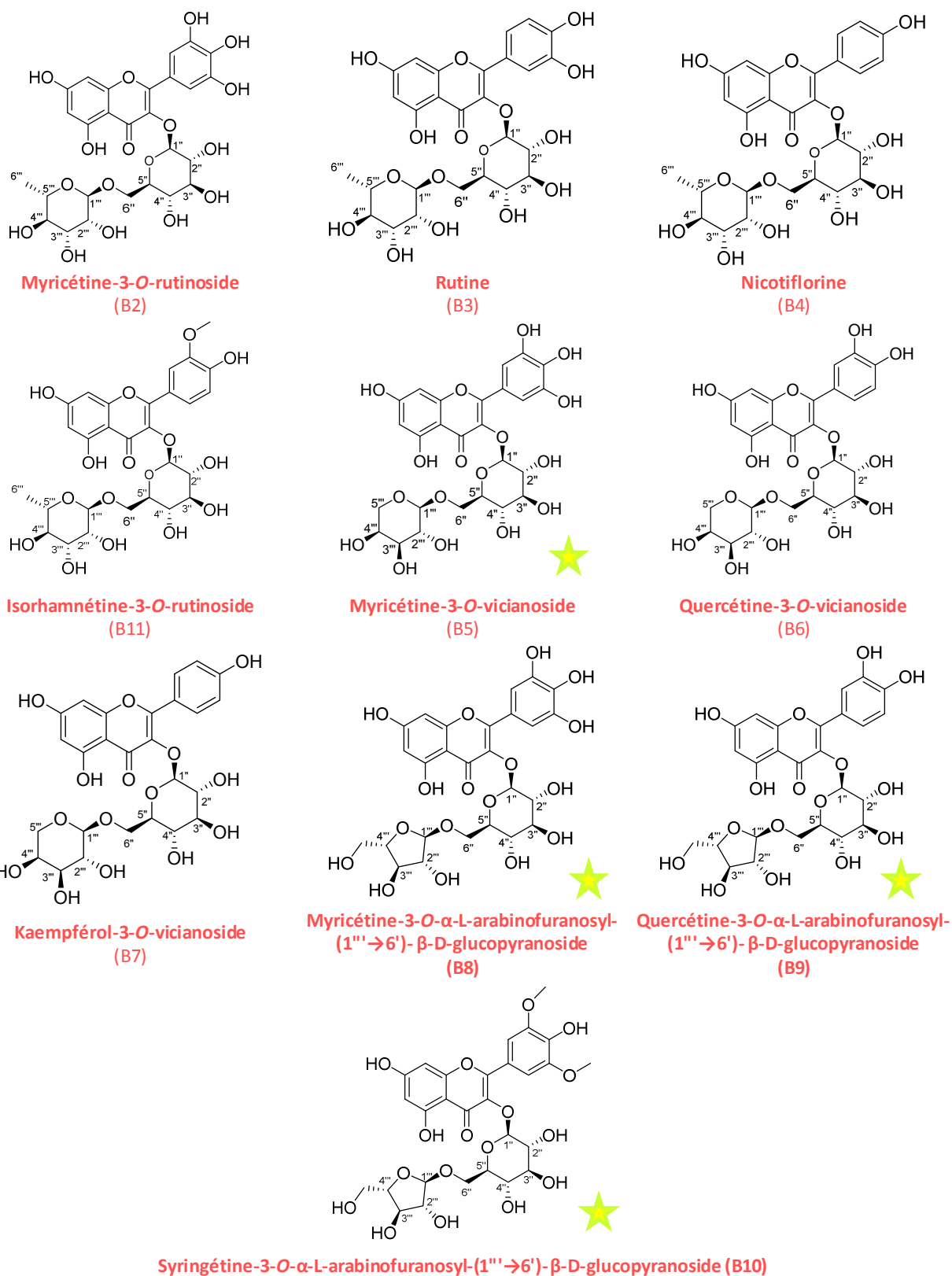


Figure 2.96 c : Flavonols diglycosylés isolés dans *A. maritima*

★ Molécules nouvelles

III. Evaluation des activités biologiques d'*A. maritima*

Les extraits d'*A. maritima* ainsi que certaines molécules purifiées ont été testés sur différentes cibles biologiques à visée dermo-cosmétique (activité antioxydante, toxicité, activités anti-MMP et anti-inflammatoire, cicatrisation). A noter que ce travail de criblage biologique a été réalisé en parallèle de la phytochimie, mais qu'il ne s'agissait pas de fractionnement bio-guidé.

A. Activité anti-oxydante

L'activité anti-oxydante a été mesurée à l'aide de deux tests complémentaires, le test DPPH et le test ORAC (cf. Chap.4 § V).

1. Neutralisation de la formation du radical DPPH

Les mesures ont été réalisées trois fois, puis la moyenne des trois valeurs a été utilisée pour tracer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration (de 0,4 à 120 µg/mL) de l'extrait utilisé. Ces courbes nous ont permis de déterminer des CI_{50} , dont la valeur est inversement proportionnelle à l'activité antioxydante de l'extrait. Ce test a été réalisé uniquement sur les extraits pour lesquels les études phytochimiques ont montré une richesse en polyphénols, soit AmE (extrait brut), AmA (extrait AcOEt) et AmB (extrait BuOH).

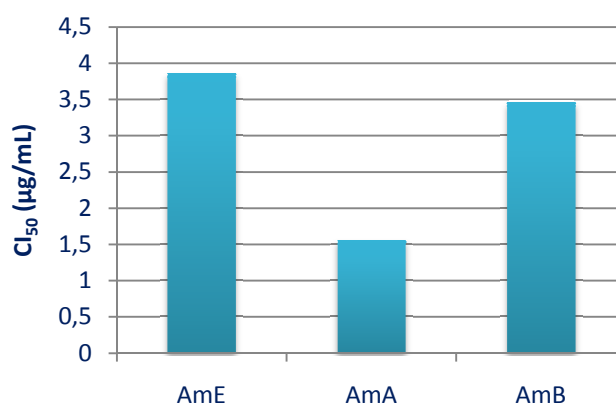


Figure 2.97 : CI_{50} sur la neutralisation des radicaux DPPH des différents extraits d'*A. maritima*

On observe que l'extrait brut (AmE) est moins antioxydant que les deux extraits AmA et AmB qui en sont issus. Cela peut s'expliquer par le fait que les deux extraits AmA et AmB sont

enrichis en polyphénols par rapport à l'extrait brut (cf. § II.A). L'extrait AmA présente un pouvoir antioxydant plus de deux fois supérieur à celui d'AmB. Au vu du contenu moléculaire de ces deux extraits, les acides phénoliques présents dans AmA pourraient augmenter le pouvoir antioxydant de cet extrait, contrairement à AmB qui ne contient que des flavonols.

Dans la littérature on trouve pour une espèce de la même famille, *Limonium aureum*, une CI_{50} de 6,15 $\mu\text{g/mL}$ (extrait méthanolique) (Geng et al., 2015) ou encore de 0,6 $\mu\text{g/mL}$ (extrait méthanolique) pour *Cakile maritima*, une espèce halophyte trouvée en Bretagne (Ksouri et al., 2007). La capacité antioxydante des extraits d'*A. maritima* est comprise dans cette gamme d'activité. De plus, la vitamine C, souvent utilisée comme témoin dans les tests antioxydants, présente une CI_{50} de 5,08 $\mu\text{g/mL}$ (Geng et al., 2015), nos extraits ayant des CI_{50} inférieures, ils peuvent donc être considérés comme possédant une forte activité antioxydante.

2. Test ORAC

Le test ORAC est davantage représentatif du fonctionnement d'un système biologique que le test DPPH, d'où l'intérêt d'effectuer ce second test en complément du précédent, bien qu'il soit compliqué à mettre en œuvre. Sa plus grande pertinence nous a conduit à tester l'ensemble de nos extraits

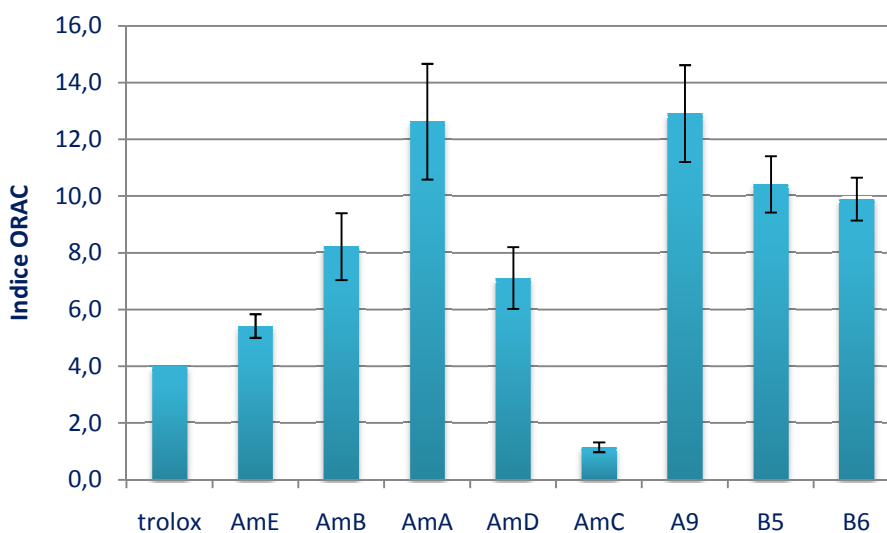


Figure 2.98 Indices ORAC (exprimés en $\mu\text{mol TE/ mg}$ de matière sèche) des différents extraits d'*A. maritima* et des polyphénols majoritaires

A9 : myricitrine; **B5**: myricétine-3-*O*-vicianoside ; **B6**: myricétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1" \rightarrow 6")- β -D-glucopyranoside

Le témoin positif utilisé dans ce test est le Trolox (analogue hydrophile de la vitamine E). On observe pour l'ensemble de nos extraits, excepté AmC, un pouvoir antioxydant supérieur à celui du Trolox. AmB et AmA sont significativement plus antioxydants que l'extrait brut AmE, comme dans le cas du test DPPH (Figure 2.97). La teneur en polyphénols décrite précédemment (cf § II. B et C), semble corrélée à l'activité anti-oxydante mesurée par le test ORAC.

Quelques espèces halophytes ont déjà fait l'objet d'évaluation antioxydante dans la littérature. Pour *Zygophyllum album*, trouvée en Bretagne, on a reporté des indices ORAC inférieurs à 2 $\mu\text{mol} / \text{mg}$ pour son extrait sec méthanolique (Ksouri et al., 2013). Pour *Limonium densiflorum*, on observe des valeurs allant jusqu'à un indice de 4 $\mu\text{mol} / \text{mg}$ pour l'extrait alcoolique (Medini et al., 2015). Pour *Suaeda fruticosa*, des valeurs n'excédant pas 3 $\mu\text{mol} / \text{mg}$ sont observées (Oueslati et al., 2012). Ainsi, les extraits d'*A. maritima* ont un pouvoir antioxydant supérieur à celui de ces différentes halophytes de la même famille.

On notera cependant que les extraits les plus apolaires, comme l'extrait AmC, ne présentent pas de pouvoir antioxydant ; alors que l'extrait dichlorométhanique (AmD) présente un pouvoir antioxydant significatif, ce qui n'est pas le cas pour les autres halophytes évaluées. Ceci peut s'expliquer par la présence dans l'extrait AmD de polyphénols de type phénols simples et de lignanes (cf. § II.C.1 et 3).

Dans tous les cas les extraits polaires (méthanol, butanol) restent les plus antioxydants, exceptés les extraits aqueux, comme cela a déjà été démontré par ailleurs (Oueslati et al., 2012).

Les trois hétérosides de myricétine testés présentent des activités antioxydantes très intéressantes, puisqu'elles sont deux fois plus importantes que celle du Trolox. Nos valeurs sont similaires à celle reportée dans la littérature pour la quercétine, avec un indice ORAC de 12,3 $\mu\text{mol} / \text{mg}$ (Kang et al., 2010) et une valeur similaire pour la myricétine (Tabart et al., 2009). On notera toutefois qu'aucune différence significative n'est observée entre les trois molécules testées, la chaîne osidique n'influe donc pas sur le pouvoir antioxydant, ce qui n'est pas surprenant puisque c'est le polyphénol qui porte l'activité anti-oxydante et non le sucre. Il a été démontré dans la littérature que la glycosylation en position 3 des génines réduit le pouvoir antioxydant du flavonol (Burda and Oleszek, 2001). Dans ce cadre, des travaux ont montré qu'une dé-glycosylation des flavonoïdes permettait d'augmenter leur pouvoir antioxydant (da Silva et al., 2013), mais ces résultats sont encore discutés (Xiao et al., 2014).

On constate que les molécules purifiées ne sont pas plus actives que les extraits AmA et AmB, ce qui avait déjà été démontré pour la rutine et un extrait de *Limonium* (Geng et al., 2015). Il existe donc une synergie entre les différentes molécules des extraits qui contribue à augmenter leur potentiel antioxydant lorsqu'elles peuvent agir ensemble. Ainsi, pour une éventuelle utilisation comme antioxydant, il semble inutile d'utiliser des molécules purifiées et il serait préférable, car moins onéreux et tout aussi efficace, de prendre l'extrait AmA.

B. Evaluation de la toxicité des extraits

Différents tests de toxicité ont été conduits en parallèle des tests d'activités biologiques, notamment pour les essais biologiques cellulaires. La cytotoxicité des extraits a été évaluée sur des macrophages murins et des cellules sanguines mononucléées humaines (PBMC). La phototoxicité des extraits sur des fibroblastes a également été étudiée.

1. Evaluation de la cytotoxicité des extraits sur des macrophages murins

En parallèle aux essais d'inhibition par le monoxyde d'azote sur les macrophages murins, des tests de cytotoxicité sur le même type de cellules ont été réalisés à l'aide du test WST. Le quercétol étant utilisé comme contrôle positif dans les tests anti-inflammatoires, sa cytotoxicité a également été testée.

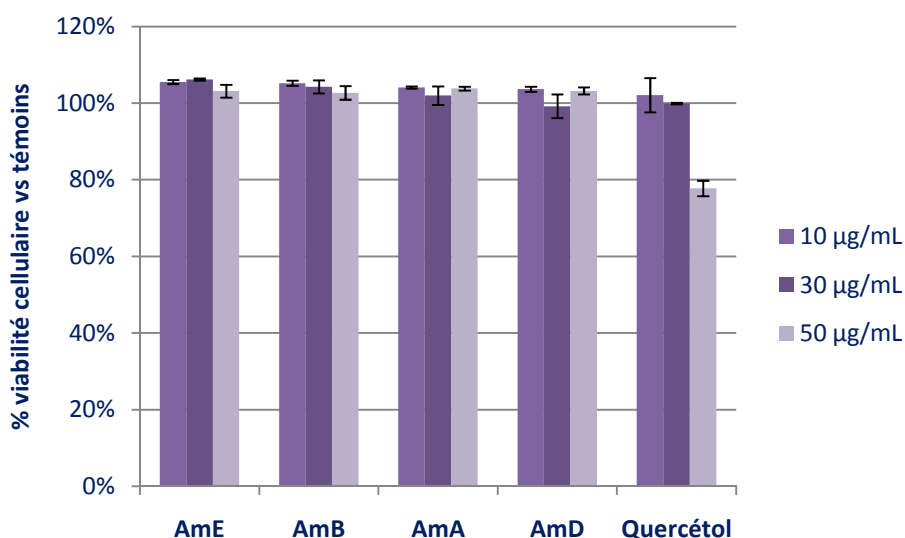


Figure 2.99 : Evaluation de la toxicité de différents extraits d'*A. maritima* sur les macrophages murins par le test WST

Aucune toxicité sur les macrophages murins n'est observée pour nos extraits, contrairement au quercétol qui présente une légère toxicité à 50 µg/mL, mais non significative.

2. Evaluation de la cytotoxicité des extraits sur des cellules mononucléées humaines

En parallèle aux essais d'inhibition de la sécrétion de cytokines par des PBMC traitées au LPS, des tests de cytotoxicité ont été réalisés à l'aide du test WST sur ce type de cellules. La dexaméthasone étant utilisée comme contrôle positif dans les tests anti-inflammatoires, sa cytotoxicité a également été testée.

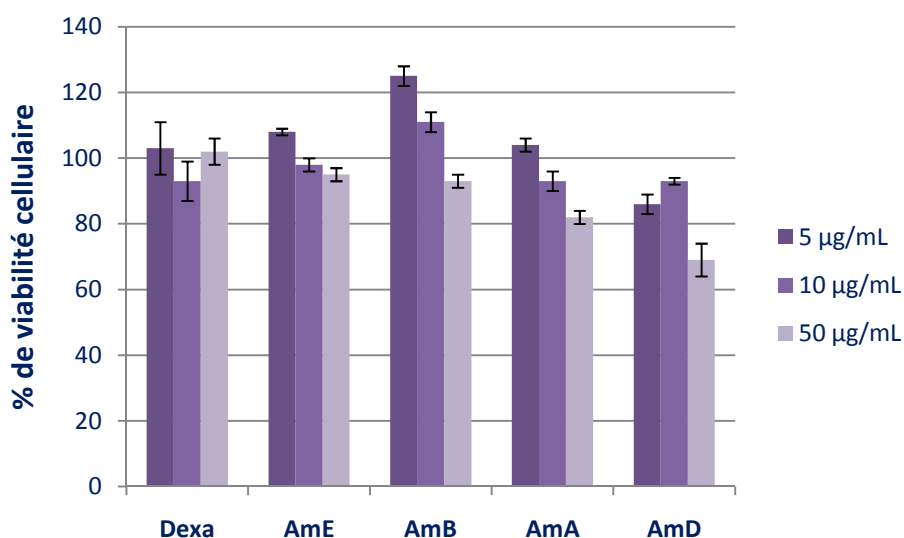


Figure 2.100 Evaluation de la toxicité de différents extraits d'*A. maritima* sur les cellules mononucléées humaines par le test WST

Contrairement aux essais sur les macrophages murins, on observe sur les PBMC une légère toxicité des extraits AmA et AmD à 50 µg/mL, sans relation dose-effet néanmoins. Cela montre l'intérêt d'évaluer la toxicité de nos extraits sur différents types cellulaires et notamment sur des cellules de peau (kératinocytes ou fibroblastes). Des tests d'activité anti-inflammatoire ont été conduits sur les PBMC malgré la légère toxicité.

Pour l'ensemble des molécules testées, aucune cytotoxicité n'a été révélée.

3. Evaluation de la phototoxicité des extraits sur des fibroblastes humains

Un test de photo-toxicité a été réalisé sur des fibroblastes humains. Ce test peut aussi constituer un simple test de cytotoxicité lorsque les cellules ne sont pas irradiées. La chlorpromazine a été utilisée comme témoin positif, c'est-à-dire comme agent phototoxique. Les résultats sont exprimés en CE_{50} , qui correspond à la concentration d'actif induisant 50% de toxicité.

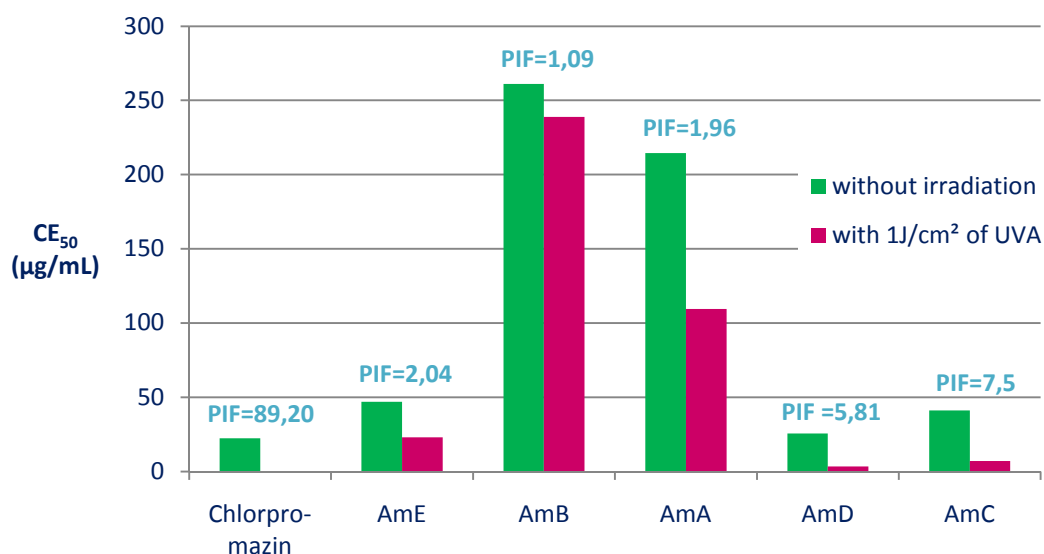


Figure 2.101 : Evaluation de la phototoxicité des extraits sur des fibroblastes humains

PIF : Facteur de photo-irradiation

$$PIF = \frac{CE_{50} (-irradiation)}{CE_{50} (+irradiation)}$$

PIF < 2 : absence de phototoxicité; PIF > 5 : phototoxicité avérée ; 2 < PIF < 5 : phototoxicité probable

En absence de rayonnement UV, on peut tirer des conclusions sur la toxicité des extraits sur les fibroblastes. On observe des CE_{50} faibles pour les extraits AmE, AmD et AmC, ainsi ces extraits présentent une toxicité importante sur les fibroblastes. Les extraits AmB et AmA quant à eux ne présentent pas de toxicité significative.

Avec le traitement UV, on peut évaluer la phototoxicité des extraits sur les fibroblastes. Ce test nous a permis de voir que les deux extraits riches en polyphénols (AmA et AmB) ne sont pas phototoxiques. L'extrait brut AmE présente une très légère probabilité de phototoxicité, alors qu'AmD est phototoxique et AmC très phototoxique, puisque leur toxicité est amplifiée suite à l'irradiation aux UV.

4. Conclusion des essais de toxicité

En conclusion, nous avons vu que sur les macrophages murins, aucun extrait n'est cytotoxique ; sur les PBMC, les extraits AmA et AmD montrent une légère toxicité et la toxicité d'AmD est confirmée sur les fibroblastes. De plus, l'extrait AmD est également phototoxique, il ne pourrait donc pas être utilisé en tant que tel en cosmétique.

C. Activité anti-MMP

Des tests d'inhibition de métalloprotéinases matricielles ont été réalisés sur deux enzymes : l'**élastase**, qui est responsable de la dégradation de l'élastine, et la **collagénase** qui dégrade le collagène. Ainsi ces deux enzymes contribuent au vieillissement cutané en catalysant la dégradation de la matrice dermique.

1. Activité anti-élastase

L'activité anti-élastase des différents extraits est exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport au témoin négatif (sans extrait) : plus ce pourcentage est élevé, plus l'extrait inhibe l'activité de l'enzyme, ce qui est l'effet recherché. Le NMAAPVCK (N-méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Prop-Val-chlorométhyl kétone) est utilisé comme témoin positif.

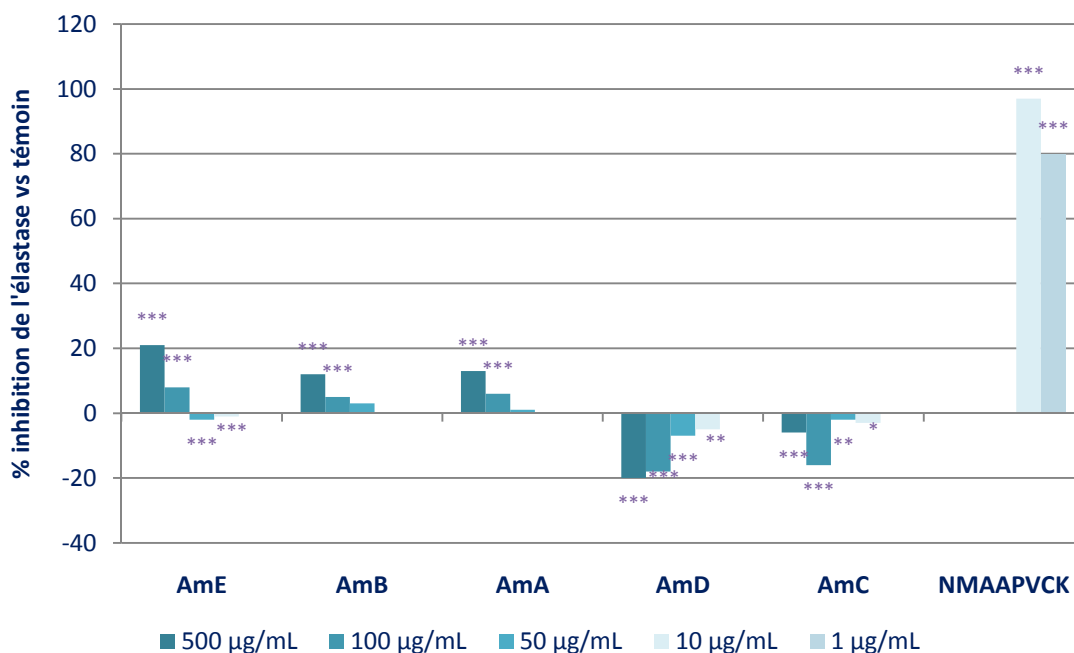


Figure 2.102 : Evaluation de l'activité anti-élastase des différents extraits d'*A. maritima*
 Statistiques réalisées par rapport au groupe témoin (test de Student bilatéral à variance inégale) :
 * $0,01 < p < 0,05$; ** $0,001 < p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

A 500 µg/mL, les extraits AmB et AmA possèdent une très légère activité anti-élastase (13% et 12% respectivement). En revanche AmE présente une activité presque deux fois plus importante (21%). Il semblerait donc que l'extrait brut cumule l'activité des deux extraits AmA et AmB. Cet effet cumulatif a déjà été mis en évidence par Wittenauer avec des extraits de marc de raisin (Wittenauer et al., 2015). Néanmoins cette activité reste faible par rapport au témoin NMAAPVCK. Pour les extraits AmD et AmC on observe un pourcentage d'inhibition négatif, ce qui signifie que ces extraits stimulent l'activité de l'élastase, effet contraire à ce que l'on recherche.

Des études ont démontré que certains extraits de plantes à 100 µg/mL pouvaient inhiber de plus de 50% l'activité de l'enzyme. C'est le cas d'un extrait hydro-alcoolique d'*Areca catechu* qui inhibe de 60% l'élastase (Lee et al., 1999), ou encore d'un extrait aqueux de *Camelia sinensis* qui l'inhibe de 89% (Thring et al., 2009). Ainsi aucun de nos extraits ne peut être considéré comme inhibiteur efficace de l'élastase. De plus, la faible activité détectée dans AmE n'est enrichie dans aucune des fractions. Aucune molécule pure n'a donc été testée sur cette cible biologique.

2. Activité anti-collagénase

a. Activité des extraits

L'activité anti-collagénase des différents extraits est exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport au témoin négatif, c'est-à-dire sans extrait. Le témoin positif utilisé est la 1,10-phénantroline. Plus le pourcentage est élevé plus l'extrait inhibe l'activité de l'enzyme, ce qui est l'effet recherché.

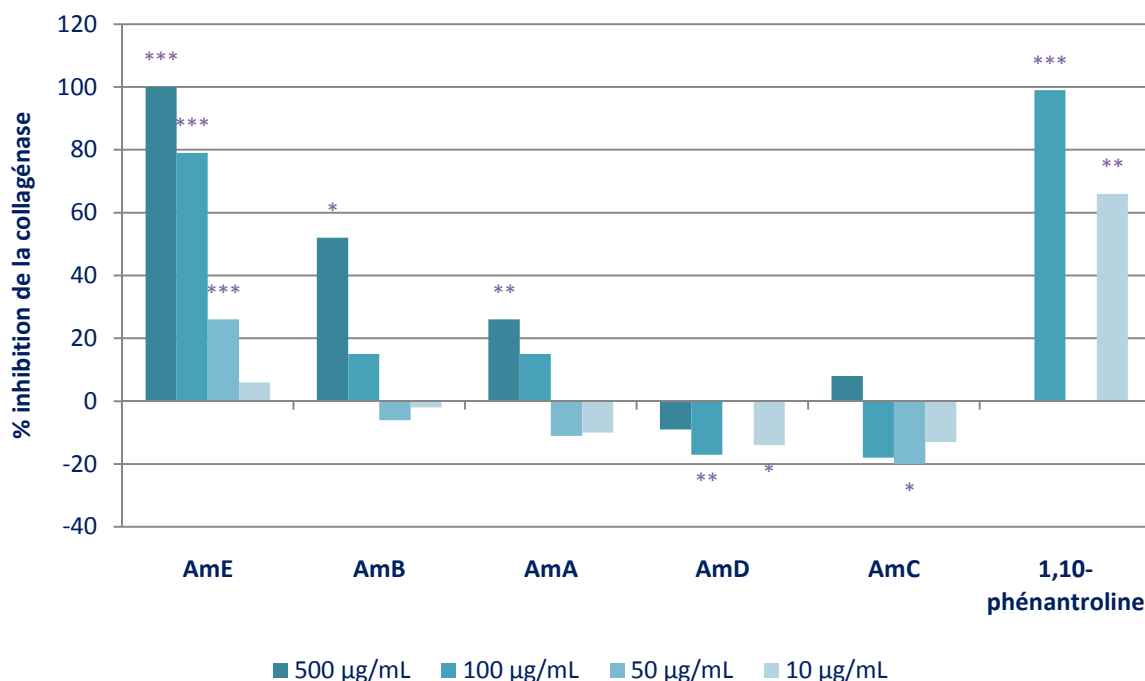


Figure 2.103 : Evaluation de l'activité anti-collagénase des différents extraits d'*A. maritima*
 Statistiques réalisées par rapport au groupe témoin (test de Student bilatéral à variance inégale) :
 * $0,01 < p < 0,05$; ** $0,001 < p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

L'extrait brut montre une excellente activité anti-collagénase puisqu'on observe une inhibition de 100% à 500 µg/mL et une relation effet-dose marquée. Nous trouvons dans la littérature des données sur des extraits végétaux très actifs, comme le cas du thé blanc (déjà actif sur l'élastase) qui inhibe de 87% la collagénase à 100 µg/mL (Thring et al., 2011) ou encore un extrait de marc de raisin qui inhibe de 80% l'enzyme à 35,3 µg/mL. L'extrait AmB montre également une activité intéressante puisqu'il inhibe de 52% l'activité de la collagénase à 100 µg/mL. L'extrait AmA est légèrement actif aussi avec une activité de 26%. L'activité d'AmE n'a donc pas été enrichie mais plutôt diluée lors du processus de fractionnement puisque l'extrait brut présente une activité supérieure à celle des deux extraits AmA et AmB qui en

sont issus. Comme dans le cas de l'élastase, les extraits AmD et AmC stimulent l'activité enzymatique, ce qui est contraire à l'effet recherché.

Il est intéressant d'avoir testé l'activité des extraits sur deux enzymes différentes impliquées dans le vieillissement cutané. Cela nous a permis de voir que les mêmes extraits présentent une activité anti-enzymatique dans les deux tests, néanmoins une certaine spécificité est observée puisque les extraits AmE, AmB et AmA inhibent la collagénase beaucoup plus fortement que l'élastase.

b. Activité des molécules pures

Au vu de l'activité anti-collagénase des extraits AmA et AmB, il nous a semblé intéressant de tester les acides phénoliques, certains flavonol monoglycosides et deux flavonol diglycosides issus de ces extraits sur cette cible biologique. Nous avons également évalué l'activité des génines des flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine), bien que celles-ci n'aient pas été isolées dans les extraits, pour connaître l'influence de la forme hétérosidique sur cette activité.

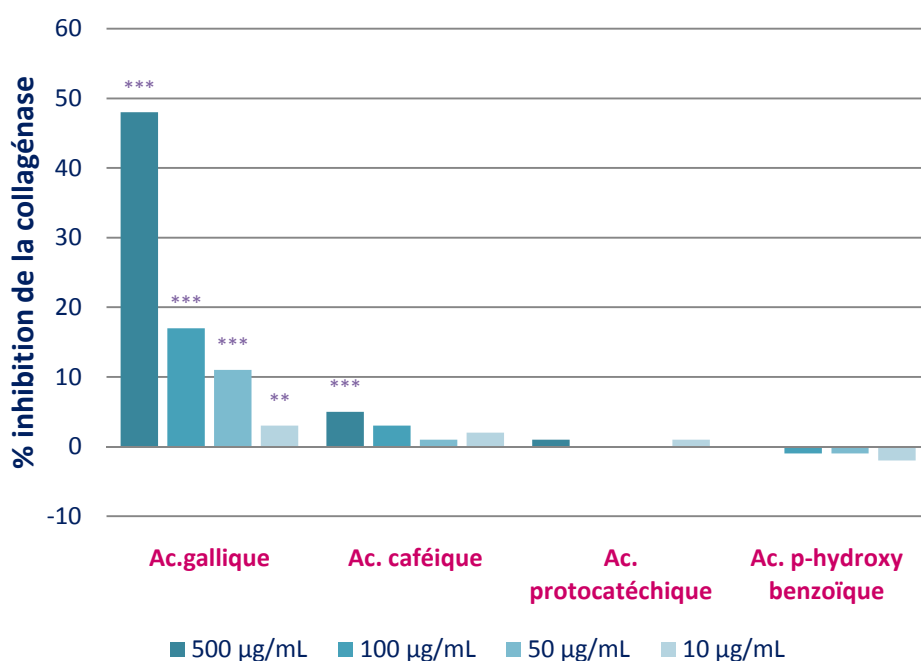


Figure 2.104 : Evaluation de l'activité anti-collagénase des différents acides phénoliques issus de l'extrait AmA d'*A. maritima*

Statistiques réalisées par rapport au groupe témoin (test de Student bilatéral à variance inégale) :

*0,01<p<0,05 ; **0,001<p<0,01 et ***p<0,001.

Les quatre acides phénoliques (acides gallique, caféique, protocatéchique, *p*-hydroxybenzoïque) testés sont issus de l'extrait AmA. Excepté l'acide gallique qui inhibe 48% de l'activité de l'enzyme à 500 µg/mL, les acides phénoliques ne présentent aucun effet sur l'activité de cette enzyme. De plus, une relation entre la concentration et l'efficacité est observée pour cette molécule. A noter que l'acide gallique diffère des acides protocatéchique et hydroxybenzoïque seulement par le nombre de groupements hydroxyles sur le cycle aromatique (Figure 2.105). Ainsi ce paramètre semble jouer un rôle déterminant dans l'activité anti-collagénase de la molécule.

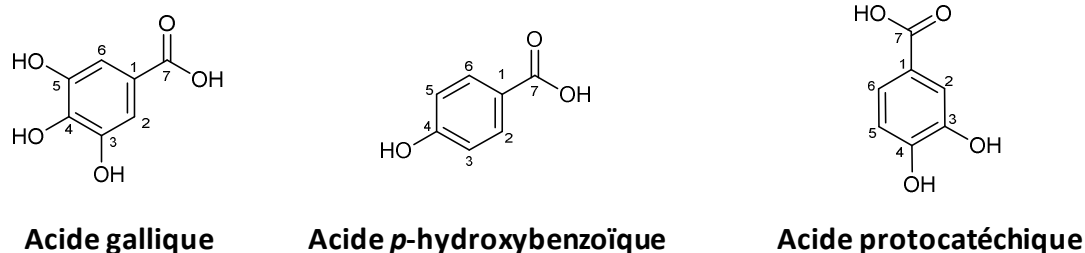


Figure 2.105 : Structures d'acides phénoliques testés sur l'activité collagénase

Néanmoins nous n'atteignons pas les valeurs citées dans la littérature pour l'acide gallique avec des CI_{50} variant de 1,0 µg/mL (Buddhachat et al., 2017) à 127 µg/mL (Wittenauer et al., 2015). Les collagénases utilisées dans ces tests ne sont pas toutes de même nature ce qui peut expliquer de telles variations.

Pour la suite de notre étude sur les activités anti-enzymatiques des molécules pures, nous nous sommes intéressés aux flavonoïdes précédemment isolés à partir d'*A. maritima* (cf § II.C.2). Les génines testées (Figure 2.107) ne sont pas issues d'*A. maritima*, il s'agit de produits commerciaux utilisés pour étudier des conclusions sur la relation structure-activité ; la myricitrine a été isolée dans l'extrait AmA et les diglycosides de flavonol dans l'extrait AmB (Figure 2.108).

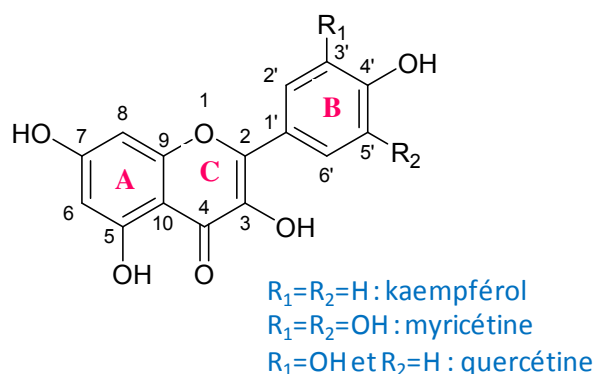


Figure 2.107 : Structure des aglycones testés

Concernant les génines, on observe une inhibition de la collagénase supérieure à 90% pour la myricétine et le kaempférol à 500 µg/mL. L'activité anti-collagénase du kaempférol et de la myricétine avait déjà été décrite (Lim and Kim, 2007; Sin and Kim, 2005). La quercétine présente une activité plus de deux fois plus faible que les deux autres génines testées. La structure du noyau B des flavonols semble donc jouer un rôle dans l'inhibition de la collagénase (Figure 2.107). Lim et Kim (2007) ont déterminé une CI_{50} sur la collagénase de 11,32 µg/mL pour le kaempférol (Lim and Kim, 2007), alors que nous avons trouvé une CI_{50} supérieure à 50 µg/mL (Figure 2.106). Pour la quercétine, des CI_{50} de 0,96 µg/mL, 71 µg/mL et 13,19 µg/mL ont été reportées (Buddhachat et al., 2017; Lim and Kim, 2007; Nguyen et al., 2013), démontrant une grande hétérogénéité dans les valeurs retrouvées dans la littérature, comme c'était le cas pour l'acide gallique. Il n'est donc pas forcément très sensé de comparer nos valeurs à celles-ci, il est préférable de simplement observer les tendances. Ainsi, pour les génines on observe les mêmes tendances que Sin and Kim, 2005 c'est-à-dire une activité deux fois supérieure en moyenne pour le kaempférol et la myricétine que pour la quercétine.

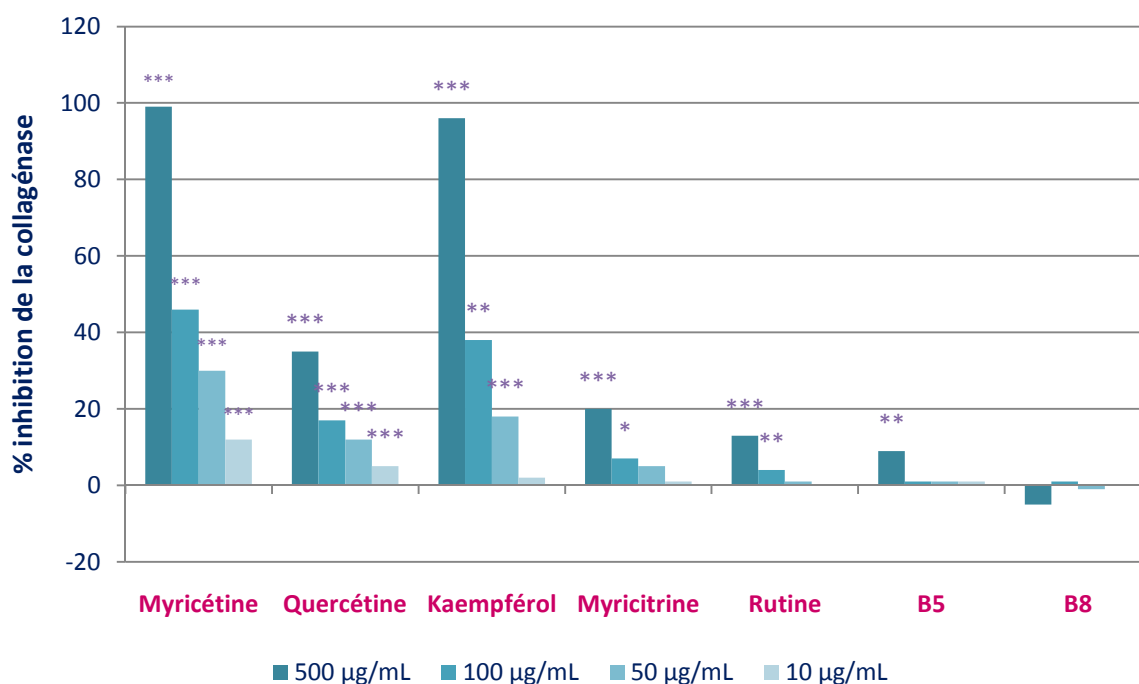


Figure 2.106 : Evaluation de l'activité anti-collagénase de différents flavonoïdes issus des extraits AmA ou AmB d'*A. maritima*

B5: Myricétine-3-*O*-vicianoside

B8 : Myricétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl(1" \rightarrow 6")- β -D-glucopyranoside

Statistiques réalisées par rapport au groupe témoin (test de Student bilatéral à variance inégale) :

*0,01<p<0,05 ; **0,001<p<0,01 et ***p<0,001.

Ensuite un flavonol monoglycosylé, la myricitrine, et 3 flavonols diglycosylés (rutine, B5, B8) ont été testés (Figure 2.108). La myricitrine inhibe de 20 % de l'activité collagénase, alors que les diglycosides ne présentent eux, aucune activité anti-collagénase. La chaîne osidique en position 3 diminue donc fortement l'activité inhibitrice des flavonols sur la collagénase. En effet, lorsqu'un rhamnose est greffé en position 3 de la myricétine on observe une inhibition quatre fois moins importante de l'enzyme. Cette inhibition décroît encore d'un facteur deux quand deux sucres sont greffés à la myricétine. Ceci signifie que le OH libre en position 3 joue un rôle important dans la structure du pharmacophore. Ceci avait déjà été décrit par Sin and Kim, 2005, qui montraient une activité meilleure pour les flavonols que pour les flavones. Il a par ailleurs été démontré que la glycosylation des flavonoïdes pouvait diminuer leur interaction avec les protéines, ce qui explique également nos résultats (Cao et al., 2009). Nous avons également observé une différence d'activité entre les 3 diglycosides, ce qui signifie que la nature des sucres influe sur l'activité anti-enzymatique. On observe même une différence selon la cyclisation pyrane ou furane de l'arabinose (B5 et B8), ce qui pourrait suggérer que l'encombrement stérique joue un rôle important.

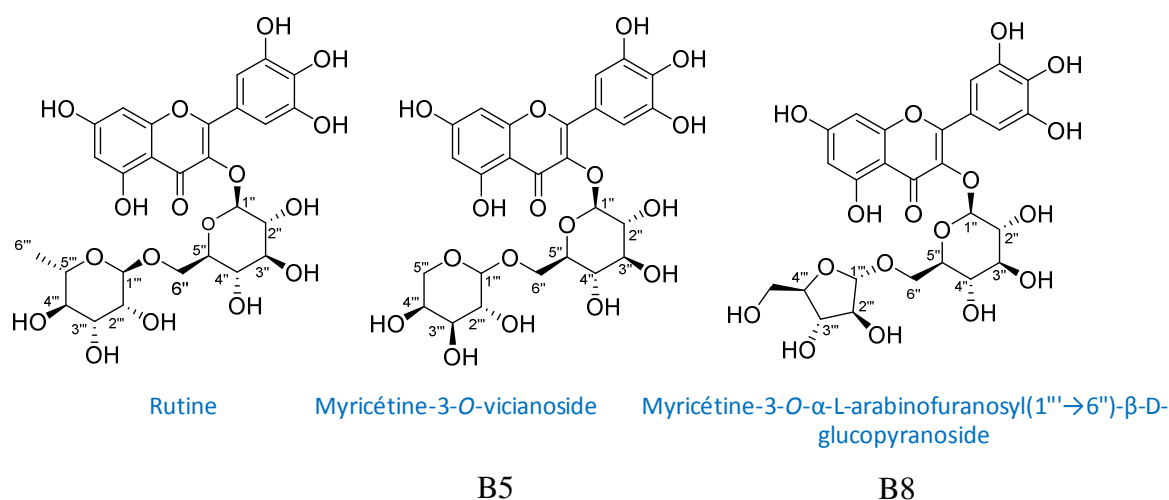


Figure 2.108 : Structures des diglycosides de flavonoïdes testés

Au vu des faibles activités observées pour les hétérosides, nous avons pris le parti de ne pas tester l'ensemble des diglycosides isolés sur cette cible biologique.

Il est possible d'imaginer que les flavonoïdes glycosylés d'une formulation cosmétique soient hydrolysés par des glucosidases cutanées ou dégradés par le microbiome cutané, libérant ainsi les génines bio-actives. Ainsi, les hétérosides de flavonol contenus dans notre extrait pourraient devenir bioactifs suite à leur métabolisation *in vivo*.

D. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire de nos extraits a été testée *via* deux tests complémentaires : l'inhibition de la synthèse de monoxyde d'azote (NO), et l'inhibition de la sécrétion de cytokines.

1. Inhibition de la production de NO

Dans un premier temps, la viabilité cellulaire a été mesurée par le test WST, pour s'assurer de la non toxicité des extraits sur les macrophages murins utilisés pour la mesure de l'inhibition de la production de NO (cf. § III.B.1).

Le quercétol est utilisé comme témoin positif dans ce test.

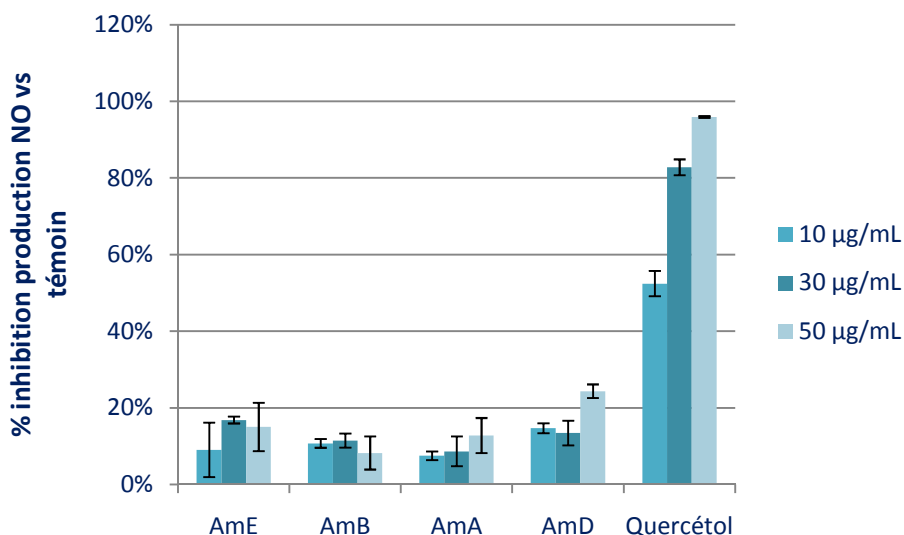


Figure 2.109 : Evaluation de l'effet de différents extraits d'*A. maritima* sur la production de NO par des macrophages murins traités au LPS.

Une faible activité est observée pour les extraits AmE, AmB, AmA, inférieure à 20% d'inhibition de production de NO par rapport au témoin, alors que les génines des flavonoïdes qu'ils contiennent ont déjà montré une activité sur la production de NO (Jiang et al., 2017). En revanche, on observe une inhibition d'environ 20% de la production de NO lorsque les cellules sont traitées avec l'extrait AmD à 50 µg/mL. Néanmoins, pour cet extrait on n'observe pas une corrélation franche entre concentration et effet puisque l'inhibition est peu différente entre 10 µg/mL et 30 µg/mL. Nous n'atteignons donc pas le pouvoir inhibiteur de certaines halophytes décrit dans la littérature (Oueslati et al., 2012; Rodrigues et al., 2014). On retrouve

néanmoins une activité similaire à celle d'un extrait dichlorométhanique de *Limonium densiflorum* ou d'un extrait hexanique de *Zygophyllum album* pour des concentrations similaires aux nôtres (Ksouri et al., 2013; Medini et al., 2015). Il aurait été intéressant de tester, comme ces auteurs, des concentrations plus importantes, jusqu'à 160µg/mL.

Aucune molécule pure n'a été testée sur cet essai biologique vu la faible réponse des extraits.

2. Inhibition de la sécrétion de cytokines

a. Activité des extraits

Comme dans le test précédent, la viabilité cellulaire a été mesurée par le test WST, pour s'assurer de la non toxicité des extraits sur les PBMC (cellules mononuclées sanguines périphériques). On a ainsi observé une légère toxicité des extraits AmA et AmD (cf. § III.2).

La sécrétion de quatre cytokines a été mesurée : le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8. Les résultats sont présentés ci-dessous par extraits et non par cytokines.

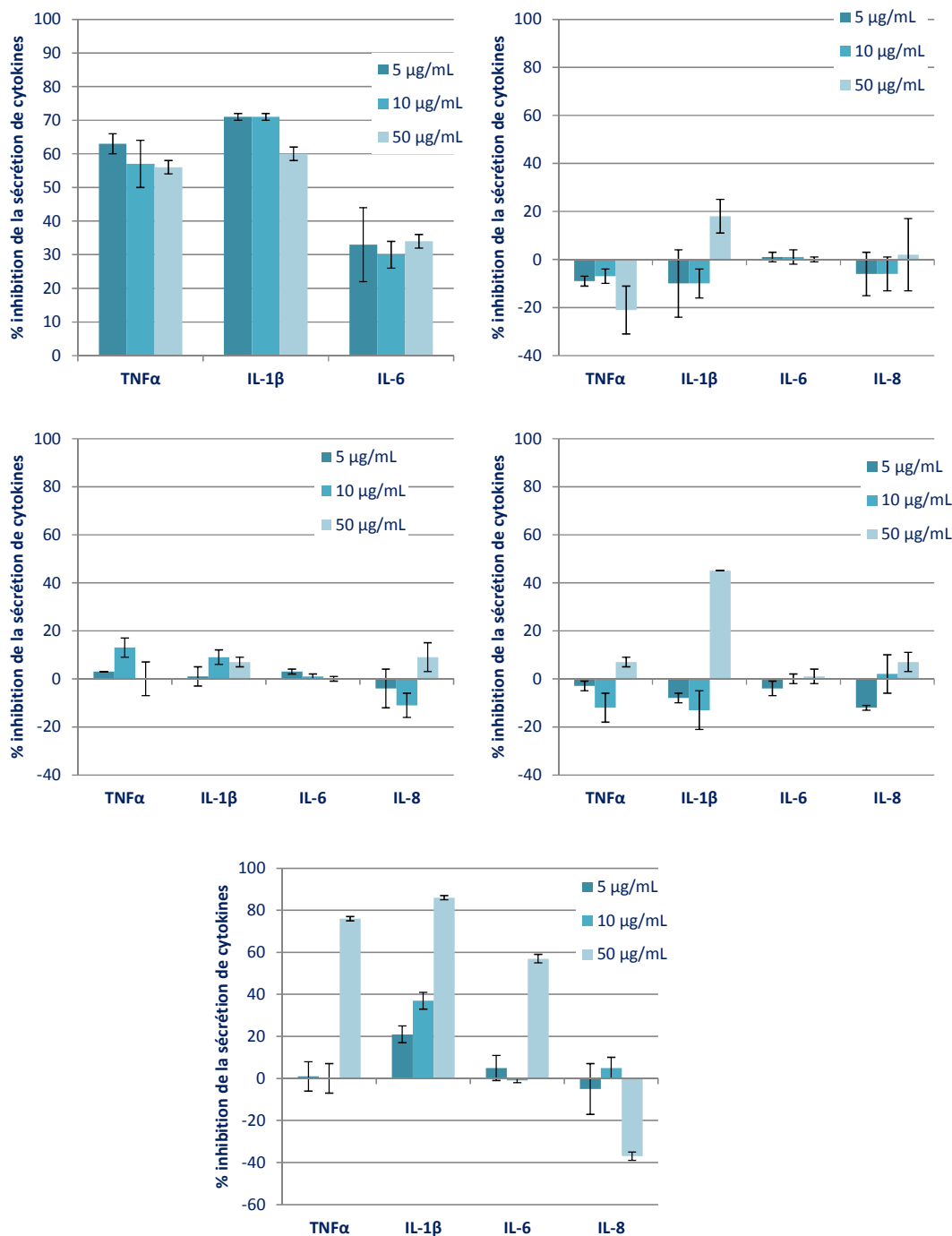


Figure 2.110 : Evaluation de l'effet des extraits d'*A. maritima* sur la sécrétion de cytokines par des PBMC traitées au LPS.

La dexaméthasone est une hormone gluco-corticoïde de synthèse qui possède un effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur. Cette molécule a été choisie comme témoin positif pour ce test, excepté pour l'IL-8 sur laquelle elle n'agit pas. On observe une activité inhibitrice de la dexaméthasone sur la sécrétion de cytokines TNF α et IL-1 β , et de façon moins importante sur IL-6.

L'extrait AmE (extrait brut) n'inhibe pas la sécrétion de cytokines, excepté pour l'IL-1 β à 50 $\mu\text{g/mL}$. Néanmoins, la barre d'erreur étant importante, cet effet semble peu significatif.

L'extrait AmB n'inhibe pas la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires puisque le pourcentage d'inhibition est toujours inférieur à 15% quelle que soit la cytokine dosée. De plus, là aussi une grande variabilité a été observée puisque les barres d'erreur sont très importantes.

L'extrait AmA n'inhibe pas la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires exceptée l'IL-1 β dont la sécrétion est inhibée de 45% lorsque les cellules sont traitées avec l'extrait AmA à 50 $\mu\text{g/mL}$. On observe donc une spécificité au niveau de la cytokine affectée, néanmoins, aucune relation effet-dose n'est observée. Les molécules pures issues d'AmA ont donc été testées ultérieurement sur ce modèle anti-inflammatoire.

L'extrait AmD inhibe fortement la sécrétion du TNF α , de l'IL-1 β et de l'IL-6 à 50 $\mu\text{g/mL}$, mais pas celle de l'IL-8. Il y a donc une activité spécifique sur la sécrétion de certaines cytokines pro-inflammatoires. Les fortes inhibitions sont répétables puisque les barres d'erreur sont très faibles. De plus, pour l'IL-1 β , on observe une réelle relationnel effet-dose. Des cas de spécificité d'inhibition vis-à-vis de la sécrétion de certaines cytokines ont déjà été décrits dans la littérature, comme pour le poivre ou le basilic (Mueller et al., 2010). On voit que l'extrait le plus actif, AmD, est aussi celui qui avait montré la cytotoxicité la plus forte. Il serait possible d'imaginer un lien entre la cytotoxicité et l'inhibition de la sécrétion de cytokines, néanmoins, le fait que la sécrétion de l'IL-8 ne réponde pas de la même manière que les autres cytokines, confirme que l'activité n'est pas un artefact dû à la cytotoxicité. L'activité de l'extrait AmD étant très intéressante, des molécules issues de cet extrait seront également testées pour leur activité inhibitrice de la sécrétion de cytokines.

Les flavonoïdes sont connus pour leur pouvoir anti-inflammatoire (Kim et al., 2004a; Nair et al., 2006; Park et al., 2008). Ainsi nous avons testé sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, l'effet des flavonoïdes identifiés précédemment dans les extraits AmA et AmB, pour lesquels nous avons suffisamment de masse, et ce malgré l'absence d'activité des extraits.

b. Activité des acides phénoliques et phénols

Les acides caféique, gallique, protocatéchique et *p*-hydroxybenzoïque ont été testés. Aucun ne présente d'effet sur la viabilité cellulaire.

Les acides protocatéchique et *p*-hydroxybenzoïque n'inhibent pas la sécrétion de cytokines par les PBMC.

L'acide caféique inhibe de 86 % la sécrétion d'IL-1 β à 50 μ g/mL, mais sans relation dose-effet. Il présente un très léger effet inhibiteur de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8. L'acide gallique montre également une activité inhibitrice de 62% sur la sécrétion d'IL-1 β à 50 μ g/mL, mais en revanche pas d'effet sur IL-6 et IL-8, et une inhibition de 32% de la sécrétion de TNF α à 50 μ g/mL. Il existe donc des spécificités selon les molécules et selon les cytokines. A noter, que cette spécificité cytokinique est cohérente avec les résultats obtenus pour l'extrait AmA, dont sont issus les acides gallique et caféique qui inhibaient spécifiquement l'IL-1 β .

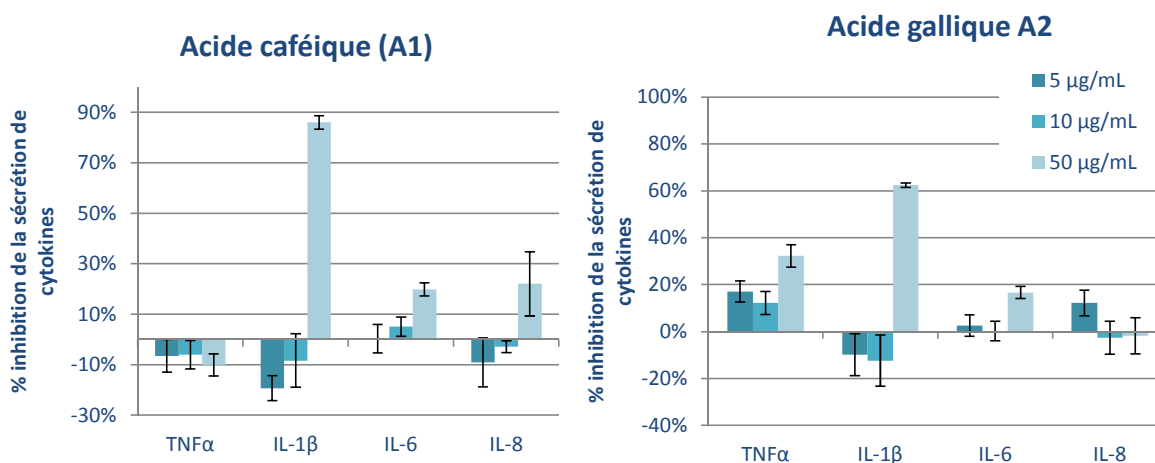


Figure 2.111 : Evaluation de l'effet de l'acide caféique et l'acide gallique sur la sécrétion de cytokines par des PBMC traitées au LPS.

L'activité de l'acide caféique sur la sécrétion d' IL-1 β uniquement avait déjà été démontrée lors d'une étude sur l'intérêt de l'acide caféique dans l'inflammation cutanée chronique (Zhang et al., 2014). Mais, contrairement aux auteurs de cette étude, nous n'avons pas trouvé d'effet sur la sécrétion de TNF α et d'IL-8. L'acide gallique avait déjà montré un effet anti-inflammatoire dans le cas de dermatite atopique (Tsang et al., 2016). Sa propriété inhibitrice de la sécrétion de TNF α et d'IL-1 β avait déjà été mise en évidence (Kim et al., 2006; Morais et al., 2010; Sarkaki et al., 2015).

L'activité de phénols simples isolés à partir de l'extrait AmD (Figure 2.112) a également été mesurée. Le *p*-hydroxybenzaldéhyde (D1), le *p*-hydroxyacétophénone (D2) et le *p*-hydroxyphényléthanol (D3) n'ont pas d'effet sur la viabilité cellulaire

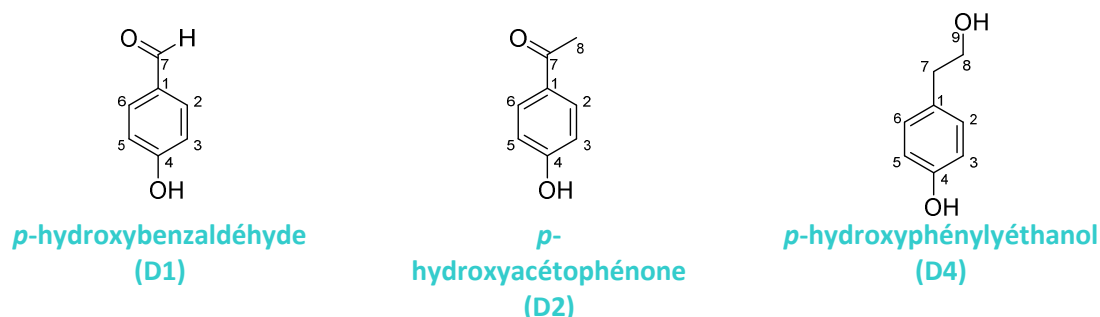


Figure 2.112 : Phénols simples isolés de AmD

La *p*-hydroxyacétophénone inhibe de 28% la production de TNF α à 50 μ g/mL, les deux autres molécules n'inhibent pas la production de cytokines pro-inflammatoires. Les pouvoirs anti-inflammatoires de la *p*-hydroxyacétophénone avaient déjà été démontrés (Alvarez et al., 2000; Ching-Wen et al., 2017) mais jamais directement sur la production de TNF α . (*Données non présentées ici*).

c. Activité des flavonols monoglycosylés

L'activité de 6 flavonols monoglycosylés a été testée. Il s'agit de : myricétine-3-*O*- β -D-glucopyranoside (A6), kaempférol-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (A7), myricétine-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (A9), quercétine-3-*O*- α -L-(4''-*O*-acétyl)-rhamnopyranoside (A10), kaempférol-3-*O*- β -D-(6''-*O*-*trans*-*p*-coumaroyl)-glucopyranoside (A11), myricétine-3-*O*- β -D-(6''-*O*-*trans*-*p*-coumaroyl)-glucopyranoside (A12). Aucune de ces 6 molécules ne présentent d'effet sur la viabilité cellulaire.

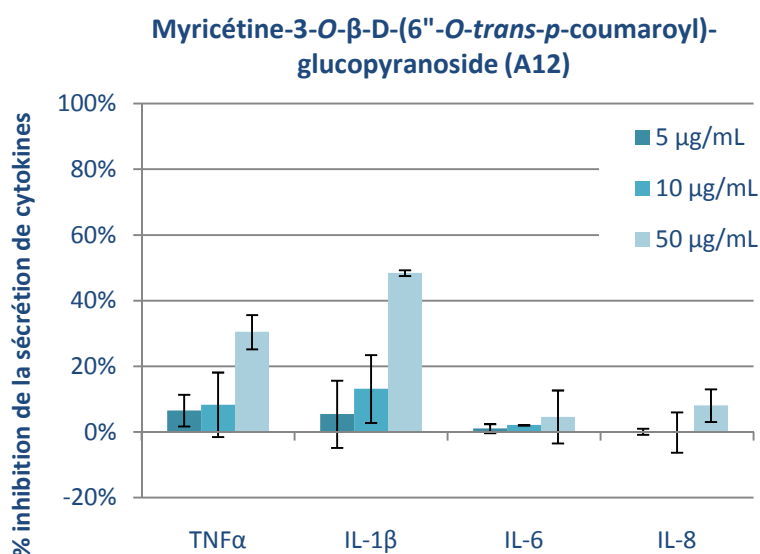


Figure 2.113 : Evaluation de l'effet de la molécule A12 sur la sécrétion de cytokines par des PBMC traitées au LPS.

A6, A7 et A10 n'inhibent pas la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. (*Données non présentées ici*).

La myricétine-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (A9) inhibe de 47% la sécrétion d'IL-1 β à 50 $\mu\text{g/mL}$. Une relation dose-effet est également observée avec des inhibitions de 4 et 16 % pour 5 et 10 $\mu\text{g/mL}$ respectivement. Cette activité n'avait encore jamais été démontrée. Le fait que cette molécule soit active, et pas la myricétine-3-*O*- β -D-glucopyranoside (A6) ni le kaempférol-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (A7), signifie que les hydroxylations sur le cycle B du flavonoïde, ainsi que le sucre en position 3, sont déterminants dans l'activité inhibitrice de la sécrétion d'IL-1 β .

La myricétine-3-*O*- β -D-(6''-*O*-*trans*-*p*-coumaroyl)-glucopyranoside (A12) inhibe la sécrétion du TNF α et d'IL-1 β de façon dose dépendante (Figure 2.113), ce qui n'avait jamais été démontré jusqu'à présent sur cette molécule (isolée une seule fois avant notre étude). La myricétine-3-*O*- β -D-glucopyranoside n'étant pas active, c'est donc l'estérification par un acide coumarique qui rend la molécule A12 active.

Le kaempférol-3-*O*- β -D-(6''-*O*-*trans*-*p*-coumaroyl)-glucopyranoside ne présente pas d'activité inhibitrice de la production de cytokines pro-inflammatoires, ce qui démontre encore une fois l'importance des hydroxylations sur le cycle B du flavonol. La triple hydroxylation est une

condition nécessaire mais pas suffisante pour conférer une activité, puisqu'il faut également que le sucre soit estérifié par un acide coumarique.

d. Activité des flavonols diglycosylés

L'activité de 7 flavonols diglycosylés a été testée. Il s'agit de : myricétine-3-*O*-rutinoside (**B2**), quercétine-3-*O*-rutinoside (**B3**), myricétine-3-*O*-vicianoside (**B5**), quercétine-3-*O*-vicianoside (**B6**), kaempférol-3-*O*-vicianoside (**B7**), myricétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1"^{'''}→6")- β -D-glucopyranoside (**B8**), quercétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1"^{'''}→6")- β -D-glucopyranoside (**B9**). Aucune de ces 7 molécules ne présente d'effet sur la viabilité cellulaire.

La quercétine-rutinoside et la myricétine-rutinoside n'inhibent pas la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Il en est de même pour le kaempférol-3-*O*-vicianoside, la quercétine-3-*O*-vicianoside et la quercétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1"^{'''}→6")- β -D-glucopyranoside. Seules la myricétine-3-*O*-vicianoside et la myricétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1"^{'''}→6")- β -D-glucopyranoside inhibent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

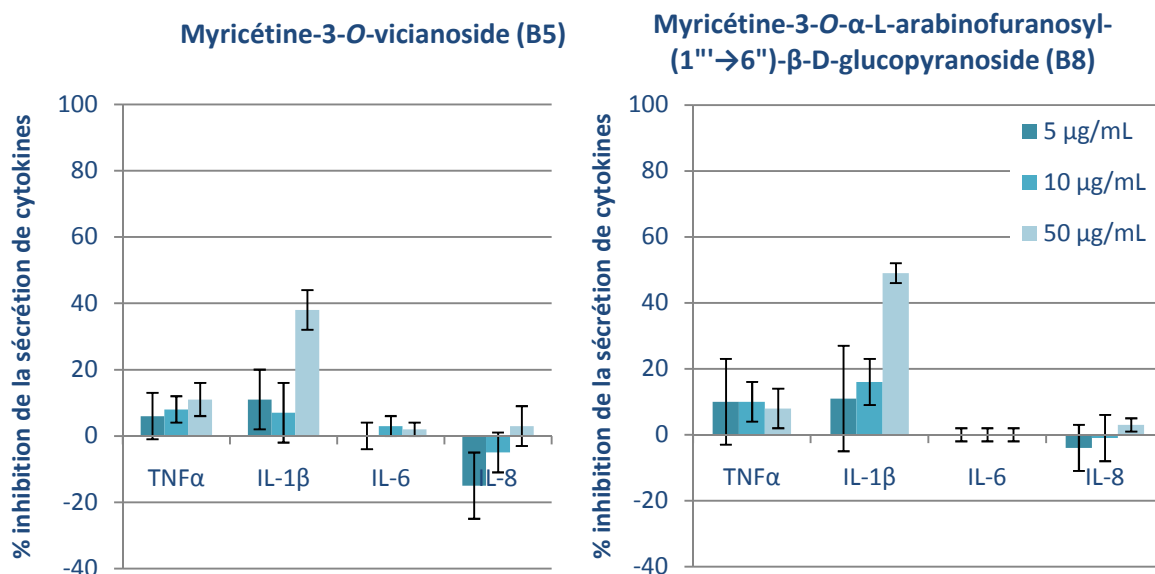


Figure 2.114 : Evaluation de l'effet des molécules B5 et B8 sur la sécrétion de cytokines par des PBMC traitées au LPS.

L'activité de ces deux flavonoïdes sur la sécrétion de cytokines a été testée ici pour la première fois. Pour les deux molécules, on observe une spécificité vis-à-vis de la nature de la cytokine. En effet les deux flavonols inhibent spécifiquement la sécrétion d'IL-1 β , avec un pourcentage d'inhibition allant jusqu'à 49% pour la myricétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1"^{'''}→6")- β -D-glucopyranoside à 50 μ g/mL et 38% pour la myricétine-3-*O*-

vicianoside à la même concentration. Ces activités n'avaient jamais été décrites auparavant puisqu'il s'agit de molécules nouvellement décrites. A noter que dans ce cas, la nature de la chaîne osidique ne semble pas influencer sur l'activité.

Dans la littérature il est très souvent décrit que la présence de glycosylation influe sur l'activité inhibitrice de sécrétion de cytokines (Xiao et al., 2014), mais il n'existe que peu d'informations quant à l'influence de la nature des sucres. Nous avons ici démontré l'importance de la nature de la chaîne osidique, puisque l'on observe une disparition de l'activité quand l'arabinose des diglycosides de myricétine est remplacé par un rhamnose

e. Activités des lignanes et mégastigmanes

A cause de la faible quantité de molécules isolées, seulement deux molécules ont pu être testées. Il s'agit du 9-cétone-5,6-époxy-3-hydroxy- β -ionol (**D8**) et du pinorésinol (**D4**). Aucune de ces molécules n'a d'impact sur la viabilité cellulaire. Le mégastigmane (D8) ne possède pas d'effet inhibiteur de la production de cytokines pro-inflammatoires (*données non présentées ici*).

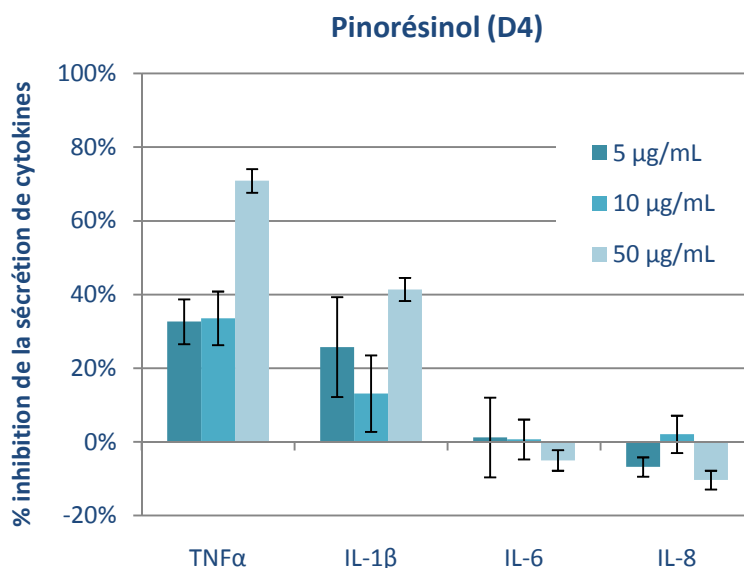


Figure 2.115 : Evaluation de l'effet du pinorésinol sur la sécrétion de cytokines par des PBMC traitées au LPS.

Le pinorésinol inhibe de 71% la sécrétion de TNF α à 50 μ g/mL, et de plus de 30% à 10 et 50 μ g/mL. Ce lignane inhibe également la sécrétion d'IL-1 β de 41% à 50 μ g/mL. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour l'extrait AmD dont le pinorésinol est issu. Cette activité anti-inflammatoire du pinorésinol avait déjà été démontrée avec des ordres de

grandeur similaires (Cho et al., 1998; Jung et al., 2010). Néanmoins, le pinorésinol que nous avons isolé étant en mélange racémique, il serait donc intéressant de séparer les deux énantiomères et vérifier s'ils possèdent des activités biologiques différentes.

f. Conclusion sur l'inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires

L'extrait **AmA** a montré une activité inhibitrice sur la sécrétion **d'IL-1 β** . Cette activité pourrait être attribuée aux acides caféique et gallique, ainsi qu'à la myricitrine et à la myricétine-3-*O*- β -D-(6"-*O*-*trans-p*-coumaroyl)-glucopyranoside qui sont actives sur la même cytokine. **L'extrait AmD inhibe la sécrétion d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF α** . Le **pinorésinol** a montré une très bonne activité sur la sécrétion d'IL-1 β et du TNF α , alors que le mégastigmane n'a montré aucun effet. Les lignanes seraient donc à l'origine de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait AmD. Les **myricétine-3-*O*-vicianoside et myricétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside** ont également montré une activité intéressante, bien que l'extrait AmB dont elles sont isolées ne soit pas actif sur la sécrétion d'IL-1 β .

Concernant les flavonoïdes, dans tous les cas, si la génine est une quercétine ou un kaempférol, aucune activité n'est observée, seules des activités ont été observées avec la myricétine. Quant à la nature du sucre, elle semble jouer un rôle dans certain cas, comme par exemple entre le glucose et le rhamnose dans le cas des monoglycosides, ou encore entre le rhamnose et l'arabinose dans les diglycosides, mais aucune véritable relation structure-activité ne peut être réalisée à ce niveau.

E. Activité cicatrisante

Dans la littérature, *Plumbago zeylanica* (Plumbaginaceae) est cité pour son pouvoir cicatrisant (Kodati et al., 2011; Reddy et al., 2002), c'est pourquoi il nous a paru intéressant de tester l'activité cicatrisante des extraits d'*A. maritima*, en mesurant la migration des kératinocytes après la formation d'une blessure dans le tapis cellulaire (cf. Chap.4, § VI.D). Les résultats sont exprimés en pourcentage de densité relative de la blessure. A 100%, on considère que la blessure est réparée. Donc plus vite on atteint les 100%, plus l'extrait a une activité cicatrisante. L'EGF (facteur de croissance épidermique) est utilisé comme contrôle positif.

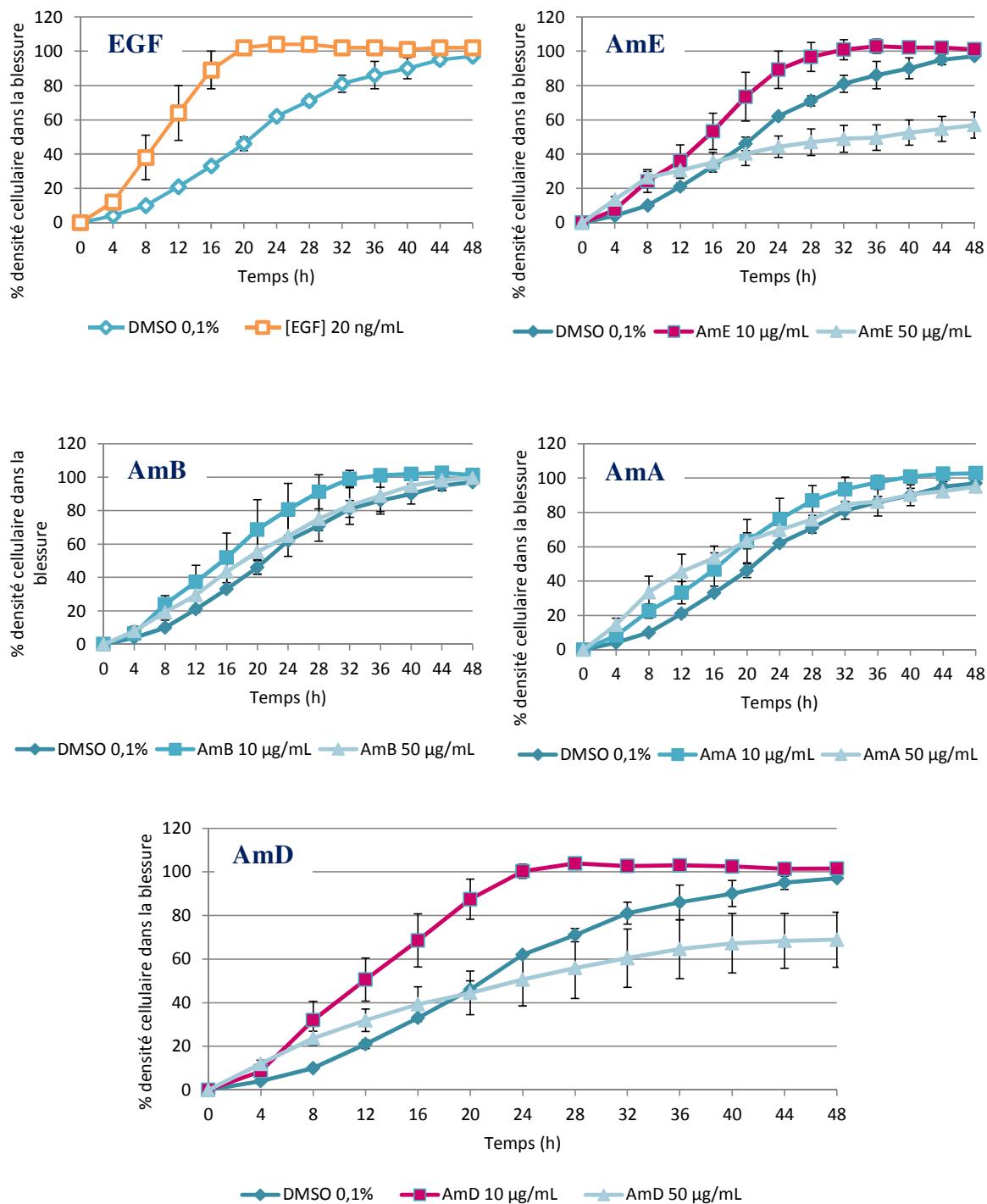


Figure 2.116 : Effet des différents extraits d'*A. maritima* sur la migration de kératinocytes

L'EGF est très puissant puisqu'il permet à 20 ng/mL de réparer la blessure en 20h, par rapport aux 48h nécessaires dans le contrôle négatif.

L'extrait brut (AmE) présente une légère activité à 10 µg/mL puisqu'il permet de refermer la blessure en 32h, contre 48h dans le témoin négatif. Cependant, à 50 µg/mL, on observe un effet contraire puisqu'en 48h, la migration des kératinocytes n'est toujours pas terminée, ce qui

pourrait être expliqué par un éventuel ralentissement du métabolisme cellulaire. Au cours de l'expérience, les cellules sont observées au microscope et aucun signe de mort cellulaire n'a été observé.

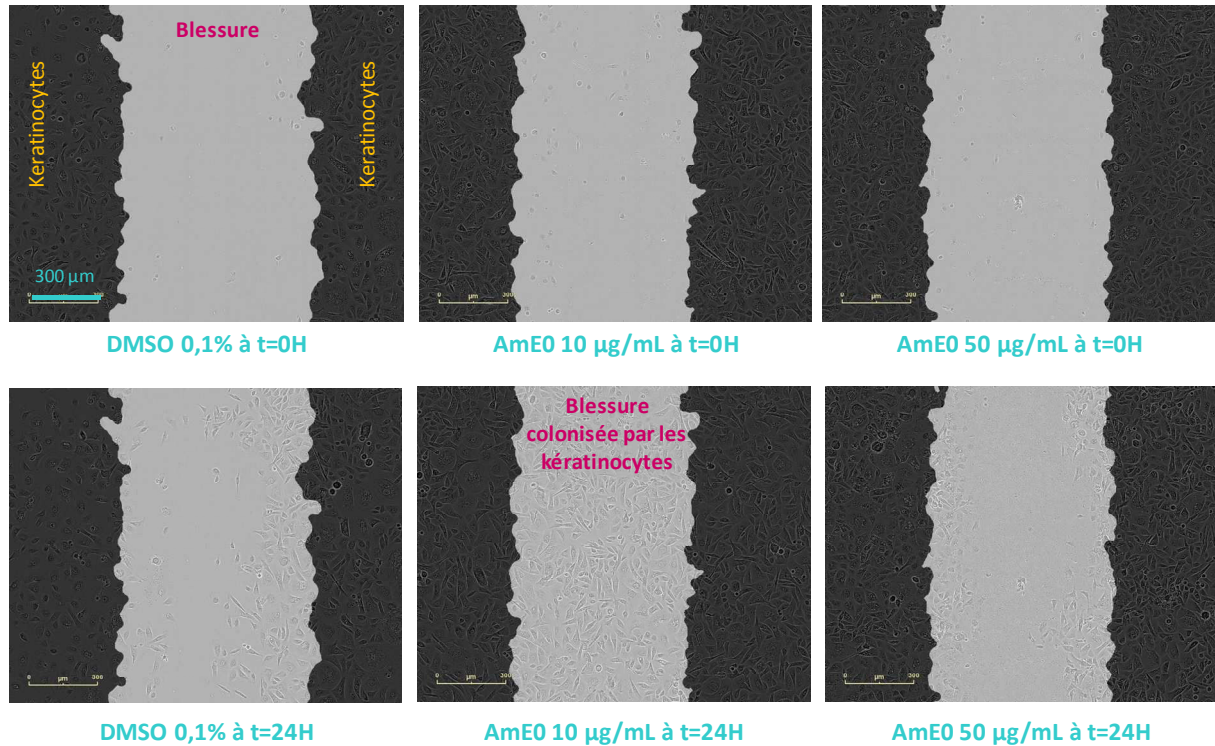


Figure 2.117 : Observation microscopique de la migration des kératinocytes par l'INCUCYTE après différents traitements (DMSO et AmE à 10 et 50 µg/mL)

Les extraits AmA et AmB ne présentent pas d'activité cicatrisante, puisque lorsque les cellules sont traitées avec ces extraits, le temps nécessaire à la fermeture de la blessure est le même que dans le témoin négatif.

AmD présente un profil d'activité similaire à AmE avec un pouvoir cicatrisant à 10 µg/mL mais pas à 50 µg/mL. Il permet de diviser par deux le temps nécessaire à la migration complète des kératinocytes par rapport au témoin. L'extrait AmD doit contenir les molécules responsables de cette activité, initialement présentes dans AmE. Des travaux sont en cours sur le pouvoir cicatrisant des molécules isolées dans AmD. Néanmoins, pour que la cicatrisation se fasse *in vivo*, une étape d'inflammation est nécessaire (cf. Chap.1, § II 3) et nous avons montré qu'AmD est un puissant anti-inflammatoire. AmD ne pourrait donc pas être utilisé en tant que tel comme actif cicatrisant.

Un pouvoir cicatrisant a déjà été démontré dans la littérature pour des extraits riches en flavonoïdes (Ambiga et al., 2007; Süntar et al., 2010), c'est pourquoi, malgré l'absence d'effet cicatrisant des fractions AmA et AmB, nous avons testé l'activité de deux molécules pour lesquelles nous avons suffisamment de masse : la myricitrine et la myricétine-3-*O*-vicianoside.

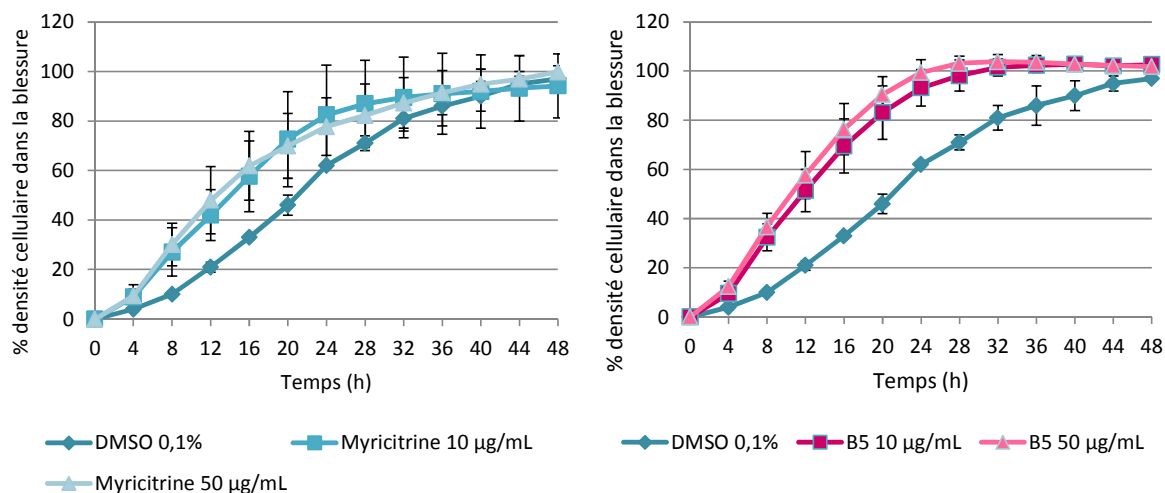


Figure 2.118 : Evaluation du pouvoir cicatrisant de deux flavonoïdes extraits d'*A. maritima* sur des kératinocytes (B5 : myricétine-3-*O*-vicianoside)

La myricitrine n'a pas d'effet significatif sur la migration des kératinocytes alors que la myricétine diglycoside (B5) présente un effet important. En effet, en présence de myricétine diglycoside, dès une concentration de 10 µg/mL, la migration cellulaire est achevée à 26h, alors qu'elle s'étend sur 48h dans le témoin. Nous pouvons donc conclure que la chaîne osidique joue un rôle important dans le pouvoir cicatrisant de la myricétine glycosylée (Figure 2.119). De plus, on voit que l'efficacité est similaire pour les deux concentrations testées (10 et 50 µg/mL), ainsi 10 µg/mL suffisent pour atteindre une activité optimale.

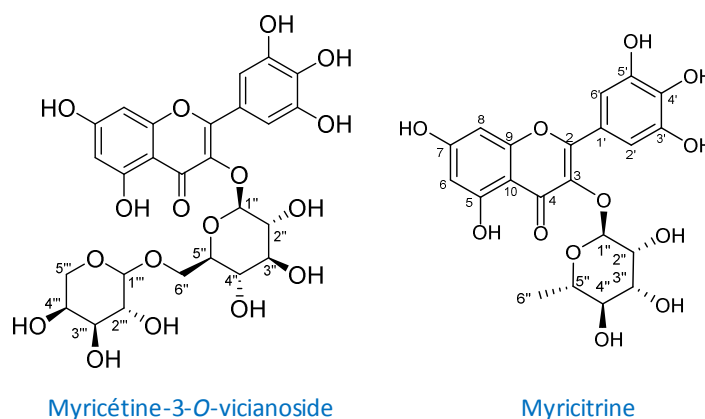


Figure 2.119 : Structure des hétérosides de myricétine testés

F. Conclusion sur les activités biologiques d'*A. maritima*

L'extrait brut, ainsi que les extraits AmB (BuOH), AmA (AcOEt) et AmD (DCM) possèdent des **activités anti-oxydantes très intéressantes**, probablement dues à leur richesse en polyphénols, qui sont des **bio-marqueurs potentiels** pour cette activité biologique.

L'extrait brut possède une activité **anti-collagénase**, retrouvée dans les extraits AmA et AmB, mais aucune molécule n'a pu être identifiée comme bio-marqueur de cette activité, excepté l'acide gallique.

Les extraits AmA et AmD inhibent la **sécrétion de cytokines pro-inflammatoires**. Cette activité semble pouvoir être attribuée aux acides gallique et caféique, aux hétérosides de myricétine et au pinorésinol. L'activité inhibitrice de sécrétion d'**IL-1 β** par certains hétérosides de myricétine a été démontrée pour la **première fois** dans nos travaux.

L'extrait AmD a montré un potentiel **pouvoir cicatrisant**, tout comme l'extrait brut. C'est aussi le cas pour la myricétine-3-*O*-vicianoside.

L'utilisation d'un extrait, contenant les mêmes molécules qu'AmD comme actif dermo-cosmétique est à améliorer car celui-ci possède une certaine toxicité. Il sera donc nécessaire d'évaluer les activités biologiques de l'ensemble de ses constituants pour mieux appréhender une potentielle valorisation.

IV. Culture *in vitro* d'*A. maritima*

L'objectif de cette partie est l'obtention de suspensions cellulaires d'*A. maritima*, ce qui nécessite la mise en place d'un protocole de callogénèse efficace. Notre premier critère pour la callogénèse était d'ordre qualitatif, c'est-à-dire centré sur l'obtention de cals friables adaptés à la mise en suspensions, l'aspect quantitatif (pourcentage de callogénèse) n'était que secondaire.

A. Mise en place d'un protocole de callogénèse

1. Essais préliminaires

Des protocoles de callogénèse pour *A. maritima* ont déjà été reportés dans la littérature (Aly et al., 2002a; Brewin et al., 2003) (Tableau 2.14); ils ont constitué le point de départ de nos travaux.

Tableau 2.14 : Protocoles de callogénèse d'*A. maritima* décrits dans la littérature

Référence	Nature des explants	Milieu de callogénèse	% de callogénèse
Aly et al., 2002a	Cotylédons issus de plantules axéniques	<p>Milieu A</p> <ul style="list-style-type: none"> - MS - Vit B5 - Saccharose 30 g/L - 2,4-D 4,5 µM - Kinétine 0,93 µM 	28%
Brewin et al., 2003	Feuilles issues de plantules axéniques	<p>Milieu B</p> <ul style="list-style-type: none"> - MS - Saccharose 30 g/L - NAA 5,3 µM - BAP 0,4 µM 	74%

Initialement nous avons testé les conditions décrites par Aly et al., en partant d'explants foliaires à la place des cotylédons. Nous avons observé un important brunissement des explants voire parfois un rougissement (Figure 2.220). Ce brunissement peut s'expliquer par une oxydation des polyphénols, notamment par des polyphénols oxydases qui convertissent les polyphénols en quinones (Abohatem et al., 2011; Jones and Saxena, 2013).

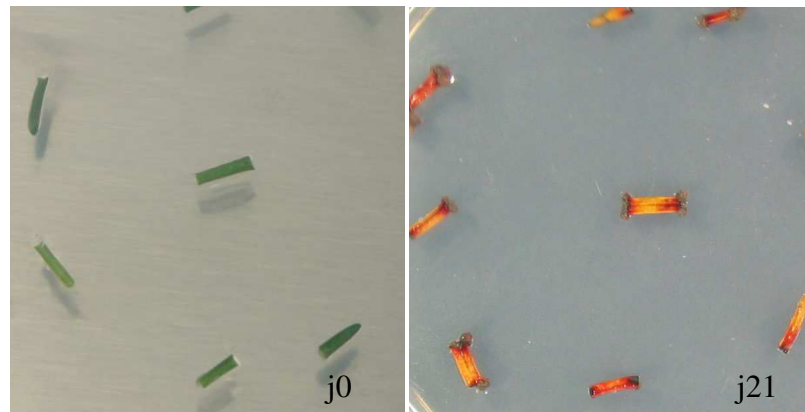


Figure 2.220 : Explants foliaires d'*A. maritima* dans les conditions d'Aly et al. (2002) (milieu A) à la lumière et 25°C

Pour contrecarrer cet effet, nous avons incorporé dans le milieu du charbon actif, afin de piéger l'excès de polyphénols pouvant être à l'origine de ces brunissements (Ahmad et al., 2013; Thomas, 2008), mais aucune amélioration n'a été observée. Nous avons aussi testé l'augmentation de la fréquence des repiquages, sans succès là non plus. Ensuite, les explants ont été placés à l'obscurité et c'est cette condition qui a permis de s'affranchir du brunissement en limitant l'oxydation (Dobrąnszki and Teixeira da Silva, 2010; Gow et al., 2009). Ainsi le reste des travaux sur la callogénèse d'*A. maritima* a été réalisé à l'obscurité. En même temps que ce changement d'exposition à la lumière, nous avons décidé de réaliser les essais non plus à 25°C mais à 20°C qui est une température plus proche de celles du milieu dans lequel la plante pousse naturellement (Bretagne essentiellement).

Le protocole testé initialement (explant foliaire sur milieu A) ne donnant pas satisfaction avec des taux de callogénèse très faibles et des contaminations fréquentes, nous avons décidé d'optimiser le protocole. Pour ce faire nous avons cherché quel était le meilleur type d'explant, mais nous avons aussi observé l'influence de la composition du milieu de culture (minéraux, sucre, régulateurs de croissance).

2. Influence de la nature de l'explant sur la callogénèse

L'explant choisi peut influencer fortement la callogénèse (Dhar and Joshi, 2005; Farhadi et al., 2017; Pacheco et al., 2012; Veraplakorn, 2016). Ainsi nous avons choisi de tester différents explants : les feuilles (Figure 2.221 a) et les racines de plantes matures ; les graines (Figure 2.221 b); les cotylédons, les feuilles et les racines issus de plantules axéniques (Figure 2.221 c) ; (Figure 2.221).

L'utilisation des racines de plantes cultivées en terre comme source d'explant est une piste qui a très rapidement été écartée car les racines sont très fines donc difficiles à déterrer et à stériliser.

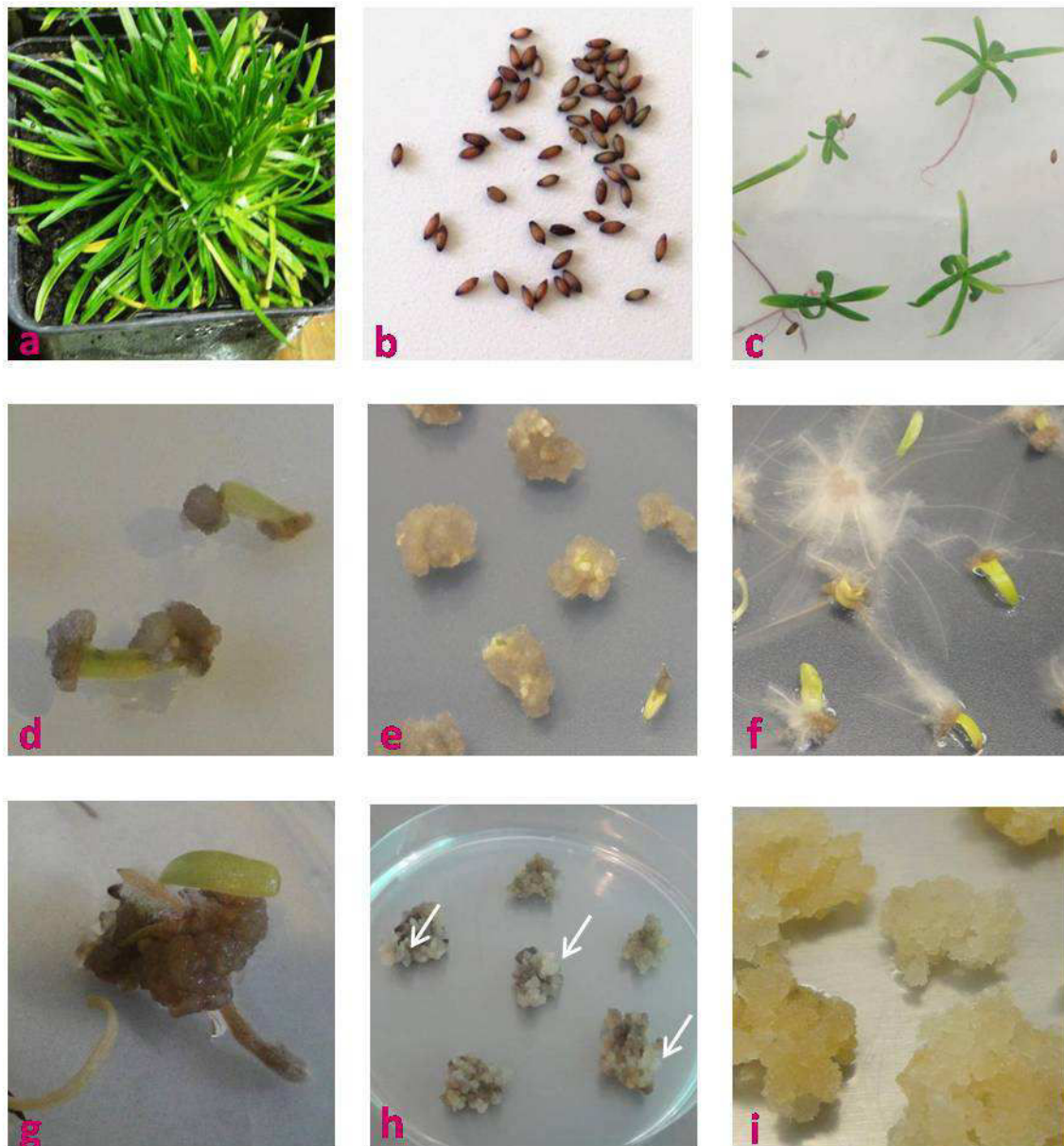


Figure 2.221. Callogénèse d'*A. maritima*.

(a) Plante cultivée en pot; (b) Graines; (c) Plantules axéniques âgées de 6 semaines; Cals obtenus à partir de feuilles sur milieu A après (d) 6 semaines et (e) 8 semaines; (f) Rhizogénèse sur les cals obtenus à partir de feuilles après 8 semaines de culture sur du milieu B; (g) Cals obtenus à partir de graines sur milieu A après 8 semaines de culture (h) Parties friables et jaunes claires développées sur les cals primaires obtenus à partir de graines; (i) Multiplication des cals friables obtenus à partir de graines.

Tableau 2.15 : Effets des différents types d'explants d'*A. maritima* sur le taux de callogénèse et l'aspect des cals.

Explant	Quantité de cals (% d'explants formant des cals) ¹	Aspect des cals ²	Figure 2.223
Feuille (Plante cultivée en terre)	43.1 ^a	Bruns, compacts	a
Graine	20.8 ^{ab}	Jaunes clairs, friables	b,c
Cotylédon*	0.8 ^b	Jaunes, friables	e
Feuille*	47.5 ^a	Beige foncé-hétérogènes	f
Racine*	43.3 ^a	Bruns, hétérogènes	d

*issu de plantule axénique

¹ Données collectées après 8 semaines de cultures sur milieu MS supplémenté avec 4.5 µM 2.4D, 0.93 µM KIN et 3% saccharose (pH 5.8). n≥40. Les valeurs qui partagent les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes selon le test de Dunn (p<0,1).² Observé pour les cals après plusieurs repiquages

Nos essais montrent que la formation de cals d'*A. maritima* est dépendante du type d'explant (Tableau 2.15), comme cela a déjà été décrit pour de nombreuses autres plantes (Farhadi et al., 2017; Pacheco et al., 2012; Veraplakorn, 2016; Yan et al., 2009). Les meilleurs taux de callogénèse sont obtenus avec les feuilles de plantes matures (Figure 221 d et e) et les feuilles et racines de plantules axéniques, respectivement 43,1%, 47,5% et 43,3% après 8 semaines de culture. Les graines présentent un taux de callogénèse de 20,8% alors que pratiquement aucun cal n'est obtenu à partir des cotylédons. Ce dernier résultat est différent de ce qui a été publié par Aly et al., (2002a, 2002b) qui ont reporté 28,6% de callogénèse à partir des cotylédons d'*A. maritima*. Les seules différences entre nos deux études sont l'âge des plantules axéniques (5 jours dans leur étude et 6 semaines dans la nôtre) et les vitamines utilisées pour le milieu de callogénèse (vitamines B5 dans leur étude, vitamines MS dans la nôtre). A noter qu'il n'était de toute façon pas possible pour nous de prélever les cotylédons sur des plantules si jeunes, car dans notre cas les graines germent au bout d'une semaine seulement.

La capacité de callogénèse d'*A. maritima* est donc faible comparée à d'autres halophytes pour lesquelles des protocoles de culture *in vitro* ont été reportés dans la littérature, avec des taux de callogénèse allant jusqu'à 84% pour des espèces de *Limonium* (Aly et al., 2002a, 2002b), et 94% pour *Kosteletzkya virginica* (Ruan et al., 2009).

Malgré leur faible capacité à former des cals, les graines constituent une source d'explant particulièrement intéressante. En effet, contrairement aux explants issus de plantules axéniques, ce protocole ne nécessite qu'une seule étape, comme dans le cas des explants foliaires, mais sans le problème de contamination (Figure 2.222). De plus, les cals obtenus après plusieurs repiquages étaient très friables, ce qui est indispensable pour la mise en

suspension ultérieure. Un cal se forme directement au niveau du collet de la plantule lorsque la graine germe (Figure 221 g). Après 8 semaines, les cals sont prélevés et transférés sur du milieu frais. Puis, après 2 à 3 semaines, des zones jaunes pâles se développent sur les cals primaires bruns (Figure 221 h). Après trois semaines, ces parties très claires sont prélevées et cultivées séparément pour obtenir des lignées de cals homogènes (Figure 221 i), qui serviront ensuite pour la culture en milieu liquide. De plus, les graines permettent un approvisionnement constant et sont faciles à stériliser contrairement aux explants issus de plante mature qui sont sujets à un fort taux de contamination. Dans la plupart des travaux de mise au point de protocoles de callogénèse publiés, les cals sont initiés à partir d'explants foliaires ou caulinaires. Il n'existe que quelques études où les auteurs choisissent les graines comme explant et dans ces cas, des taux de callogénèse important sont obtenus (>70%), et ce pour des plantes phylogénétiquement très éloignées comme des Poaceae (monocotylédones) ou des Clusiacea (dicotylédones) (Afolayan and Adebola, 2010; Akashi et al., 1993; Bernabé-Antonio et al., 2015; Straub et al., 1988; Yuan et al., 2009). Nos résultats confirment l'intérêt de ce protocole original pour la culture végétale *in vitro* d'*A. maritima*.

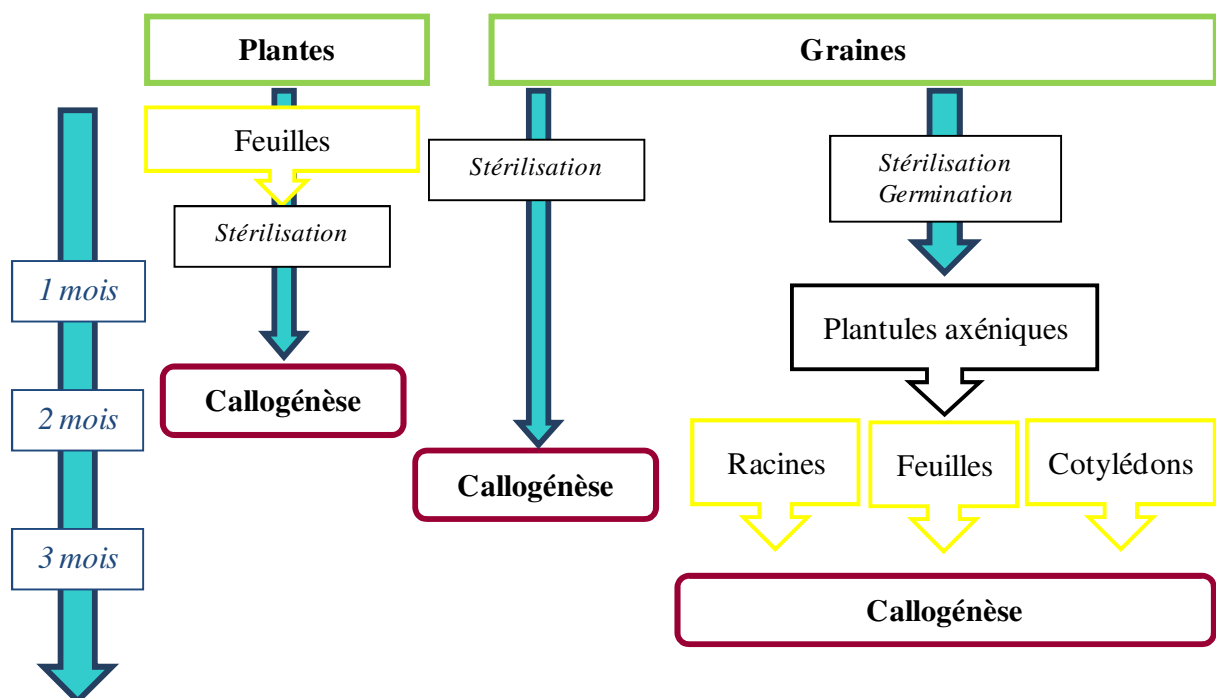


Figure 2.222 : Processus pour d'initiation de cals d'*A. maritima* à partir de différents types d'explants

Les cals d'*A. maritima* obtenus à partir d'explants foliaires et caulinaires sont plus compacts et plus foncés malgré les repiquages successifs (Tableau 2.15) (Figure 2.223), donc il n'ont pas été sélectionnés pour l'initiation de suspensions cellulaires.

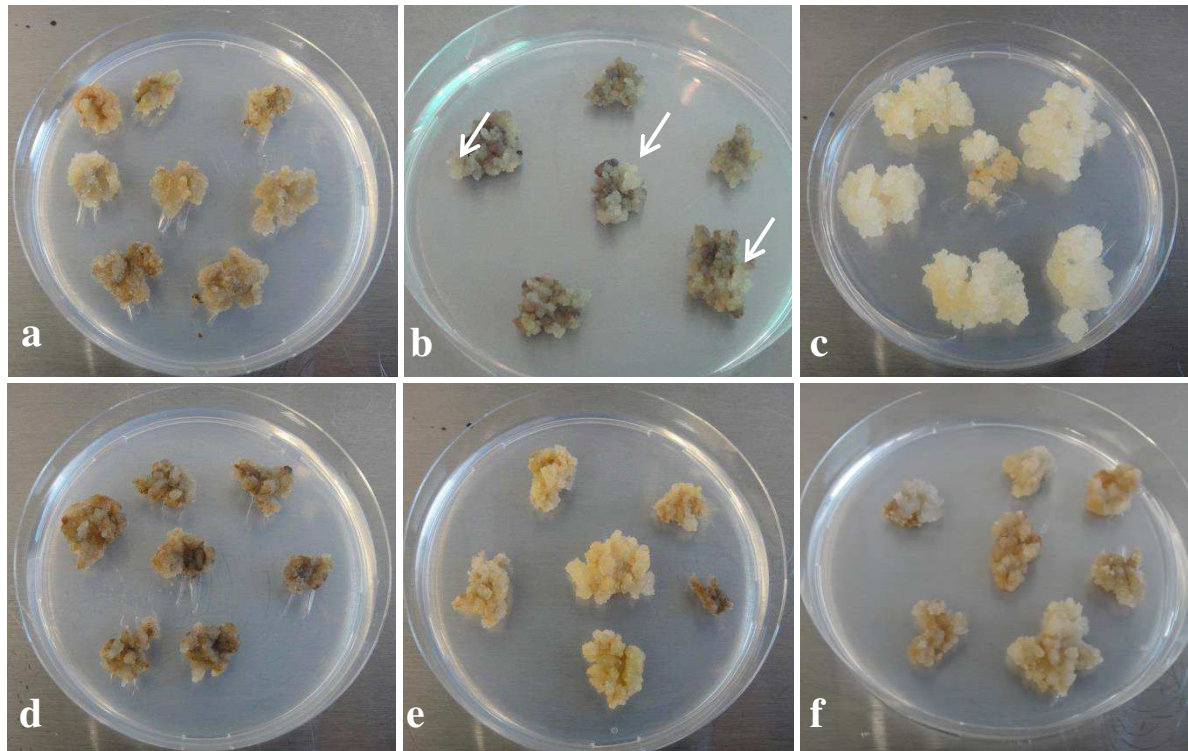


Figure 2.223. Cals d'*A. maritima* obtenus à partir de différents explants sur du milieu A, photos prises au bout de 4 semaines de culture.

(a) Cals issus de feuilles ; (b et c) Cals issus de graines de 1^{ère} génération (b), et 2^{ème} génération (c) développés à partir des zones claires et friables (b, flèches) ; (d à f) cals issus de plantules axéniques - (d) cals issus de racines; (e) cals issus de cotylédons; (f) cals issus de feuilles.

Pour la suite des essais réalisés seules les graines et les explants issus de plantules axéniques ont été utilisés.

3. Influence des hormones sur la callogénèse

Les trois types d'explants (graines, feuilles et racines tous deux issus de plantules axéniques) ont été placés sur du milieu MS avec du saccharose 3% (v/v) supplémenté avec différentes concentrations d'hormones décrites par Brewin et al., 2003. 2,7 ou 5,4 μM d'ANA et 0,4 μM de BAP (milieu B et milieu C) ont été testés comme auxine et cytokinine au lieu de 4,5 μM 2,4D et 0,93 μM KIN (milieu A). Pour la callogénèse *stricto sensu*, les milieux supplémentés avec de l'ANA (milieux B et C) sont aussi performants que le milieu A, indépendamment du

type d'explant (Tableau 2.16). Mais en présence de BAP et d'ANA, de très nombreuses racines se développent à partir des cals très compacts formés (Figure 2.221 f), ce qui est incompatible avec notre objectif d'obtenir des cals friables pour les transférer ensuite en milieu liquide. Le couple d'hormones ANA/BAP a déjà été décrit pour induire la rhizogénèse dans d'autres études (Veraplakorn, 2016), et n'est donc pas adapté à notre objectif.

Tableau 2.16 : Effet de différentes combinaisons d'hormones sur la callogénèse à partir de trois types d'explants d'*A. maritima*

Milieu	Hormones				Explant formant des cals (%)		
	2,4-D	NAA	KIN	BAP	Graines	Racines ¹	Feuilles ¹
	0	0	0	0	0,8 ^{ab}	0,8 ^{ab}	0 ^a
A	4,5	0	0,93	0	18,3 ^{abc}	43,3 ^c	47,5 ^c
B	0	2,7	0	0,4	27,5 ^{bc} + R	37,5 ^c + R	50,8 ^c + R
C	0	5,4	0	0,4	20,8 ^{abc} + R	45 ^c + R	51,7 ^c + R

¹Issus de plantules axéniques âgées de 6 semaines

+R : Développement important de racines sur les cals

n = 40 et les valeurs qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes selon le test de Dunn (p<0,05).

4. Autres mises au point réalisées pour l'optimisation de la callogénèse

En utilisant sur le milieu A, nous avons testés d'autres paramètres, de manière indépendante, pour voir s'il était possible d'augmenter le taux de callogénèse ainsi que l'aspect et le caractère friable.

Différents types de cytokinines ont été utilisés. Nous avons testé le thidiazuron, mais cette hormone conduisait à la vitrification des explants (Figure 2.224) (Garcia et al., 2011; Khan et al., 2016). La topoline a également été testée, notamment parce qu'elle est décrite dans la littérature pour augmenter la teneur en polyphénols et avoir un effet sur les polyphénol-oxydases (Aremu et al., 2013; Baskaran et al., 2015a, 2015b), mais celle-ci n'a pas donné de résultats satisfaisant, tout comme la zéatine.



Figure 2.224 : Explants foliaires sur milieu A où la KIN est remplacé par le TDZ (0,93 µM)

Nous avons testé d'autres milieux de culture contenant d'autres auxines (AIA et AIB), d'autres milieux minéraux (B5, MS 1/2, WPM) et d'autres sucres (glucose et maltose), mais ceux-ci ne se sont pas révélés plus efficaces que le milieu A, ni quantitativement ni qualitativement. De plus, les mêmes problèmes d'hétérogénéité ont été observés qu'avec le milieu A. Le milieu Gamborg B5 a toutefois permis d'obtenir des cals clairs et friables, voire mucilagineux (Figure 2.225), il constitue donc une piste d'amélioration potentielle. Mais nous avons conservé le milieu A pour obtenir une lignée de cals homogènes, clairs et friables utilisés pour obtenir une suspension.



Figure 2.225 : Explants foliaires sur milieu A où les éléments minéraux du MS sont remplacés par du B5

5. Conclusion

Malgré des résultats assez hétérogènes, et de faibles taux de callogénèse, nous avons réussi à définir des conditions de callogénèse nous permettant d'obtenir suffisamment de cals friables et clairs pour l'initiation de suspensions cellulaires. Compte tenu des résultats obtenus, les meilleures conditions de callogénèse pour *A. maritima* sont basées sur la mise en culture de graines stérilisées sur du milieu MS supplémenté avec 4,5 μM de 2,4D, 0,93 μM de KIN et 3% (p/v) de saccharose et incubées pendant 8 semaines à l'obscurité et à 20°C. Ensuite des repiquages réguliers des parties les plus claires et friables des cals doivent être effectués jusqu'à l'obtention de lignées de cals homogènes. A noter que les cals obtenus à partir des autres explants étudiés, même s'ils n'ont pas été utilisés pour l'établissement de suspensions cellulaires, pourraient être utilisés pour initier une stratégie de micropropagation, mais cela ne constitue pas l'objectif de notre étude.

B. Initiation de suspensions cellulaires

Les cals homogènes jaune clair et friables d'*A. maritima* obtenus précédemment (§ A) ont été utilisés pour initier une suspension cellulaire (Figure 2.226 et 2.227).

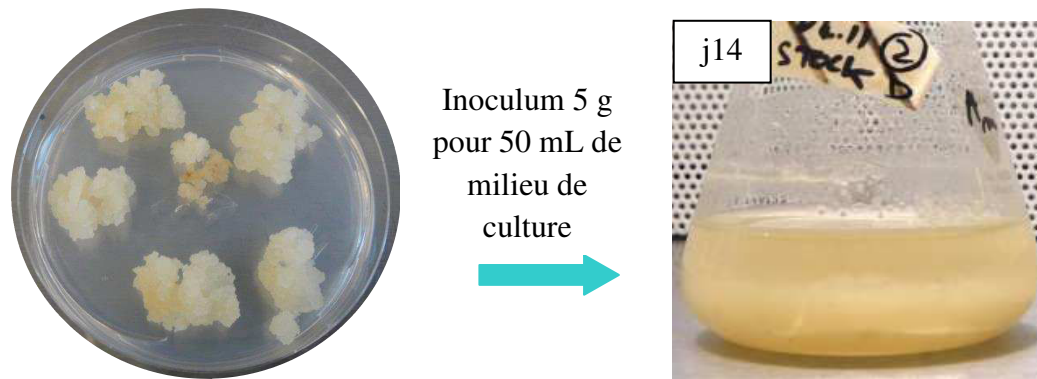


Figure 2.226 : Cals friables issus de graines d'*A. maritima* utilisés pour initier une suspension cellulaire.

Culture à 20°C et à l'obscurité sur milieu A. Agitation 130 rpm

Après plusieurs repiquages, deux courbes de croissance ont été tracées, l'une sur la base du poids frais, l'autre sur la base du poids sec. (Figure 2.227).

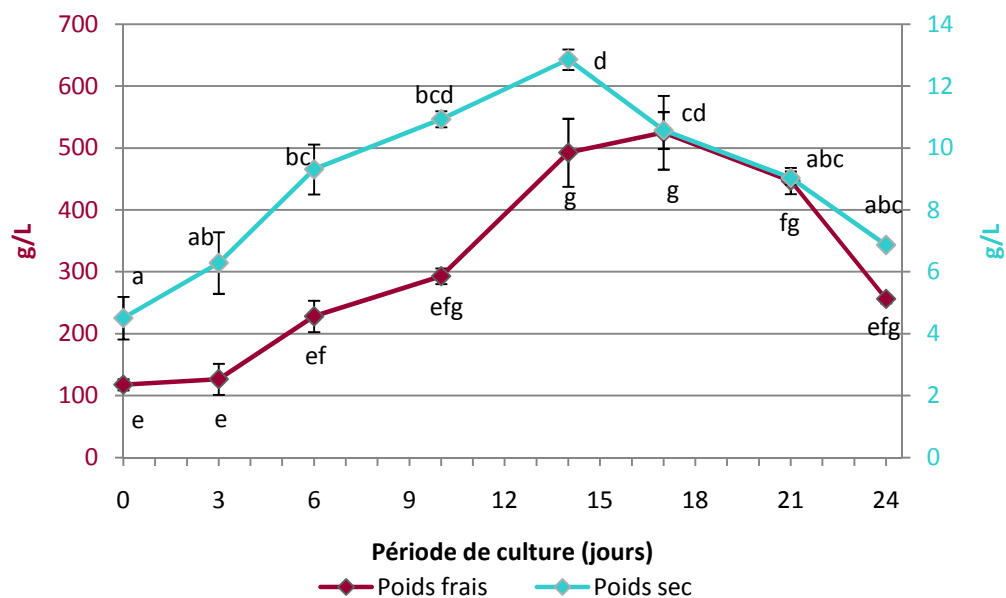


Figure 2.227 : Croissance des suspensions cellulaires d'*A. maritima* (milieu A) pendant 24 jours à l'obscurité et à 20°C.

La barre d'erreur indique l'écart-type pour 3 mesures indépendantes. Les valeurs auxquelles sont attribuées des lettres communes ne sont pas significativement différentes selon le test de Dunn ($p < 0.05$)

Les cellules entrent en phase exponentielle de croissance après 3 jours de culture et ce jusqu'au 14^{ème} jour avec un index de croissance (IC) de 3,4 et 1,9 pour le poids frais et le poids sec respectivement ($IC = (\text{poids final} - \text{poids initial}) / \text{poids initial}$). Nos valeurs sont comparées à celles d'autres suspensions cellulaires dans la littérature (Ahlawat et al., 2017; Pacheco et al., 2012) , ce qui nous permet de dire que les suspensions d'*A. maritima* présentent des paramètres de croissance classiques. De plus, la croissance est régulière et répétable car nous avons obtenu le même profil sur 2 mois de culture. Après la phase stationnaire qui dure du 14^{ème} au 17^{ème} jour, la culture présente une diminution de la densité cellulaire probablement due à la mort des cellules. Il aurait été intéressant de doser la consommation des nutriments dans le milieu pour confirmer cette hypothèse et réaliser des tests de viabilité cellulaire et/ou des observations microscopiques des cellules pour observer leur forme et leur évolution.

C. Conclusion de l'étude biotechnologique d'*A. maritima*

Nos travaux ont permis de développer un protocole efficace pour initier, à partir de graines d'*A. maritima*, des **cals clairs et friables** qui constituent le matériel adéquat pour une mise en suspension. Nous avons également développé un protocole de culture de **suspensions cellulaires** d'*A. maritima*, caractérisées par une cinétique de croissance classique et régulière. Ainsi, des études phytochimiques pourront par la suite être conduites sur ces suspensions et des tests d'élicitation réalisés. (Figure 2.228). Des tests d'activités biologiques pourront aussi être réalisés pour comparer l'activité de la plante à celle des cellules.

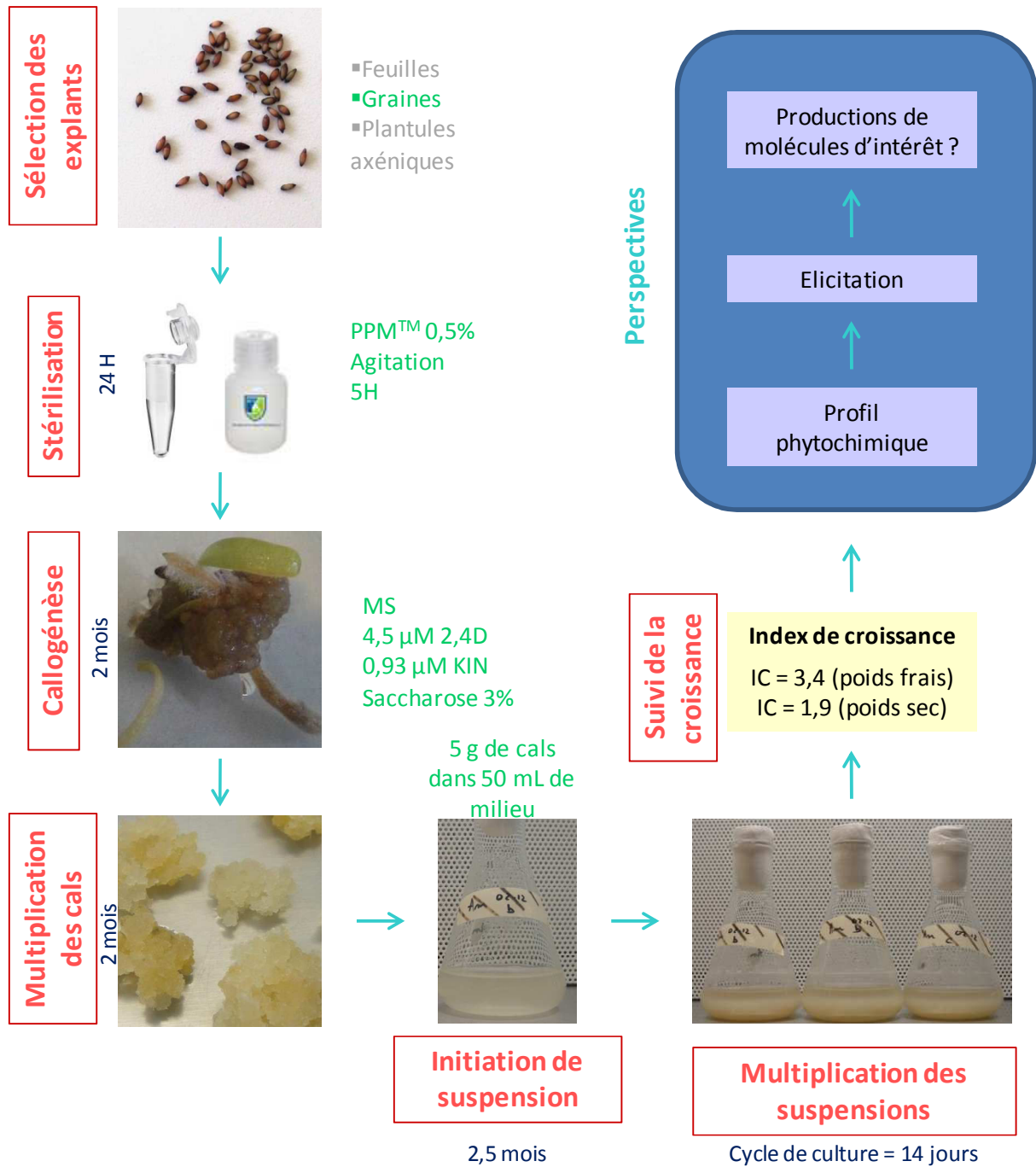


Figure 2.228 : Schéma récapitulatif de la culture *in vitro* d'*A. maritima*
(Inspiré de Subhashini et al., 2014)

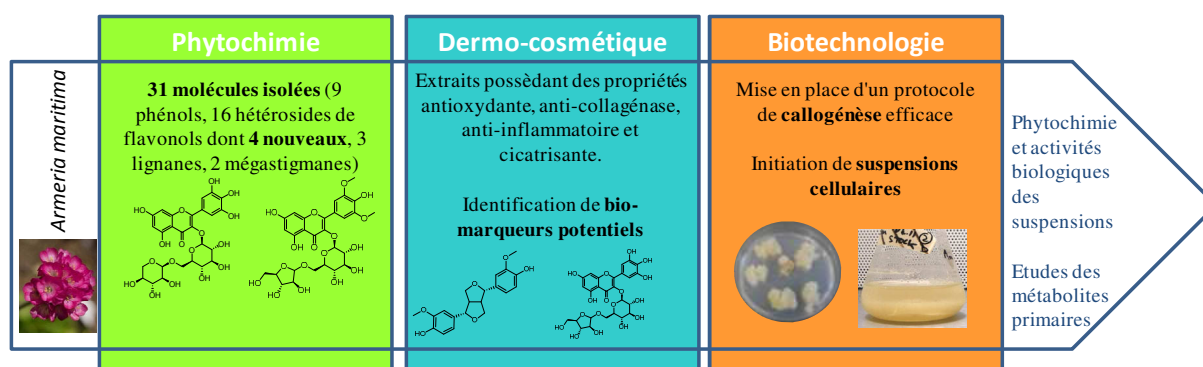
V. Bilan et perspectives de l'étude d'*A. maritima*

31 Molécules ont été isolées : 9 phénols, 7 flavonols monoglycosylés, 9 diglycosylés dont **4 nouvellement décrits**, 3 lignanes et 2 mégastigmanes. Toutes ces molécules ont été isolées ici pour la **première fois** dans le genre *Armeria*.

De forts **potentiels antioxydants** ont été démontrés et corrélés à de fortes teneurs en polyphénols pour les extraits AmE (extrait brut), AmA (fraction AcOEt), AmB (fraction BuOH) et AmD (fraction CH₂Cl₂). Les extraits AmE, AmA et AmB permettent également d'inhiber l'activité de la **collagénase**, alors qu'AmD permet d'augmenter la **migration de kératinocytes** en cas de blessure. AmA et AmD réduisent la **sécrétion de cytokines pro-inflammatoires**. Cette activité est portée par les acides caféique et gallique, les hétérosides de myricétine et le pinorésinol.

En parallèle à ce travail, une stratégie de CVIV a été initiée : un protocole de **callogénèse** a été développé, et des **suspensions** cellulaires d'*A. maritima* ont été obtenues. Par la suite, il sera intéressant de réaliser l'étude phytochimique de ces suspensions, de réaliser des essais d'élicitation et de tester leurs activités biologiques.

Cette étude nous a permis de **démontrer l'intérêt d'*A. maritima* en dermo-cosmétique** avec de possibles valorisations en tant qu'actif anti-âge, anti-inflammatoire ou cicatrisant avec des traceurs d'activités potentiels. Une production de molécule d'intérêt par voie biotechnologique pourra également être envisagée.



Chapitre 3 Etude d'*Helichrysum stoechas* (L.) Moench.



Comme pour *A. maritima* (cf. chap. 2), la sélection du matériel végétal obéit aux critères suivants: l'écosystème (recherche de plantes du littoral), l'approvisionnement, la bibliographie, la chimio-taxonomie et la réglementation cosmétique (Figure 3.1).

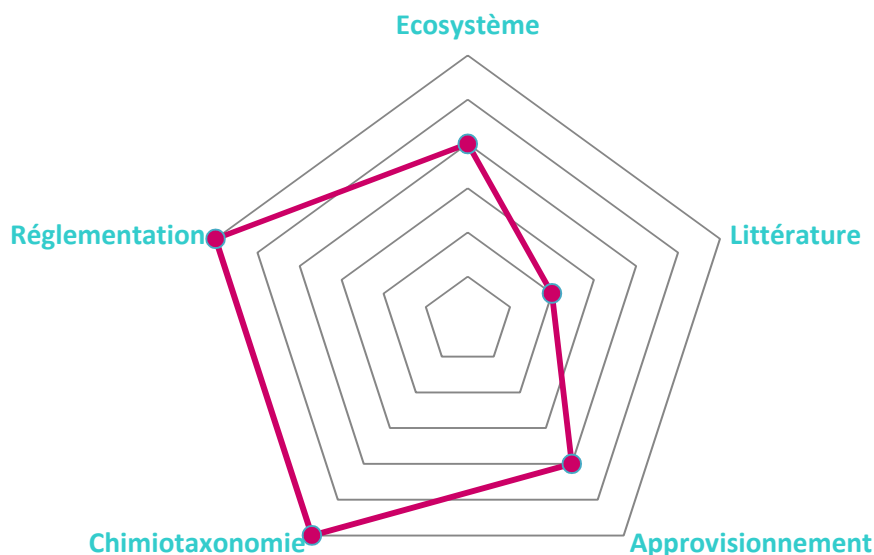


Figure 3.1 : Diagramme de sélection du matériel végétal : le cas d'*Helichrysum stoechas*
(Plus un point est excentré, plus le critère est satisfait)

H. stoechas est une halophyte facultative et psammophile. Le fait que cette plante se développe sur les littoraux indique qu'elle est capable de tolérer un stress salin, mais elle est également capable de se développer dans des sols non salins. Il existe quelques producteurs certifiés d'*H. stoechas*, facilitant son approvisionnement et une bonne traçabilité. Le genre *Helichrysum* est très étudié d'un point de vue biologique et phytochimique (Antunes Viegas et al., 2014; Lourens et al., 2008), alors que l'espèce *stoechas* l'est en moindre mesure (cf. § I.C) . Notre objectif n'est pas de réaliser une étude phytochimique classique et exhaustive de cette plante, mais des études sur l'élicitation de suspensions cellulaires d'*Helichrysum stoechas* et la mise au point de techniques d'extraction. L'existence de travaux antérieurs n'est donc pas un handicap pour notre travail, mais nous a permis au contraire d'accélérer la dérégulation phytochimique. Quant à la réglementation cosmétique, *H. stoechas* possède déjà une dénomination INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) : HELICHRYSUM STOECHAS EXTRACT, et elle est présente sur la liste IECIC (*International Inventory of Existing Cosmetic Ingredients in China*, IECIC 2014).

H. stoechas n'a donc pas été choisie sur la base des mêmes critères qu'*A. maritima*, qui n'était pas sur la liste IECIC, mais qui était une espèce très peu étudiée.

I. Etude bibliographique d'*H. stoechas*

La taxonomie de l'espèce *Helichrysum stoechas* (L.) Moench (Tela Botanica; The Angiosperm Phylogeny Group, 2016) est présentée ci-dessous :

Tableau 3.1 : Taxonomie de l'espèce *Helichrysum stoechas*.

Domaine	Eukaryota
Règne	Plantae
Clade	Angiospermes Dicotylédones vraies Dicotylédones vraies supérieures Asteideae
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Tribu	Gnaphalieae
Genre	<i>Helichrysum</i>
Espèce	<i>stoechas</i>

A. La famille des Asteraceae

Les Asteraceae constituent la famille botanique la plus importante des phanérogames. En effet elle regroupe 25 000 espèces réparties dans 1530 genres et est répandue dans le monde entier (Missouri Botanical Garden) (Figure 3.2). Néanmoins, elle est particulièrement représentée dans les régions sèches (Botineau, 2010).

Le nom Asteraceae provient du grec *astêr* : astre, nom donné à de nombreuses fleurs ayant la forme d'étoile (Figure 3.2).



Figure 3.2 : Exemples d'espèces de la famille des Asteraceae

A. *Echinacea purpurea*, B. *Leucanthemum vulgare*, C. *Centaurea cyanus*, D. *Taraxacum officinale*, E. *Silybum marianum* F. *Leontopodium alpinum*

Sources : A. www.gardensonline.com.au, B. www.wikiwand.com, C. www.commonswikimedia.org, D. www.mooc.tela-botanica.org, E. www.en.wikipedia.org, F. www.fr.aliexpress.com

Cette famille regroupe essentiellement des plantes herbacées vivaces et à feuilles alternes, néanmoins toutes les formes végétales y sont représentées. Elles sont pourvues d'un appareil sécréteur ordinairement bien développé. Les inflorescences sont des capitules, les fleurs possèdent des anthères soudées et le fruit est un akène. La famille des Asteraceae est divisée en 12 sous familles dont les Asteroideae, à laquelle appartient le genre *Helichrysum*.

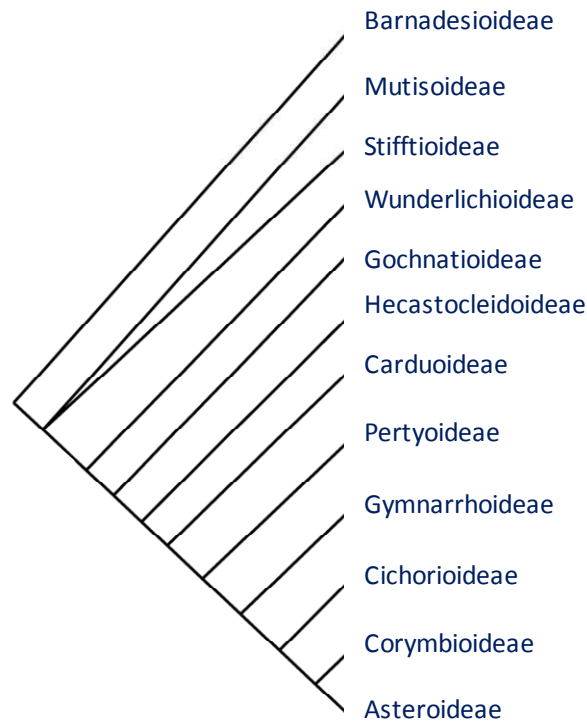


Figure 3.3 : Phylogénie des Asteraceae : Les différentes sous-familles

(www.mobot.org)

B. Le genre *Helichrysum*

Helichrysum vient du grec *helisso* et *chrysos* qui signifient respectivement "tourné autour" et "doré". Ce genre regroupe 500 espèces (Botineau, 2010). Ainsi une très grande diversité est observée dans ce genre, raison pour laquelle seuls quelques aspects seront soulignés dans cette partie dédiée au genre. La partie concernant l'espèce sera détaillée ultérieurement (§C).

1. Répartition géographique

A l'image de la famille auquel il appartient, le genre *Helichrysum* est largement distribué dans les zones suivantes : Afrique, pourtour méditerranéen, Madagascar, Asie et Amérique, avec une distribution plus importante dans les zones sèches (Galbany-Casals et al., 2014).

2. Description botanique

Le genre *Helichrysum* présente une grande diversité botanique. Ainsi on peut retrouver des arbrisseaux, des herbacées, des annuelles, des vivaces. Les feuilles sont oblongues ou lancéolées en fonction des espèces, plus ou moins pubescentes (Tela Botanica) (Figure 3.4).



Figure 3.4 : Illustration de la diversité botanique du genre *Helichrysum*

A. *H. italicum*, B. *H. sanguineum*, C. *H. petiolare*, D. *H. roseo niveum*, E. *H. umbraculigerum*, F. *H. diosmifolius*, G. *H. candolleianum*, H. *H. bracteatum*, I. *H. stoechas*

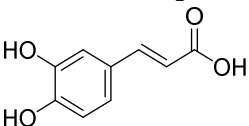
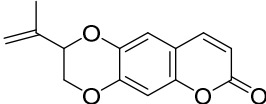
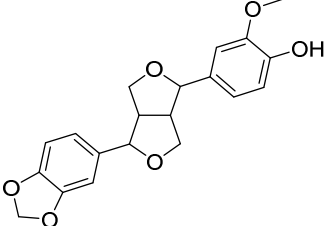
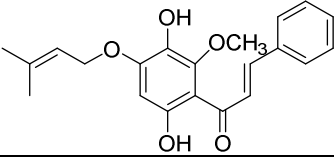
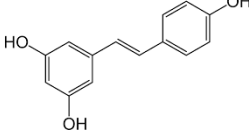
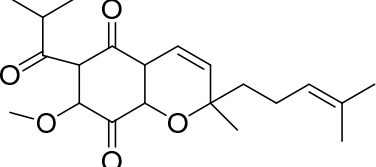
Sources : A. www.circulating-oils-library.com, B. www.wildflowers.co, C. D. www.commonswiki.org, E.. www.plantzafrica.com, F. www.friendsoflanecovenationalpark.org, G. www.kyffhauser.co, H. www.biopix.eu, I. www.florealpes.com

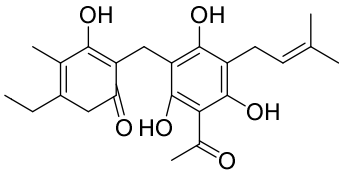
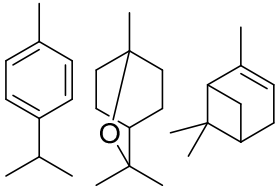
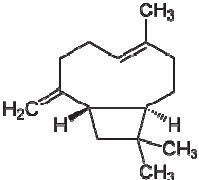
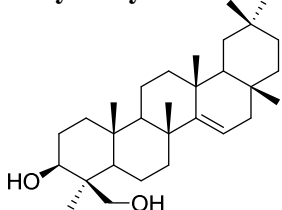
3. Etudes phytochimiques antérieures

Certaines espèces du genre *Helichrysum* sont des plantes riches en huiles essentielles, c'est le cas par exemple de l'espèce *italicum*.

Le genre *Helichrysum* étant très étudié, seules les familles de molécules déjà identifiées dans le genre sont spécifiées et accompagnées d'exemples :

Tableau 3.2 : Illustration de la diversité moléculaire dans le genre *Helichrysum* - présentation des familles et exemples.

Classes de molécule	Exemples de molécule	Source biologique
Acides phénoliques	<p>acide caféique</p> 	<i>H. obconicum</i> (Gouveia and Castilho, 2011)
Coumarines	<p>dérivé d'obliquine</p> 	<i>H. diosmifolium</i> (Jakupovic et al., 1987)
Lignanes	<p>pipéritol</p> 	<i>H. bracteatum</i> (Kisiel, 1980)
Flavonoïdes	<p>hélíchrysonne A</p> 	<i>H. froskahlîi</i> (Al-Rehaily et al., 2008)
Stilbénoides	<p>Resvératrol</p> 	<i>H. heywoodianum</i> (Albayrak et al., 2010)
Quinones	<p>hélínudichromène quinone</p> 	<i>H. platypterum</i> (Jakupovic et al., 1986)

Phloroglucinol	<p style="text-align: center;">arzanol</p> 	<p style="text-align: center;"><i>H. italicum</i> (Maksimovic et al., 2017)</p>
Monoterpènes	<p style="text-align: center;"><i>p</i>-cymène; 1-8-cinéol; α-pinène</p> 	<p style="text-align: center;"><i>H. dasyanthum</i>, <i>H. excisum</i>, <i>H. petiolare</i> (Lourens et al., 2004)</p>
Diterpènes	<p style="text-align: center;"><i>ent</i>-beyer-15-en-19-ol</p>	<p style="text-align: center;"><i>H. tenax</i> (Drewes et al., 2006)</p>
Sesquiterpènes	<p style="text-align: center;">β-caryophyllène</p> 	<p style="text-align: center;"><i>H. litoreum</i> (Ruberto et al., 2002)</p>
Triterpènes	<p style="text-align: center;">3β-24-dihydroxyterexer-14-ène</p> 	<p style="text-align: center;"><i>H. niveum</i> (Popoola et al., 2015)</p>

Le tableau 3.2 illustre la diversité moléculaire présente dans le genre *Helichrysum*, et il témoigne du grand nombre d'espèces travaillées. De plus il est intéressant de relever que des molécules ubiquitaires ont été trouvées dans le genre *Helichrysum*, mais aussi des structures plus originales comme par exemple l'arzanol, l'hélichryson A ou encore l'hélinudichromène quinone.

Certaines espèces synthétisent des huiles essentielles, comme par exemple *H. dasyanthum*, *H. excisum* et *H. petiolare* (Lourens et al., 2004). Mais la plus étudiée et la plus valorisée reste l'huile essentielle d'*H. italicum* qui contient notamment de l'acétate de néryle, du γ -curcumène (Angioni et al., 2003; Maksimovic et al., 2017), mais aussi des molécules originales comme les italidiones (Inouye et al., 2006) (Figure 3.5).

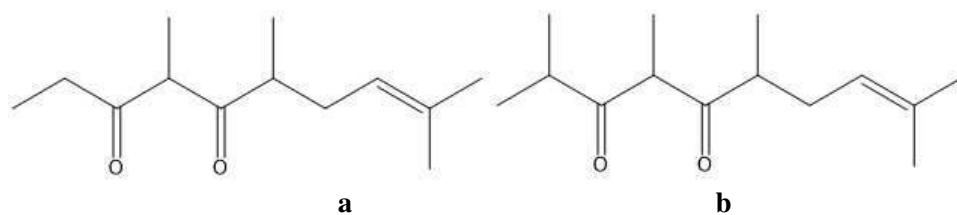


Figure 3.5 : a. Italdione I ; b. Italdione II

4. Activités biologiques

De nombreuses études biologiques ont été conduites sur différentes espèces du genre *Helichrysum*. Certaines d'entre elles concernent le secteur de la dermo-cosmétique et sont présentées dans le tableau 3.3

Tableau 3.3 : Illustration d'activités biologiques du genre *Helichrysum* pouvant être valorisées en dermo-cosmétique

Activité biologique	Test	Extrait/molécule
Anti-oxydante	DPPH 40 < CI ₅₀ < 50 µg/mL ORAC 4,553 µmol équivalent trolox / g d'extrait sec	Extraits méthanoliques <i>H. noeanum</i> , <i>H. chionophilum</i> , <i>H. plicatum</i> , <i>H. arenarium</i> (Tepe et al., 2005) Extrait méthanolique de <i>H. niveum</i> (Popoola et al., 2015)
Anti-inflammatoire	<i>In vivo</i> Diminution d'un facteur trois de la taille d'un oedème induit par phospholipase chez la souris <i>In vitro</i> Diminution d'un facteur 4 de l'activation du NF-kB chez des cellules Jurkat traitées au TNFα	Extrait méthanolique d' <i>H. italicum</i> (Sala et al., 2002) Extrait acétonique d' <i>H. italicum</i> à 50 µg/mL et arzanol à 25 µM (Appendino et al., 2007)
Anti-microbienne	Inhibition d'environ 30% de la croissance de <i>Brevibacillus brevis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> CMI = 0,5 µg/mL sur <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i> and <i>Micrococcus kristinae</i> CMI = 5 µg/mL sur <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Cladosporium cucumerinum</i> and <i>C. sphaerospermum</i>	Extrait méthanolique de <i>H. graveolens</i> à 30% Dérivé acétylé du phloroglucinol (Mathekga et al., 2000)
Cicatrisation	<i>In vivo</i> Cicatrisation 4,3 fois plus importante à j8 que chez le témoin	Extrait hydro-méthanolique de <i>H. graveolens</i> à 1% (Süntar et al., 2013)

Il existe également d'autres activités démontrées pour des extraits ou des molécules isolées d'*Helichrysum* : anti-HIV (Appendino et al., 2007), anti-cancereux (Aljančić et al., 2014; Matic et al., 2013), anti-malaria (Afoulous et al., 2011; van Vuuren et al., 2006). Une étude montre aussi la cytotoxicité d'extraits méthanoliques de différentes espèces du genre *Helichrysum* (Eroğlu et al., 2009).

De plus, le genre *Helichrysum* est fortement représenté dans les médecines traditionnelles, notamment en Afrique du sud, où des dizaines d'espèces sont utilisées pour la réalisation de cataplasmes et de remèdes pour lutter contre des maladies respiratoires (Lourens et al., 2008).

Enfin, l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* présente également une très forte activité anti-ecchymotique, cicatrisante, phlébotonique et anti-allergénique (Rhind, 2012).

5. Culture *in vitro*

Différents aspects de la culture *in vitro* ont été étudiés pour le genre *Helichrysum*. Ainsi, certaines études ont comme objectif la micropropagation des plantes, alors que d'autres visent à établir des cultures de cellules dédifférenciées (cals ou suspensions cellulaires). Certains de ces travaux sont présentés dans les tableaux ci-dessous (Tableau 3.4).

Tableau 3.4 : Exemples de travaux réalisés sur la micropropagation de différentes espèces d'*Helichrysum*

Espèce	Explant	Conditions de culture
<i>H. italicum</i> (Giovannini et al., 2003)	Plantule (partie apicale)	Caulogénèse sur MS avec 10 μ M zéatine et 0,5 μ M IAA 24°C - photopériode 16/8 Rhizogénèse : MS sans hormone
<i>H. arenarium</i> (Figas et al., 2016)	Bourgeon axillaire	Caulogénèse sur MS avec 23 μ M KIN et 2,8 μ M IAA - 25°C - 14j obscurité puis photopériode de 16h à 40 μ mol·m ⁻² s ⁻¹ Rhizogénèse sur MS avec 28 μ M IAA ou IBA
<i>H. populifolium</i> (Martin et al., 2013)	Feuille	Caulogénèse : MS avec 10,74 μ M NAA et 4,43 μ M TDZ Obscurité Rhizogénèse : MS supplémenté en IBA

Il existe donc des études sur la micropropagation d'espèces du genre *Helichrysum* avec des conditions de culture assez différentes, que ce soit pour la nature ou la concentration des

hormones mais aussi en ce qui concerne les conditions de culture puisque certains décrivent un phénomène d'organogénèse à l'obscurité et d'autres à la lumière.

Tableau 3.5 : Exemples de travaux réalisés sur la culture de cellules dédifférenciées pour différentes espèces d'*Helichrysum*

Espèce	Explant	Conditions de culture
<i>H. italicum</i> (Giovannini et al., 2003)	Graines germées (partie apicale)	Callogénèse sur MS avec 10 μ M 2,4-D et 1 μ M KIN 24°C - obscurité
<i>H. aureonitens</i> (Ziaratnia et al., 2009)	Feuilles jeunes	Callogénèse et mise en suspension : MS avec 5.37 μ M NAA et 0,85 μ M BA 25°C - obscurité
<i>H. kraussii</i> (Prinsloo and Meyer, 2006)	Bourgeons axillaires jeunes	Callogénèse et mise en suspension : MS 1/2 avec 5,3 μ M NAA et 0,2 μ M KIN 27,5°C - photopériode 16/8

Comparativement au nombre d'études sur la phytochimie et les activités biologiques du genre *Helichrysum*, il n'existe finalement que peu d'études sur la callogénèse ou la culture de suspensions cellulaires de ce taxon, ce qui souligne le caractère original de notre approche. Comme pour la micropropagation, les hormones varient qualitativement et quantitativement dans les différentes publications citées. Il en est de même pour le milieu minéral. La culture est soit réalisée à l'obscurité, soit avec une photopériode. Globalement la température de culture est aux alentours de 25°C, ce qui peut s'expliquer par la répartition du genre dans les régions plutôt chaudes.

Seule une étude d'élicitation sur suspensions cellulaires est publiée. Elle concerne l'élicitation de suspensions de *H. kraussii* avec de l'acide jasmonique (1 à 10 μ M) pour faire produire des triterpènes, l' α et la β -amyrine (Prinsloo and Meyer, 2006).

C. L'espèce *H. stoechas* (L.) Moench

1. Répartition géographique et écologie

L'espèce *H. stoechas* est subdivisée en deux sous-espèces : subsp. *stoechas* et subsp. *barrelieri*. La seconde pousse en Méditerranée orientale alors que la première pousse en Méditerranée occidentale et donc en France (Tison and Foucault, 2014). *H. stoechas* subsp. *stoechas* est assez commune sur les rochers, les lieux arides et les sables maritimes. Mais on la retrouve dans pratiquement toute la moitié sud de la France. Sur la façade Atlantique, on la retrouve uniquement sur les côtes.



Figure 3.6 : *H. stoechas* formant des pelouses dunaires

Source : <http://www.mairie-lacanau.fr>

Elle est très commune de la Vendée au Morbihan mais devient assez rare dans le Finistère. Dans ces zones, son milieu de prédilection est constitué par les dunes qui sont des substrats très drainants secs et basiques (Figure 3.6). On peut donc qualifier cette plante de **psammophile** (Claustres and Lemoine, 1977; Tela Botanica).

2. Description botanique

Helichrysum stoechas (L.) Moench subsp. *stoechas* est une plante vivace très décorative. Ses noms vernaculaires sont « immortelle des dunes » ou encore « immortelle jaune ». Le nom immortelle vient du fait qu'une fois cueillie, les parties aériennes en fleurs ne changent pas d'aspect, permettant ainsi de créer des bouquets permanents et très odorants.



Figure 3.7 : Illustrations de la description botanique d'*Helichrysum stoechas* subsp. *stoechas*

www.telabotanica.org

Helichrysum stoechas (L.) Moench subsp. *stoechas* possède des tiges nombreuses de 10 à 50 cm, ascendantes ou étalées qui forment des touffes de 10 à 40 cm de hauteur (Figure 3.7- C). Les tiges sont ligneuses à la base et blanches tomenteuses (figure 3.7-D).

Les feuilles sont linéaires et très étroites, roulées par les bords en dessous, blanches sur les deux faces, ou souvent verdâtres en dessus (figure 3.7-D).

La floraison a lieu de début juin à fin septembre. Les fleurs possèdent un involucre globuleux de 4 à 6 mm de diamètre, à bractées extérieures ovales lancéolées et bractées intérieures oblongues, très obtuses, velues sur le dos, à glandes nulles ou très rares. Les fruits sont des

akènes chargés de petites glandes brillantes. Les capitules floraux sont d'un jaune d'or et forment un corymbe serré. Les fleurs qui ne changent pas avec le temps symbolisent l'immortalité. Cette espèce est polymorphe (figure 3.7-ABD) (Claustres and Lemoine, 1977; Tela Botanica).

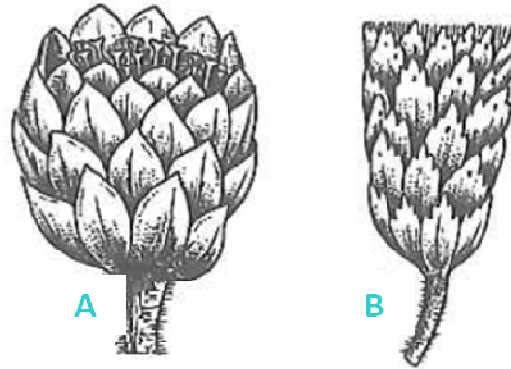


Figure 3.8 : Capitules d'*Helichrysum* (A. *H. stoechas*, B. *H. italicum*)

extrait de Flora Gallica

Pour les néophytes, des confusions peuvent être faites entre les différentes espèces du genre *Helichrysum*. Mais l'ouvrage Flora Gallica distingue *H. stoechas* des autres espèces du même genre présentes en France et notamment *H. italicum* par la taille de ses capitules, par le ratio de bractées internes et externes, et par la présence ou non de bractées internes glanduleuses (Tison and Foucault, 2014) (Figure 3.8).

3. Réglementation

H. stoechas est une espèce protégée dans le Finistère, le Centre et l'Isère, et donc il est interdit de prélever des spécimens sauvages (parties aériennes ou souterraines).

Dans les Alpes de Haute-Provence et la Drôme, la cueillette est également réglementée : seulement une dizaine de brins peuvent être cueillis légalement (Tela Botanica).

La mise en place d'une réglementation témoigne de la fragilité de la plante et de son écosystème. De plus c'est une plante utilisée en parfumerie et cosmétique (Barroso et al., 2014) et il est donc très intéressant d'utiliser des approches biotechnologiques pour s'affranchir des problèmes d'approvisionnement.

4. Etudes phytochimiques antérieures

La phytochimie de l'espèce, à l'instar de celle du genre, a été beaucoup étudiée. Dans le tableau ci-dessous sont présentées les molécules déjà identifiées dans l'espèce *H. stoechas*.

Tableau 3.6 : Molécules identifiées dans *H. stoechas*

Acides phénoliques	Acide <i>p</i> -coumarique Acide protocatéchique Acide caféique Acide férulique Acide 3- <i>O</i> -caféoylquinique (néochlorogénique) Acide 4- <i>O</i> -caféoylquinique (cryptochlorogénique) Acide 5- <i>O</i> -caféoylquinique (chlorogénique) Acide 5- <i>p</i> -coumaroylquinique Acide 5- <i>O</i> -féruloylquinique Acide 3,5- <i>O</i> -dicaféoylquinique Acide 4,5- <i>O</i> -dicaféoylquinique Acide 1-caféoyl-5-féruloylquinique	
Flavonoïdes	Myricétine-3- <i>O</i> -glucoside Myricétine-7- <i>O</i> -acétylhexoside Quercétine Quercétine-3- <i>O</i> -glucoside Quercétine-7- <i>O</i> -hexoside Quercétine- <i>O</i> -acétylhexoside Isorhamnétine- <i>O</i> -acétylhexoside Quercétine-3- <i>O</i> -[<i>p</i> -coumaroyl]-glucoside Quercétine-3- <i>O</i> - β -D-glucoside Quercétine-3- <i>O</i> -[6- <i>trans-p</i> -coumaroyl]- β -D-glucoside Quercétagine-7- <i>O</i> - β -D-glucoside Kaempférol-3- <i>O</i> -glucoside Kaempférol- <i>O</i> -acétylhexoside Kaempféride Apigénine-7- <i>O</i> -glucoside Naringénine-glucoside Epicatéchine Hespéridine	Albayrak et al., 2010 Barroso et al., 2014 Carini et al., 2001 Lavault and Richomme, 2004 Sobhy and El-Feky, 2007 Wollenweber et al., 2005

Autres polyphénols	3,5-dihydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone 3,5,4'-trihydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone	
	Resvératrol Tetrahydrochalcone-2'- <i>O</i> -glucoside Scopolétine 2,2-diméthyl-3-hydroxy-6-acétylchroman	Albayrak et al., 2010 Lavault and Richomme, 2004 de Quesada et al., 1972
Pyrone caractéristique du genre	Hélipyrone Bisnorhélipyrone Norhélipyrone Italipyrone 20-[3,3'-Diméthylallyl]-italipyrone Plicatipyrone Homoarénol Arénol Diméthylallylitalipyrone	Lavault and Richomme, 2004 Rios et al., 1991
dérivés phloroglucinols	4-hydroxyacétophénone 4-hydroxyacétophénone-glycoside (picéïne) 4-hydroxy-3-[isopent-2-yl]acétophénone	Lavault and Richomme, 2004 de Quesada et al., 1972 Rios et al., 1991 Tomás-Barberán et al., 1990
Triterpènes	Acide ursolique Acide oléanolique Uvaol Erythrodiol β -sitostérol Stigmastérol- β -D-glucopyranoside β -sitostérol- β - <i>O</i> -diglucoside Stigmastérol	de Quesada et al., 1972 Rios et al., 1991
Sesqui et mono terpènes	α -bisabolol β -caryophyllène α -humulène α -pinène Limonène	Sobhy and El-Feky, 2007
Divers	Composés organiques volatils ; acides gras Tocophérol Acide ascorbique	Barros et al., 2010 Giuliani et al., 2016 de Quesada et al., 1972

	Carotène
--	----------

Globalement, les acides phénoliques et flavonoïdes sont fortement représentés dans des extraits alcooliques ou hydro-alcooliques des parties aériennes d'*H. stoechas*. Les pyrones et les dérivés du phloroglucinol sont extraits avec des solvants plus apolaires comme le dichlorométhane ou le chloroforme par exemple. De manière générale, les composés phénoliques sont les plus étudiés. Les molécules sont identifiées par LC-MS/MS, alors que les molécules plus originales ont dû être isolées pour être identifiées par RMN. Les sesquiterpènes et monoterpènes sont présents dans l'huile essentielle d'*H. stoechas*.

5. Activités biologiques déjà décrites

Plusieurs activités biologiques ont été attribuées à *H. stoechas*, elles sont répertoriées dans le tableau ci-dessous. Il s'agit dans tous les cas de tests réalisés avec des extraits de parties aériennes. Les activités anti-oxydantes et antimicrobiennes sont les plus représentées. Néanmoins on observe une grande hétérogénéité des résultats en ce qui concerne l'activité anti-oxydante, qui peut s'expliquer par le manque de fiabilité de certains tests comme c'est le cas du DPPH, ou encore par les différents solvants utilisés pour l'extraction (alcoolique *versus* hydro-alcoolique).

Tableau 3.7 : Illustration des activités biologiques d'*H. stoechas*

Activité	Test	Extrait/molécule	Auteurs
Anti-oxydante	DPPH CI ₅₀ = 7,95 µg/mL	Extrait méthanolique	Albayrak et al., 2010
	DPPH CI ₅₀ = 0,52 mg/mL Pouvoir réducteur CI ₅₀ = 0,14 mg/mL Blanchiment β-carotène CI ₅₀ = 0,25 mg/mL TBARS (acide thiobarbiturique) CI ₅₀ = 0,13 mg/mL	Extrait méthanolique	Barros et al., 2010
	DPPH CI ₅₀ = 36,62 µg/mL Pouvoir réducteur CI ₅₀ = 75,14 µg/mL	Extrait hydro-alcoolique	Barroso et al., 2014

	Blanchiment β -carotène CI ₅₀ = 79,84 μ g/mL TBARS CI ₅₀ = 56,62 mg/mL		
	DPPH CE ₅₀ = 39,7 μ g/mL	Extrait éthanolique	Boubakeur et al., 2017
	DPPH CE ₅₀ = 63,2 μ g/mL	Extrait hydro-alcoolique	
Antimicrobienne	CMI \leq 25 mg/L <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermis</i> , <i>M. phlei</i>	Italipyrone, Helipyrone, Plicatipyrone, Homoarenol, Arenol	Rios et al., 1991
	Inhibition de la croissance > 20 mm <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Extrait méthanolique à 10%	Albayrak et al., 2010
	Inhibition de la croissance > 20 mm <i>S. epidermis</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Huile essentielle	Sobhy and El- Feky, 2007
	Inhibition de la croissance > 20 mm <i>E. coli</i> , <i>E. coleacae</i> <i>K. pneumoniae</i>	Extrait éthanolique	
	CMI = 12,5 mg/L <i>Bacillus</i> sp., <i>S. epidermis</i>	dérivé phloroglucinol	Tomás-Barberán et al., 1990
	CMI = 25 mg/L <i>E. coli</i>	dérivé acétophénone	
Anti-inflammatoire	Inhibition de l'activation du NF- κ B dans des cellules HeLa entre 80 et 100%	Extrait hydro-alcoolique (50 μ g/mL)	Bremner et al., 2009
	Inhibition entre 80 et 100% de la sécrétion d'IL-6 par des PBMC	Extrait AcOEt (100 μ g/mL)	
	Inhibition entre 80 et 100% de la sécrétion de TNF α par des PBMC	Extrait AcOEt (10 μ g/mL)	
	Inhibition entre 80 et 100% de la production de PGE2 par des PBMC	Extrait AcOEt et éther de pétrole (10 μ g/mL)	
Cytogé- nétique	Inhibition de l'index mitotique et de l'index de réplication	Extrait méthanolique (0,01 à 1 mg/mL)	Eroğlu et al., 2009
Rénale	Diminution de l'oxalate et acide urique et augmentation du citrate dans les urines	Extrait aqueux (156 mg/kg)	Orhan et al., 2015

A noter qu'il existe des actifs cosmétiques à base d'*H. stoechas* déjà commercialisés. C'est le cas d'Eternaline® (société SILAB), qui est un extrait riche en oligosaccharides, et qui

régénère la matrice extracellulaire de la peau en stimulant la synthèse de périostine. Cette protéine est impliquée dans la formation et le fonctionnement des fibres de collagène et sa production se trouve ralentie au cours du temps, donc du vieillissement (Egbert et al., 2014).

6. Protocoles de culture *in vitro*

Il n'existe que très peu de protocoles de culture *in vitro* pour *H. stoechas*. En effet, nous n'avons trouvé qu'un seul article sur cette thématique (Giovannini et al., 2003), qui présente des conditions de micropropagation et de callogénèse. Les auteurs utilisent la partie apicale de jeunes plantules comme source d'explant, sur du milieu MS avec 30g/L de saccharose supplémenté en phytohormones et la culture est réalisée à 23-25°C. Pour la micropropagation, les expériences sont réalisées à la lumière avec une photopériode de 16/8, le milieu est supplémenté avec 2,6 µM de BAP pour la caulogénèse, puis les parties aériennes sont transférées sur du milieu sans hormone pour induire la rhizogénèse. Pour la callogénèse, les explants sont déposés sur du milieu MS supplémenté avec 10µM de 2,4-D et 1 µM de kinétine, et cultivés à l'obscurité. Aucun article ne relate la mise en suspension d'*H. stoechas*. Seul un article présente une perspective de bio-production avec la mise en place de *hairy-roots* d'*H. stoechas* après transformation de la plante par *Agrobacterium rhizogenes* (Giovannini et al., 2008).

D. Conclusion de l'étude bibliographique d'*H. stoechas*

De très nombreuses études ont été réalisées sur les activités biologiques et la caractérisation moléculaire du genre *Helichrysum* et de l'espèce *stoechas*. Nous allons utiliser ces résultats antérieurs pour **accélérer le processus de caractérisation phytochimique** en adoptant une stratégie de déréplication. En revanche, très peu d'études ont été réalisées sur la culture *in vitro* de cellules dédifférenciées d'*Helichrysum* sp. ; nous avons donc décidé d'orienter nos recherches vers cette approche biotechnologique innovante, pour optimiser la production des biomarqueurs.

II. Etude phytochimique d'*H. stoechas*

Dans ce chapitre, ce sont les suspensions cellulaires d'*H. stoechas* qui constituent notre matière première d'intérêt, et non la plante. Cependant un comparatif des deux sources de matériel végétal a été réalisé d'un point de vue phytochimique et biologique, pour voir si les suspensions cellulaires, grâce à un profil métabolique spécifique et modulable (Poulev et al., 2003; Ramirez-Estrada et al., 2016), pouvaient présenter un intérêt autre qu'un approvisionnement sûr et standardisé par rapport à la plante.

A. Profil phytochimique

1. Contexte & Stratégie analytique

La phytochimie du genre *Helichrysum* est extrêmement décrite, ainsi que celle de l'espèce *stoechas*, notamment pour les composés phénoliques. Après la constitution d'une banque de données regroupant les spectres UV, MS et MS/MS des polyphénols déjà identifiés dans le genre *Helichrysum*, nous avons cherché à caractériser le contenu en polyphénols de suspensions cellulaires d'*H. stoechas* par déréplication en LC-DAD-HRMS. Les spectres UV permettent souvent l'attribution des molécules à une famille de polyphénols alors que les spectres de masse permettent d'obtenir non seulement la masse exacte des composés (comparable à celle de la littérature reportée dans notre base de données) mais aussi la formule brute des molécules. Cette dernière permet d'effectuer une recherche dans le dictionnaire des produits naturels (Dictionary of Natural Products), ce qui nous a également permis de formuler des hypothèses concernant leur structure. Néanmoins cette stratégie ne permet pas d'identifier de façon absolue les molécules, elle permet de réaliser des hypothèses de caractérisation. La confirmation peut être faite par l'injection de standard avec comparaison du temps de rétention, des spectres UV, MS et MSMS, ou alors par l'isolement des molécules puis des analyses RMN comme nous l'avons fait pour identifier les molécules d'*A. maritima* (cf. Chap.2, § II C). La démarche que nous avons adoptée (Figure 3.9) est en phase avec notre volonté d'effectuer une analyse rapide des métabolites secondaires majoritaires d'*H. stoechas*, et de définir un marqueur pour le reste de notre étude.

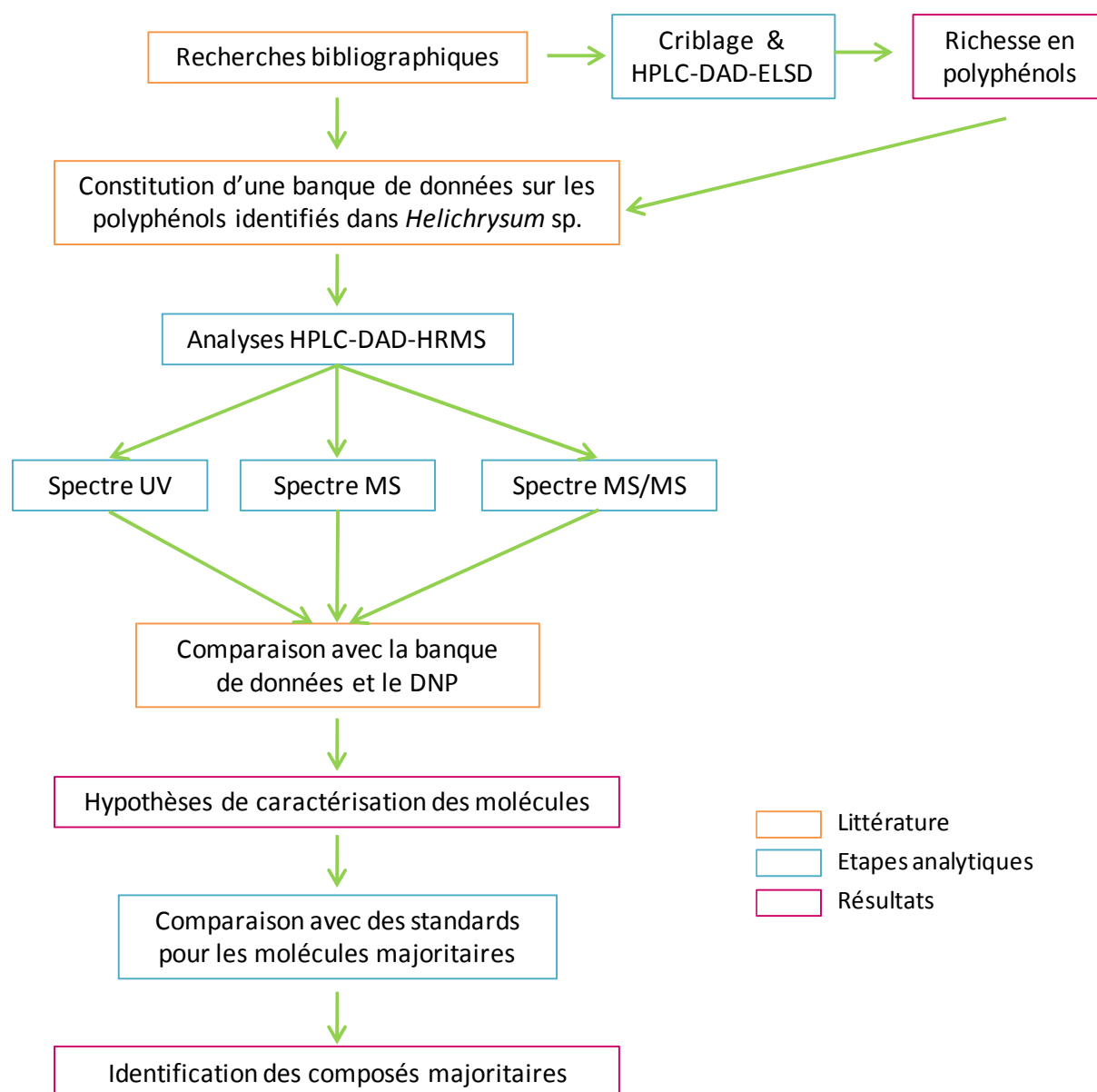


Figure 3.9 : Stratégie utilisée pour la déréplication

A noter qu'il existe aussi des outils métabolomiques pour la déréplication (Wolfender et al., 2010; Yuliana et al., 2013) comme la LC-NMR (Hubert et al., 2014; Pauli et al., 2014; Verpoorte et al., 2007) ou encore le "molecular networking" (Allard et al., 2016), qui auraient pu être utilisés dans cette étude.

2. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes

La teneur en polyphénols totaux (test de Folin) et en flavonoïdes (Dosage au AlCl_3) a été mesurée dans des extraits hydro-alcooliques de cellules et de parties aériennes d'*H. stoechas*.

On trouve dans les deux cas des teneurs en polyphénols proches avec 109,64 mg GAE / g d'extrait sec pour les parties aériennes et 118,17 mg GAE / g d'extrait sec pour les cellules. Pour un extrait méthanolique de la sous-espèce *barelliri*, la teneur en polyphénols est de 94,16 mg GAE / g d'extrait sec (Albayrak et al., 2010). Nos valeurs sont donc comparables à celles de la littérature.

En revanche, l'extrait de plante est beaucoup plus riche en flavonoïdes (38,97 mg/g) que celui de cellules (6,39 mg/g).

Ainsi, les cellules semblent synthétiser autant de polyphénols que les parties aériennes d'*H. stoechas*, mais cette synthèse est orientée vers des composés phénoliques qui ne sont pas des flavonoïdes.

Notons toutefois que ces tests sont assez peu spécifiques, et que des confirmations par des analyses plus poussées sont nécessaires.

3. Caractérisation par déréplication des composés majoritaires des suspensions cellulaires

La phytochimie des suspensions cellulaires d'*H. stoechas* a été réalisée sur un extrait hydro-alcoolique. Celui-ci présente l'avantage de balayer une large gamme de polarité et donc d'extraire un maximum de métabolites secondaires.

Dans un premier temps, un criblage préliminaire par CCM nous a permis de démontrer que l'extrait était riche en polyphénols (Figure 3.15), ce qui a été confirmé par son analyse en HPLC-DAD. Une analyse par HPLC-ELSD nous a permis de voir que la majeure partie de l'extrait n'est pas retenue sur la C18, ce qui signifie qu'il s'agit de composés très polaires comme des sucres ou acides aminés. Le pic majoritaire en HPLC-ELSD l'est aussi en HPLC-DAD, ce qui signifie qu'il s'agit bien d'un composé majoritaire et pas d'un composé qui absorberait davantage que les autres aux longueurs d'onde d'étude (Figure 3.10).

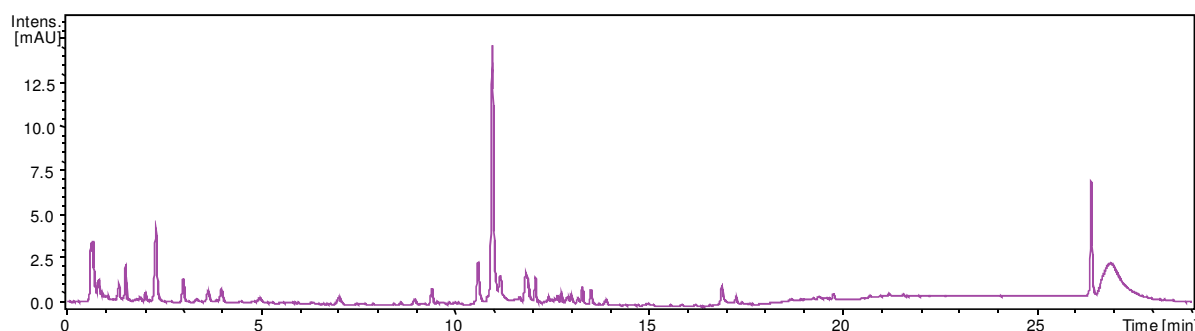


Figure 3.10 : Chromatogramme UV (280 nm) d'un extrait EtOH/H₂O de cellules différenciées d'*H. stoechas* (gradient 8, chapitre 4)

Pour les analyses en LC-HRMS, les deux modes d'ionisation (positif et négatif) ont été testés (Figure 3.11). En mode négatif, les composés contenus dans notre extrait s'ionisent mieux, ce qui est bien décrit pour les polyphénols (Bajoub et al., 2016; Brighenti et al., 2017), alors qu'en mode positif les pics sont moins intenses et nous n'en observons pas de supplémentaires. Nous avons donc choisi l'ESI.

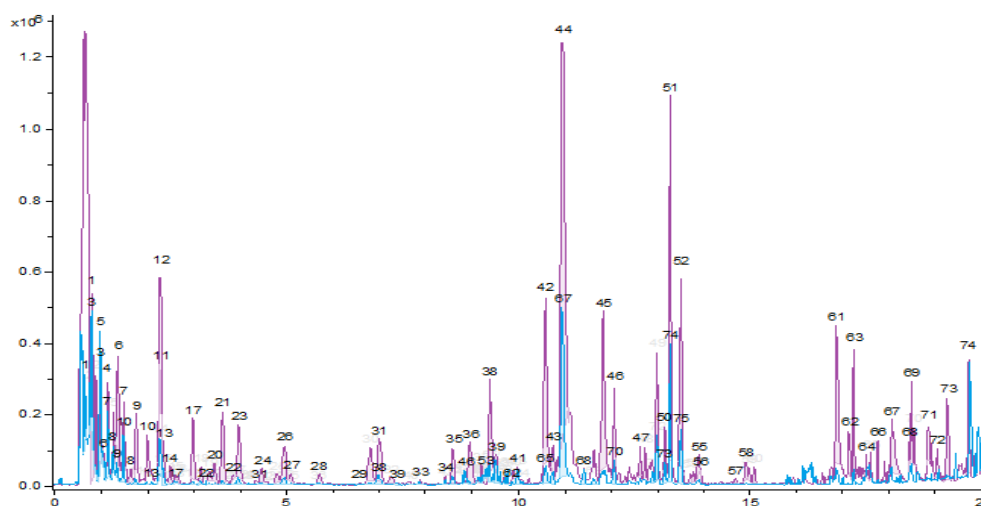


Figure 3.11 : Superposition des BPC d'un extrait EtOH/H₂O de cellules différenciées d'*H. stoechas* obtenus en LC-MS, ESI mode positif (bleu) et ESI mode négatif (violet) (gradient 8, chapitre 4)

Deux types de chromatogrammes sont obtenus : le TIC (Total Ion Courant) et le BPC (Base Peak Chromatogram). Le premier représente pour chaque instant de l'analyse, la somme des intensités des masses détectées, alors que le second correspond au courant d'ion le plus intense à chaque instant de l'analyse. Le BPC permet notamment de réduire le bruit de fond, c'est donc lui qui a été utilisé pour le retraitement des analyses (Figure 3.12).

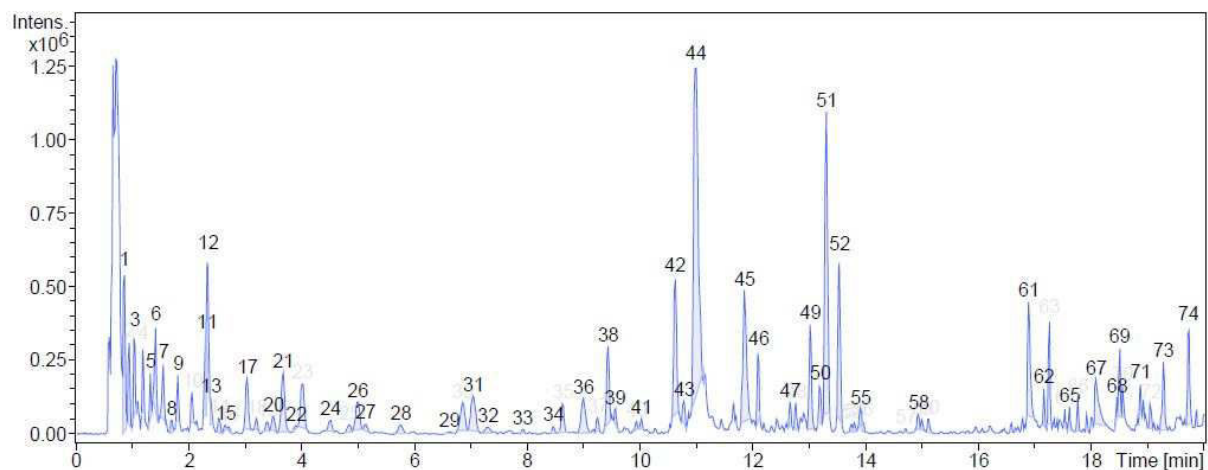


Figure 3.12 : BPC d'un extrait EtOH/H₂O de cellules différenciées d'*H. stoechas* en LC-ESI-QTOF (gradient 8, chapitre 4)

Nous nous sommes intéressés à une cinquantaine de pics. Nos efforts ont porté sur les composés majoritaires et plus particulièrement sur ceux également visibles en UV pour un futur criblage systématique en HPLC-DAD de nos extraits. Plusieurs études sur le genre *Helichrysum* ont été utilisées pour constituer notre banque de données (Albayrak et al., 2010; Barroso et al., 2014; Gouveia and Castilho, 2009, 2011, 2012ab; Lavault and Richomme, 2004; de Quesada et al., 1972; Rios et al., 1991).

Tableau 3.8 : Déréplication d'un extrait hydro-alcoolique de cellules d'*H. stoechas*

N° pic	Tr (min)	Masse exacte [M-H] ⁻	Formule brute	Δ masse (ppm)	Ions fragments obtenus par MS/MS	Hypothèse de caractérisation
2	0,96	425,1295	C ₁₆ H ₂₆ O ₁₃	1,3	207,0868 (fragment de l'héliopyrone); 321,1190 (C ₁₃ H ₂₁ O ₉)	
3	1,05	587,1822	C ₂₂ H ₃₆ O ₁₈	1,1	207,0878 (fragment de l'héliopyrone); 249,0982 (C ₁₀ H ₁₇ O ₇)	
4	1,2	673,2192	C ₂₆ H ₄₂ O ₂₀	0,7	251,1146 293,1238	
5	1,33	293,1239	C ₁₂ H ₂₂ O ₈	0,8	161,0453 251,1145	Sucre
6	1,43	351,1293	C ₁₄ H ₂₄ O ₁₀	1,2	207,08723 (C ₈ H ₁₅ O ₆)	Dactylorine C
7	1,56	203,0824			116,0501	
8	1,71	395,1557	C ₁₆ H ₂₈ O ₁₁	0,5	251,1139 (C ₁₀ H ₁₉ O ₇) 161,0456 (groupement coumaroyl)	Dérivé d'acide caféique
9	1,82	445,1351	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₂	0,2	269,1022 (C ₁₃ H ₁₇ O ₆) 174,9561	Apigénine- <i>O</i> -glucuronide
10	2,07	341,0873	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	1,4	179,0348 (acide caféique); 135,0451	Acide caféique hexoside
11	2,32	353,0876	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	0,7	191,0562 (acide quinique) 135,0452 (fragment de l'acide caféique)	Acide caféoylquinique
12	2,35	399,0928	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₁	1,3	191,0349 (acide quinique)	Acide dihydroxybenzoïque- <i>O</i> - (di- <i>O</i> -acétyl-β-D-hexoside)
13	2,4	461,1668	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	-0,7	179,0713 (acide caféique)	Dérivé d'acide caféique
14	2,55	425,1662	C ₁₇ H ₃₀ O ₁₂	0,7	249,13090 (C ₁₈ H ₁₇ O)	
15	2,66	463,1826	C ₂₀ H ₃₂ O ₁₂	-1	181,0861 (C ₁₀ H ₁₃ O ₃)	
16	2,72	463,1826	C ₂₀ H ₃₂ O ₁₂	-1,1	181,0868 (C ₁₀ H ₁₃ O ₃)	

17	3,04	341,0873	C15H18O9	1,6	179,0352 (acide caféique) 135,0449 (fragment de l'acide caféique)	Acide caféoylquinique
18	3,21	447,1508	C19H28O12	0,1	401,1450 (C18H25O10) 269,1021 (C13H17O6) 161,0459 (groupement coumaroyl)	non identifié
19	3,4	353,0874	C16H18O9	1,2	191,0560 (acide quinique) 179,0365 (acide caféique)	Acide caféoylquinique
20	3,51	487,1451	C21H28O13	1,3		Acide caféique-hexoside- <i>O</i> -désoxy-hexoside
21	3,68	335,0770	C16H16O8	0,8	179,0352 (acide caféique) 161,0243 (groupement coumaroyl) 135,0450 (fragment de l'acide caféique)	Acide caféoylshikimique
22	3,91	677,1940	C28H38O19	-0,7		dicafeoylquinic acid hexoside
23	4,03	335,0771	C16H16O8	0,3	179,0349 (acide caféique) 135,0453 (fragment de l'acide caféique)	Acide caféoylshikimique
25	4,85	335,0769	C16H16O8	1,1	179,0345 (acide caféique) 161,0239 (groupement coumaroyl) 135,0446 (fragment de l'acide caféique)	Acide caféoylshikimique
26	5	457,1713	C21H30O11	0,5	179,0710 (acide caféique)	Acide caféique méthoxylé et glycosylé
27	5,14	487,1456	C21H28O13	0,2		Acide caféique-hexoside- <i>O</i> -désoxy-hexosidee
28	5,77	459,1867	C21H32O11	1	223,0966 (C12H15O4) 181,0858 (C10H13O3)	Acide caféique-hexoside- <i>O</i> -pentoside
29	6,63	507,2082	C22H36O13	0,1		
30	6,86	439,1821	C18H32O12	0		Acide hexanoïque dihexoside
31	7,05	191,0349	C10H8O4	0,5	176,0114	Dérivé de dihydroxybenzopyranone
32	7,31	223,0611	C11H12O5	0,6		
33	7,93	497,2025	C24H34O11	0,6		
34	8,47	497,2028	C24H34O11	0,1	191,0350 (acide quinique)	
35	8,64	497,1298	C22H26O13	0,6	191,0348 (acide quinique)	
37	9,25	581,1513	C26H30O15	-0,1	243,0665 (C14H11O4)	Tétrahydroxyflavanone ou tétrahydroxyanthone diglycosylée

38	9,44	565,1925	C27H34O13	0,3	339,1236 (C20H19O5) 327,1235 (C19H19O5)	Tétrahydroxyflavanone ou tétrahydroxyxanthone diglycosylée
39	9,57	581,1512	C26H30O15	0	243,0662 (C14H11O4) 329,1389 (C19H21O5) 314,1165 (C18H18O5) 165,0548 (C9H9O3) 149,0248 (C8H5O3)	
40	9,94	641,2450	C30H42O15	0,2	339,1223 (C20H19O5) 179,0565 (acide caféique)	Sebphénosine
41	10,03	377,1600	C20H26O7	1,5	329,1398 (C19H21O5) 195,0661 (C10H11O4) 165,0556 (C9H9O3) 150,0323 (C8H6O3)	
42	10,63	515,1191	C25H24O12	0,8	353,0883 (CQA) 335,0786 (C16H15O8) 173,0459 (C7H9O5)	Acide 3,4-dicaféoylquinique
43	10,78	481,1924	C20H34O13	0,5		Marounoside
44	10,99	537,1007	C25H22NaO12	1,3	375,0695 (CQA + Na+) 191,0559 (acide quinique) 179,0352 (acide caféique) 135,0451 (fragment de l'acide caféique)	Acide 3,5-dicaféoylquinique
45	11,86	515,1191	C25H24O12	0,7	353,0877 (CQA) 173,0454 (C7H9O5)	Acide 4,5-dicaféoylquinique
46	12,1	1099,3306	C52H60O26	-0,5	243,0663 (C14H11O4)	Flavonoïde glycosylé cinnamoylé
47	12,67	1099,3304	C52H60O26	-0,4	243,0654 (C14H11O4)	Flavonoïde glycosylé cinnamoylé
48	12,77	1099,3307	C52H60O26	-0,6	243,0665 (C14H11O4)	Flavonoïde glycosylé cinnamoylé
49	13,02	549,1616	C14H12O4	0,4	143,0502 (C10H7O)	
50	13,2	555,2237			243,0661 (C14H11O4)	
51	13,31	549,1616	C26H30O13	0,6	243,0663 (C14H11O4) 125,0243 (C6H5O3)	Dihydroxyflavanon- <i>O</i> -pentose-hexose
52	13,54	549,1611	C26H30O13	0,5	243,0663 (C14H11O4) 125,0246 (C6H5O3)	Dihydroxyflavanon- <i>O</i> -pentose-hexose
53	13,75	579,1720	C27H32O14	-0,1	335,2222 (C20H31O4) 273,0768 (C15H13O5) 125,0244 (C6H5O3)	Trihydroxyflavanone- <i>O</i> -deoxyhexoside-hexoside
54	13,81	679,2824	C30H48O17	-0,8		Mégastigmane triglycosylé

55	13,91	497,1086	C25H22O11	0,6	335,0785 (C16H15O8) 317,0661 (C16H13O7) 273,0766 (C15H13O5) 179,0353 (acide caféique) 161,0244 (groupe ment coumaroyl) 135,0455 (fragment de l'acide caféique)	Acide dicaffeoylshikimique
----	-------	----------	-----------	-----	---	----------------------------



Non identifié

Correspond avec le DNP ou la littérature d'*Helichrysum* sp.

Correspond avec le DNP et la littérature d'*Helichrysum* sp.

Correspond avec le DNP, la littérature d'*Helichrysum* sp. et les standards

L'extrait de cellules est riche en composés phénoliques, et plus particulièrement en acides phénoliques (Tableau 3.8). On retrouve des acides caféique, shikimique et quinique sous forme de di- ou trimères, glycosylés ou non (Figure 3.13). Il s'agit dans tous les cas de molécules ubiquitaires (Chen et al., 2016; Jiang et al., 2016; Motaal et al., 2016; Peres et al., 2013; Zhang et al., 2016)

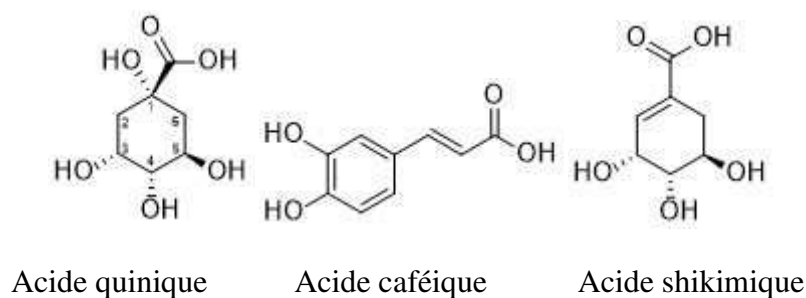


Figure 3.13 : Structure des acides phénoliques de base

D'autres polyphénols comme des flavonoïdes glycosylés semblent être présents dans les cellules, néanmoins il s'agit là d'hypothèses demandant à être confirmées par l'isolement de ces molécules ou l'injection de standards. De plus, pour les composés 46 à 52, les hypothèses de flavonoïdes sont assez peu probables puisque l'on obtient en MSMS des fragments en C14, alors que les flavonoïdes sont en C15, par contre, il pourrait s'agir de molécules ayant la capacité de se dimériser puisqu'on observe un ion pseudo-moléculaire à 549 mono chargé et un ion pseudo moléculaire mono chargé également à 1099, et dans ces deux cas la fragmentation conduit à l'obtention d'un fragment de 243 m/z. Ceci confirme bien qu'il ne s'agit que d'hypothèses de structure.

La confirmation par injection de standard a été faite pour les isomères d'acide dicaféoylquinique (diCQA), permettant ainsi d'identifier le pic majoritaire en LC-DAD et en LC-HRMS comme étant le 3,5-diCQA (confirmation RMN par ailleurs (Figure 3.14). Deux autres isomères ont été identifiés : le 3,4-diCQA et le 4,5-diCQA.



Figure 3.14 : Acide 3,5-dicaféoylquinique

Les 3,5- et 4,5-diCQA avaient déjà été identifiés dans *H. stoechas* (Barroso et al., 2014), alors qu'il s'agit ici du premier rapport de la présence du 3,4-diCQA dans cette espèce, déjà décrite dans le genre par ailleurs (Gouveia and Castilho, 2011). Les acides dicaféoylquiniques sont des molécules ubiquitaires, on en retrouve donc dans d'autres Asteraceae (Boukhris et al., 2016; de Lazzari Almeida et al., 2016; Motaal et al., 2016) et d'autres halophytes (Chen et al., 2015; Nabet et al., 2016). Les acides dicaféoylquiniques sont connus pour leurs nombreuses propriétés biologiques, parmi lesquelles on trouve des activités anti-oxydante (Hong et al., 2015; Jiang et al., 2016), anti-inflammatoire (Chen et al., 2016; Motaal et al., 2016), blanchissante (en agissant sur la synthèse de la mélanine et l'activité tyrosinase) (Tabassum et al., 2016) et anti-HIV (Heyman et al., 2015; Makola et al., 2016; Serina et al., 2016).

La production de dérivés d'acide caféique par des cellules végétales dédifférenciées a déjà été rapportée, notamment dans l'artichaut (Pandino et al., 2017), la laitue (Stojakowska and Malarz, 2017) ou dans les échinacées (Murthy et al., 2014).

4. Comparaison des profils phytochimiques des suspensions cellulaires et de la plante

Nous avons expliqué dans le chapitre 1 qu'il existe souvent des variations de profil métabolique entre la plante (cellules différenciées) et les cellules dédifférenciées.

Un criblage CCM préalable a été réalisé (Figure 3.15), nous confirmant qu'il existe une différence entre les cellules d'*H. Stoechas* et la plante (partie aériennes). Dans ce cadre, nous avons souhaité faire une analyse exploratoire du contenu métabolique de la plante.

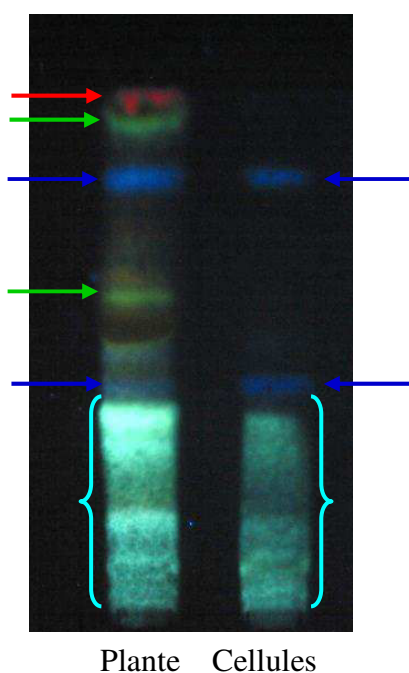


Figure 3.15 : Profil CCM d'extraits hydro-alcooliques de plante et de cellules d' *H. stoechas*

Phase mobile : AcOEt, acide formique, acide acétique, eau ; 100-11-11-26 (v/v/v/v)

Migration sur 7 cm - Révélation au Neu-PEG (365nm)

(flèches bleues : acides phénoliques ; vertes : flavonoïdes, ; rouge : chlorophylles)

L'extrait de plante est plus riche que l'extrait de cellules. On observe des métabolites supplémentaires qui apparaissent en vert sur la CCM, il peut s'agir de flavonoïdes. On notera aussi que les cellules ne produisent pas de chlorophylle, qui apparaissent en rouge sur le profil de l'extrait de plante. Il y a aussi des points communs entre les deux extraits, notamment les taches bleues claires avec un rapport frontal faible (qui forment des "traînées" en bas de plaques) et les deux spots bleus foncés qui peuvent correspondre à des dérivés d'acides phénoliques.

Ensuite, les extraits de plante et de cellules ont été comparés en LC-DAD-HRMS. Le chromatogramme de l'extrait de plante est présenté sur la figure 3.16.

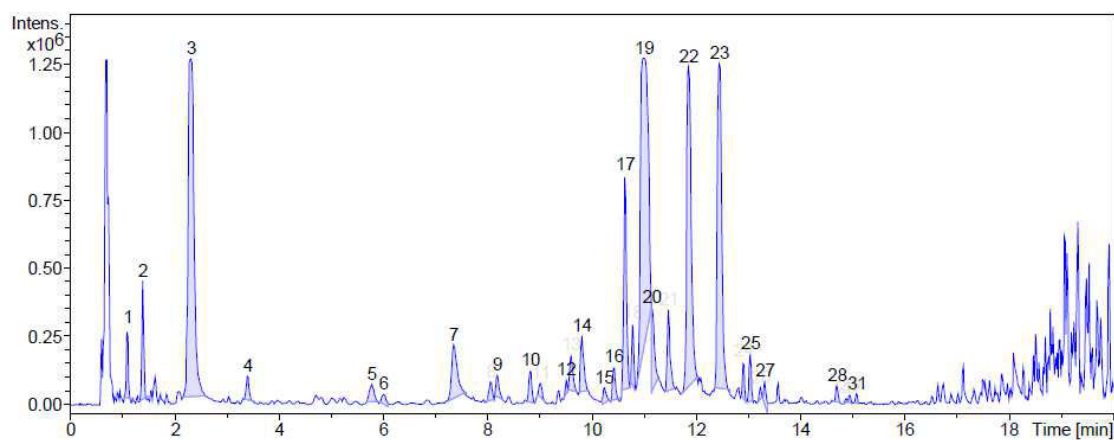


Figure 3.16 : Chromatogramme (BPC) d'un extrait EtOH/H₂O de parties aériennes d'*H. stoechas* (gradient 8, chapitre 4)

Tableau 3.9 : Déréplication d'un extrait hydro-alcoolique de parties aériennes d'*H. stoechas*

N° pic	Tr (min)	Masse exacte [M-H] ⁻	Formule brute	Δ masse (ppm)	Ions fragments obtenus par MS/MS	Hypothèse de caractérisation
1	1,1	315,0718	C13H16O9	1,2	191,0562 (Acide quinique)	Acide hydroxybenzoïque glycosylé
2	1,4	353,0875	C16H18O9	0,8	191,0561 (Acide quinique); 179,0350 (Acide caféique); 135,0448 (fragment de l'acide caféique)	Acide caféoylquinique
3	2,32	353,0875	C16H18O9	0,8	191,0561 (Acide quinique)	Acide caféoylquinique
4	3,41	439,0879	C19H20O12	0,6	353 (CQA); 191 (Acide quinique)	Acide caféoylquinique malonyl
5	5,79	367,1032	C17H20O9	0,8	191,0561 (Acide quinique)	Acide féruloylquinique
6	6,02	415,1607	C19H28O10	0,6		
7	7,36	479,0831	C21H20O13	0,1	317,0301 (C15H9O8)	Hexahydroxyflavone hexoside
9	8,19	463,0881	C21H20O12	0,1	301,0353 (C15H9O7)	Pentahydroxyflavone hexoside
10	8,83	401,1815	C19H30O9	0,4	221,1179 (C13H17O3); 177,1285 (C12H17O)	
11	9,01					
12	9,51	567,2090	C27H36O13	-1,2	522,0942 (C30H18O9); 359,1490 (C20H23O6); 341,1410 (C20H21O5); 329,1386 (C19H21O5)	Diméthoxyflavone dérivé
13	9,6	463,0878	C21H20O12	0,8	301,0352 (C15H9O7)	Pentahydroxyflavone hexoside
14	9,81	521,0937	C23H20O14	-0,1	317,0312 (myricétine); 301,0370 (C15H9O7); 180,9740 (C5H2NaO6)	Myricétine acetyl-hexoside

15	10,24	493,0988	C22H20O13	-0,1	331,0462 (C16H11O8)	Mearnetin (tetrahydroxy, methoxyflavone) hexoside
16	10,42	477,1037	C22H22O12	0,2	315,0503 (isorhamnétine)	Isorhamnétine hexoside
17	10,64	515,1192	C25H24O12	0,7	353,0875 (CQA); 191,0562 (Acide quinique)	Acide dicaféoylquinique
18	10,79	451,1243	C21H24O11	0,7	243,0666 (C14H11O4)	Pentahydroxyflavane hexoside
19	11	515,1194	C25H24O12	0,1	353,0875 (CQA); 191,0562 (Acide quinique); 179,0349 (Acide caféique)	Acide dicaféoylquinique
20	11,16	515,1192	C25H24O12	0,6	375,0697 (CQA + Na); 357,0586 (C16H14NaO8); 179,0346 (Acide caféique)	Acide dicaféoylquinique
21	11,48	601,1199	C28H26O15	0,1	395,0979 (C18H19O10); 233,0665 (C9H13O7)	Malonyl-dicaféoylquinique acide
22	11,86	537,1009	C25H22NaO12	0,9	353,0877 (CQA); 173,0456 (C7H9O5)	Acide dicaféoylquinique
23	12,45	623,1014	C28H24NaO15	0,7	579,1121 (C27H24NaO13); 537,1008 (C25H22NaO12); 417,0795 (C18H18NaO10); 375,0693 (CQA + Na); 395,0982 (C18H19O10); 233,0667 (C9H13O7); 191,0563 (Acide quinique); 179,0348 (Acide caféique); 161,0240 (C9H5O3)	Acide malonyl-dicaféoylquinique
24	12,91	853,5774	C58H78O5	0,3		
25	13,04				143,0503 (C10H7O)	
26	13,24	515,1192	C25H24O12	0,5	353,0873 (CQA); 173,0452 (C7H9O5)	Acide dicaféoylquinique
27	13,32	549,1611	C26H30O13	0,4	243,0661 (C14H11O4); 125,0251	Dihydroxyflavanon- <i>O</i> -pentose-hexose

				(C6H5O3)	
28	14,7	557,1299	C27H26O13	0,3	417,0793 (C18H18NaO10); 395,0982 (C18H19O10); 233,0665 (C9H13O7); 173,0451 (C7H9O5)
29	14,88	593,1313	C30H26O13	-2,1	285,0405 (kaempférol)
30	14,95	409,1498	C20H26O9	1,6	163,0400 (Acide coumarique); 119,0506 (C8H7O)
31	15,08	551,2131	C27H36O12	0,6	387,1644 (C18H27O9); 225,1121 (C12H17O4); 163,0401 (C9H7O3)
					Acide caféoylquinique acétylé
					Kaempferol- <i>O</i> -coumaroyl-hexoside
					Acide coumarique (diacetylated hexoside) ou DiCQA butyl ester
					Dérivé de lignane

Non identifié

Correspond avec le DNP ou la littérature d'*Helichrysum* sp.

Correspond avec le DNP et la littérature d'*Helichrysum* sp.

Correspond avec le DNP, la littérature d'*Helichrysum* sp. et les standards



Spécifique à la plante

Commun à l'extrait de cellules

On retrouve les isomères de diCQA (pics 17, 19, 22) comme composés majoritaires (le 3,5-diCQA est saturé). Néanmoins 2 autres isomères de diCQA semblent être présents (pics 20 et 26) et cela pourrait correspondre à un acide caféique sur la position 1 de l'acide quinique, ce qui a déjà été décrit dans l'espèce *H. obconicum* (Gouveia and Castilho, 2011). Le composé 3 qui semble correspondre à un acide caféoylquinique est aussi majoritaire. On ne retrouve pas d'unité shikimate, contrairement à l'extrait de cellule, mais par contre le groupement malonyl est présent (pics 5, 21, 23), notamment dans un composé majoritaire, l'acide malonyldicaféoylquinique. L'hypothèse de cette structure nécessite l'isolement de cette molécule et sa détermination structurale par RMN 1 et 2D puisqu'il n'existe pas de standards commercialisés. Cette molécule a déjà été décrite dans *H. obconicum* mais jamais dans l'espèce *stoechas* (Gouveia and Castilho, 2011). L'analyse LC-HRMS nous a aussi permis de confirmer la présence de dérivés de flavonoïdes précédemment observés en CCM, pouvant aussi expliquer la teneur en flavonoïdes plus importante mesurée lors du dosage à l' AlCl_3 .

5. Conclusion des analyses phytochimiques d'*H. stoechas*

Ces analyses préliminaires effectuées par **déréplication** nous ont permis de mettre en évidence des différences de profils phytochimiques entre les extraits de plante et de cellules. On observe des différences qualitatives, par exemple la sous-production de CQA dans les cellules par rapport à la plante, mais aussi des différences quantitatives avec l'absence de production de **dérivés malonylés** dans les suspensions cellulaires. Globalement on observe tout de même de **fortes similitudes**, notamment la présence de flavonoïdes et une production accrue d'acides phénoliques et plus particulièrement de **diCQA (3,5-diCQA majoritaire)** dans les deux matières premières. Les diCQAs ont donc été choisis comme **marqueurs** pour la suite de l'étude d'*H. stoechas* (extraction, élicitation, activité biologique).

Pour obtenir une image globale du potentiel biosynthétique, il serait nécessaire d'analyser également les molécules potentiellement excrétées dans le milieu de culture.

Les diCQAs sont des métabolites assez répandus dans le règne végétal. On les retrouve par exemple dans la bardane (Jiang et al., 2016), la poire (Oleszek et al., 1994), le maté (Filip et al., 2001). On en trouve également dans le propolis (Bankova et al., 2000). Néanmoins, l'artichaut reste une des plantes les plus étudiées pour sa forte concentration en diCQA (D'Antuono et al., 2015; Jun et al., 2007; Menin et al., 2010; Pandino et al., 2017; Shen et al.,

2015). Dans les plantes, les diCQAs sont impliqués dans les systèmes de défense contre les attaques pathogènes ou des stress (Mhlongo et al., 2014; Moglia et al., 2008).

Les diCQA résultent de la condensation d'un acide quinique et deux acides caféique. L'acide quinique est synthétisé par la voie du shikimate. Il résulte de la transformation du D-érythrose-4P par 3 enzymes et une réaction d'aldolisation (cf. Chap.2, § II C 1). L'acide caféique est synthétisé à partir de la phénylalanine, plus en aval dans la voie du shikimate, (cf. Chap.2, § II C 1). La condensation avec l'acide quinique se fait sur la molécule de coumaroyl-CoA (Figure 3.17). L'addition du deuxième groupement caféique sur l'acide caféoylquinique n'est pas décrite.

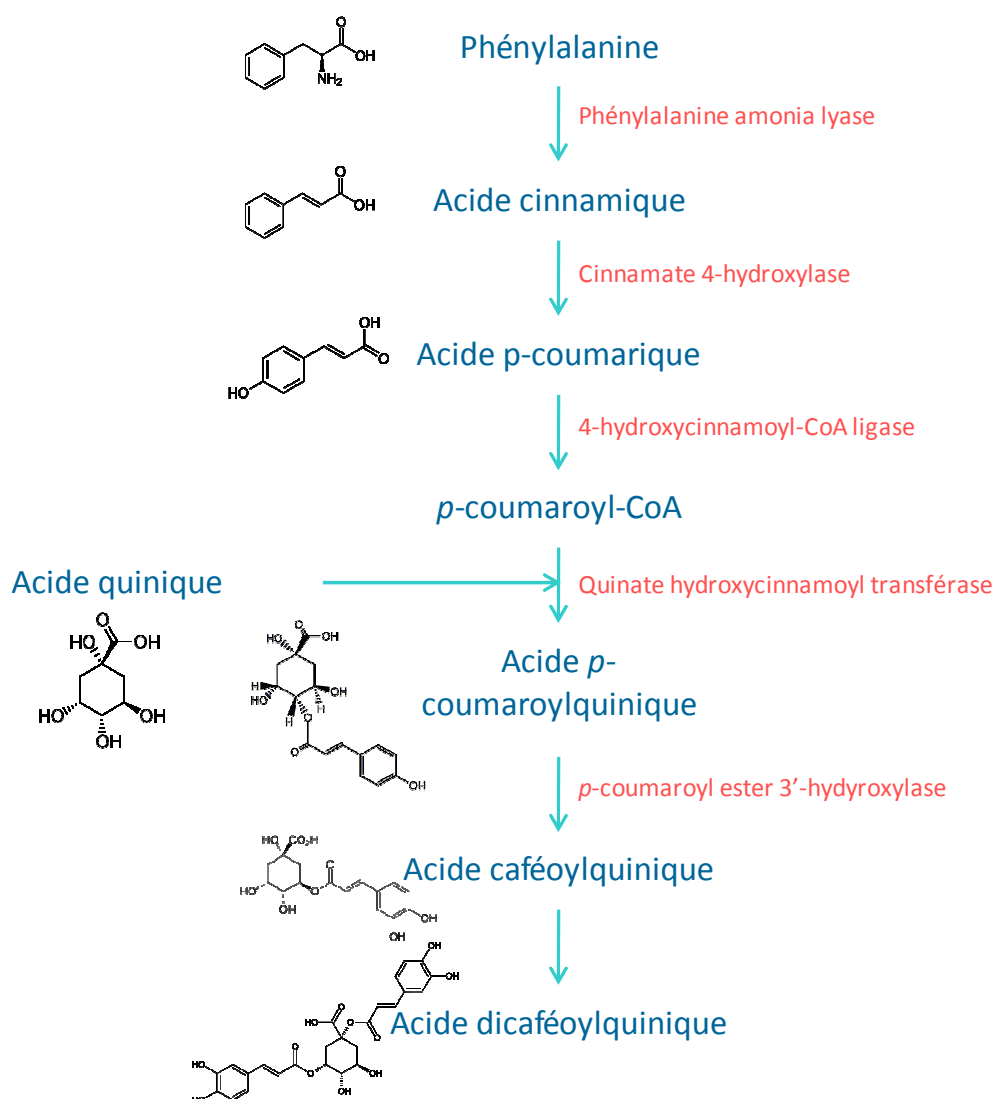


Figure 3.17 : Proposition de voie de biosynthèse des diCQAs par Menin et al., 2010

B. Comparaison de différentes méthodes d'extraction du 3,5-diCQA à partir des parties aériennes d'*H. stoechas*

1. Contexte

Classiquement, les composés phénoliques sont extraits par macération ou extraction à reflux avec un mélange hydro-alcoolique. Néanmoins, le développement de techniques plus respectueuses de l'environnement devient un enjeu majeur. En effet, le recours à des méthodes plus efficaces en termes de rendement, temps, coût, mais aussi limitant la consommation de solvant, devient une priorité pour de nombreuses entreprises (Azmir et al., 2013; Jeevan Kumar et al., 2017). De plus, les solvants utilisés doivent eux aussi être les plus « verts » possible, notamment pour protéger l'environnement et l'expérimentateur tout comme le consommateur (Soh and Eckelman, 2016). Dans le cas de produits finis destinés au marché de la cosmétique, la réglementation REACH (*Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*) impose des contraintes justifiant le choix de procédés d'extraction éco-responsables (European Chemicals Agency - REACH). Enfin, les techniques d'extraction et/ou de purification doivent aussi être pratiques et limiter le nombre d'étapes de pré- et post-traitement qui sont chronophages, génératrices de déchets et de variabilité dans les résultats. C'est dans ce contexte que nous avons choisi d'évaluer les performances de trois techniques d'extraction éco-responsables et de n'utiliser comme solvant d'extraction que l'eau, l'éthanol et le CO₂ qui sont des solvants non toxiques et pouvant être considérés comme solvants "verts" (Byrne et al., 2016; Capello et al., 2007). La quantité de diCQA (préalablement identifié en LC-HRMS) extraite a été comparée de façon relative en mesurant la hauteur des pics en HPLC-DAD-ELSD. Cette quantification relative n'a pu être réalisée que lorsqu'on était à concentration d'extrait constante, ou lorsqu'on le ratio solvant/végétal était constant.



Figure 3.18 : Les différents appareils utilisés pour l'extraction

A. Extraction assistée par micro-ondes, B. Extraction par fluide pressurisé, C. Extraction par fluide supercritique

L'extraction assistée par micro-ondes (MAE) (Figure 3.18-A) correspond à une soumission du mélange solvant/matrice à un champ électromagnétique de 2,45 GHz. Sous l'influence du courant alternatif, les molécules possédant un moment dipolaire vont changer d'orientation $4,9 \cdot 10^9$ fois par seconde (Letellier and Budzinski, 1999). Le transfert d'énergie au mélange se fait grâce à la rotation des dipôles et à la conduction ionique. Dans le cas d'utilisation d'un solvant polaire, comme dans un mélange hydro-alcoolique, le solvant va s'échauffer très rapidement. La MAE permet ainsi de rapidement diminuer la viscosité du solvant, d'augmenter les phénomènes de diffusion, de solubilité et la pénétration du solvant dans la matrice ce qui favorise l'extraction des molécules. Dans le cas de matériel végétal frais, l'eau intrinsèque au végétal possède aussi un moment dipolaire (1,85 D) et peut donc jouer aussi un rôle de solvant (Lucchesi et al., 2004; Michel et al., 2011). Les études antérieures citent comme avantages de cette technique : son fort rendement d'extraction, sa rapidité d'exécution ainsi que son coût réduit (Dahmoune et al., 2014; Ganzler et al., 1990).

L'extraction par fluide pressurisé (PFE) (Figure 3.18-B), permet quant à elle de réaliser des extractions à température élevée (jusqu'à 200°C) et surtout à pression élevée. Le matériel végétal est placé dans une cellule, de la terre de diatomées est ajoutée et joue le rôle d'agent dispersif. La cellule est ensuite remplie de solvant puis maintenue sous pression (100 bars). Puis le solvant chargé en métabolites est collecté et l'échantillon rincé avec une quantité souhaitée de solvant frais qui sera également collecté. Successivement, plusieurs cycles d'extraction peuvent être réalisés sur un même échantillon. La pression permet de maintenir le solvant d'extraction sous forme liquide à haute température. L'augmentation de la température engendre une diminution de la viscosité et de la tension de surface du solvant, ce qui favorise la pénétration du solvant dans la matrice, améliorant ainsi les temps et rendements d'extraction (Toubane et al., 2017).

L'extraction par fluide supercritique (SFE) (Figure 3.18-C) consiste à faire passer du CO₂ à l'état supercritique (Figure 3.19) au travers d'une cartouche contenant du matériel végétal. Il s'agit d'une extraction dynamique. A l'état supercritique, le CO₂ a une densité qui peut varier de celle des gaz jusqu'à celle des liquides, suivant les conditions de pression et de température, une viscosité plus proche des gaz et une diffusivité intermédiaire. Ainsi il possède une importante capacité de transfert.

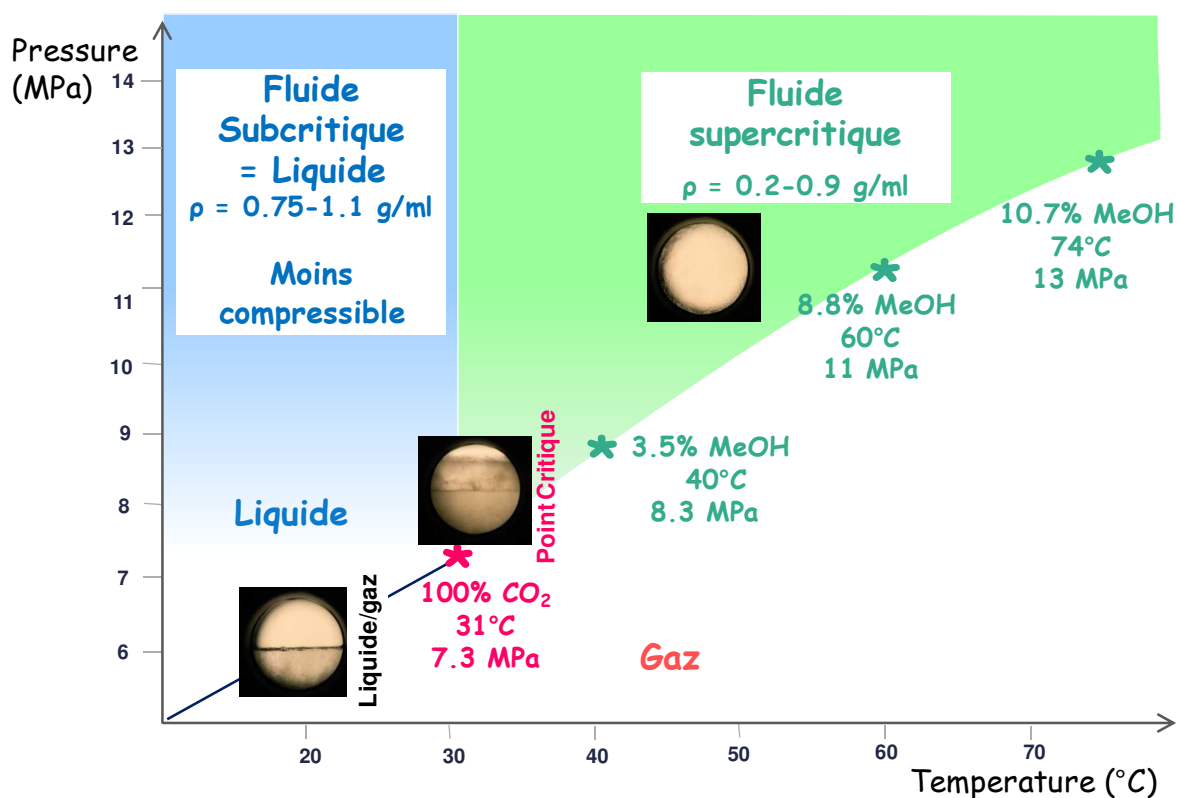


Figure 3.19 : Etat du CO₂ en fonction de la température et de la pression

cours de master du Dr Caroline West (ICOA)

Cette technique très respectueuse de l'environnement (Capello et al., 2007) présente l'inconvénient de l'apolarité du CO₂ qui limite l'extraction des composés polaires. Cependant l'addition de co-solvants au CO₂ permet de modifier la polarité du mélange et rend possible l'extraction de métabolites secondaires polaires comme c'est le cas de la majorité des polyphénols (Da Porto and Natolino, 2017; Díaz-Reinoso et al., 2006). Généralement ce sont des alcools qui sont utilisés comme co-solvants, l'éthanol présentant de plus l'avantage d'une très faible toxicité (Babova et al., 2016; Murga et al., 2000). D'autres paramètres comme la température, la pression ou le débit du fluide peuvent également être modifiés pour accroître les rendements d'extraction ou la sélectivité (Aizpurua-Olaizola et al., 2015).

2. Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

Les conditions initiales utilisées lors de l'optimisation des différents paramètres étaient : 3 cycles de 30 s à 1000 W sans renouvellement de solvant à chaque cycle, tous les paramètres étant par la suite optimisés indépendamment.

Avec le solvant éthanol/eau 80/20 (v/v), plusieurs durées d'extraction ont été testées de 15 à 120 s. Le rendement global d'extraction est calculé en faisant le rapport de la masse de l'extrait sec sur la masse de broyat de plante, il est toujours d'environ 18 %. Donc la durée n'influence pas le rendement global d'extraction. Par ailleurs, elle influence très peu l'extraction du diCQA qui est le composé majoritaire. Toutefois, lorsque la durée d'extraction augmente, le pic majoritaire (correspondant au 3,5-diCQA) se dédouble (diminution de son aire et augmentation de l'aire du pic voisin, 4,5-diCQA). De plus, les températures atteintes augmentent avec la durée (à 1000W : 87 °C pour 15 s, 122 °C pour 30 s 156°C pour 45 s) (à 500 W : 115 °C pour 45 s, 130 °C pour 60 s, 156 °C pour 120 s), ce qui pourrait expliquer le dédoublement du pic majoritaire en HPLC probablement dû à une isomérisation. En effet, les esters d'acide cinnamique sont connus pour s'isomériser facilement (Xue et al., 2016). Il semble donc préférable de retenir une durée intermédiaire pour limiter la potentielle dégradation/isomérisation des composés soit 30 s à 1000 W ou 60 s à 500 W.

L'étude de l'influence de la puissance montre que pour 45 s, à 1000 W (versus 200 W), un dédoublement de pic est observé comme dans le cas de l'augmentation de la durée, ce qui laisse penser à une dégradation/isomérisation. Ce phénomène n'est pas observé à 500 W. Cette puissance sera donc privilégiée lorsque la durée dépasse les 30 s.

Lorsqu'on augmente le nombre de cycles d'extraction, on observe une augmentation du rendement global d'extraction et des diCQA. Ainsi, 3 cycles favorisent de meilleurs rendements d'extraction. En revanche, le renouvellement du solvant entre chaque cycle s'est avéré inutile car il ne permet pas d'augmenter l'extraction des diCQA, ce qui signifie que dans les conditions testées (200 mg dans 5 mL), le solvant n'est pas saturé par les composés extraits.

Ainsi, les meilleures conditions pour les micro-ondes sont : **3 cycles de 30 s à 1000 W** sans renouveler le solvant (Figure 3.19) (Tableau 3.10).

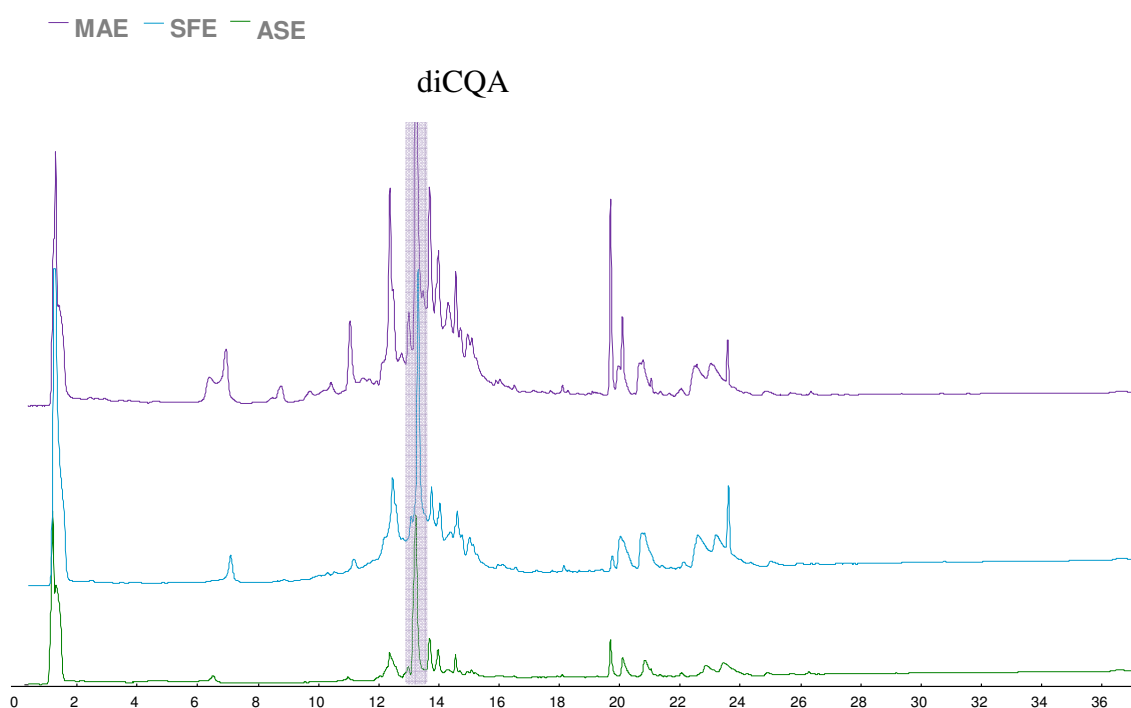


Figure 3.19 : Profils HPLC-DAD (à 280 nm) des extraits d'halophyte obtenus par les différentes techniques d'extraction dans les conditions optimales pour chacune des trois techniques.

Un test supplémentaire a été réalisé avec de l'acétate d'éthyle, mais dans nos conditions expérimentales initiales (3 cycles, 30s, 1000 W) ce solvant n'a pas extrait les diCQA.

Cette étude a permis de démontrer que le choix d'un solvant adapté est primordial puisque sa polarité gouverne non seulement la solubilité des composés mais aussi la température d'extraction. En revanche, une fois le solvant adéquat sélectionné, les paramètres temps d'extraction et puissance se sont avérés peu influents sur l'extraction des diCQA.

Cependant, l'extraction aurait encore pu être améliorée avec du matériel végétal frais. En effet, l'eau endogène du végétal peut rapidement capter l'énergie des micro-ondes et provoquer l'explosion des parois cellulaires (Wang and Weller, 2006). Dans ce cas, les

micro-ondes interagissent directement avec le matériel végétal. Si les molécules d'intérêt sont polaires, comme dans cette étude, l'eau intrinsèque peut alors jouer un rôle de solvant et favoriser leur extraction.

3. Extraction par solvant pressurisé (PFE)

Les conditions initiales utilisées lors de l'optimisation étaient : 3 cycles de 10 min à 40 °C avec un volume de rinçage de 60%. Tous les paramètres ont par la suite été optimisés indépendamment.

Différentes températures ont été testées: 40, 65 et 100 °C. Une augmentation du rendement global d'extraction avec l'augmentation de la température est observée (14, 20 et 24% respectivement). Les profils HPLC-DEDL, quant à eux, montrent que le diCQA est mieux extrait à 65 °C, un doublement de la hauteur du pic du diCQA majoritaire est observé entre 40 et 65 °C. Entre 65 °C et 100 °C, cette hauteur de pic diminue, la différence de masse est alors due à une meilleure extraction des composés qui sortent dans le volume mort en HPLC, donc des composés très polaires au vu de la méthode en phase inverse qui est utilisée. Il pourrait s'agir de métabolites primaires comme des sucres ou des acides aminés sans intérêt dans cette étude.

L'impact de la durée d'extraction a également été analysé (5, 10 et 20 min). Il a été démontré par comparaison des profils chromatographiques qu'une extraction de 20 min permet de mieux extraire le diCQA majoritaire (12 mV pour 10 min 16 mV pour 20 min). Néanmoins, dans les conditions initiales, une augmentation de la température (65 °C) est beaucoup plus efficace qu'une augmentation de la durée (20 min) avec une hauteur de pic de 41 mV et 16 mV respectivement. La température permet en effet d'augmenter la diffusivité du solvant dans la matrice.

L'influence du volume de rinçage de la cellule a également été testée (30, 60 et 100 %). Peu de différences sont observées entre 60 et 100% pour l'extraction du diCQA (respectivement 22,5 et 25 mV en hauteur de pic), par contre 60% donne de meilleurs résultats que 30 % (17,5 mV). Ainsi, un volume de rinçage de 60% est un bon compromis entre efficacité et quantité de solvant utilisée.

Une comparaison a également été réalisée au niveau du nombre de cycles : un seul cycle de 30 min *versus* trois cycles de 10 min. Cette dernière procédure permet une meilleure

extraction du diCQA, alors que qualitativement, aucune différence n'est observée. Ceci est dû au fait que, pour chacun des 3 cycles, du solvant frais est injecté dans la cellule au moment du rinçage, ce qui favorise la diffusion des solutés vers le solvant d'extraction.

Ainsi les meilleures conditions pour l'extraction du diCQA ont été fixées à **3 fois 20 min à 65 °C avec 60% de rinçage** (Figure 3.19) (Tableau 3.10).

Un test a été réalisé avec de l'acétate d'éthyle dans les conditions expérimentales initiales mais ce solvant n'a pas permis d'extraire les diCQA de la matrice végétale.

Il est important de souligner que, contrairement aux extraits obtenus par la MAE, aucune modification qualitative n'a été observée avec cette technique, notamment pas de dédoublement de pic.

Cette technique se rapproche davantage de la SFE que de la MAE puisque l'extraction est réalisée sous pression (100 bars), mais dans tous les cas lors de la PFE les conditions utilisées sont en-dessous des conditions permettant au fluide d'atteindre son point supercritique (240°C et 6,14 MPa pour l'éthanol pur ; 37°C et 22,1 MPa pour l'eau pure).

4. Extraction par fluide supercritique (SFE)

La contre-pression qui permet de définir la densité du fluide à l'intérieur de la cellule d'extraction a été fixée pour toutes les expériences à 15 MPa. L'influence d'un co-solvant sur l'extraction a été testée à 30 °C. Pour ce faire, l'extraction a été réalisée selon trois protocoles différents, avec 100% de CO₂, 90% de CO₂ additionné de 10% d'éthanol ou 90% de CO₂ additionné de 10% d'un mélange éthanol/eau (80:20 ; v/v). Le choix de l'éthanol et de l'eau comme co-solvants polaires permet de conserver des solvants identiques à ceux utilisés en MAE et PFE. De plus, ce choix réside aussi dans une volonté de faire de la SFE une technique verte et non dangereuse pour le manipulateur comme pour les deux techniques précédentes. Les résultats obtenus sont présentés Figure 3.20.

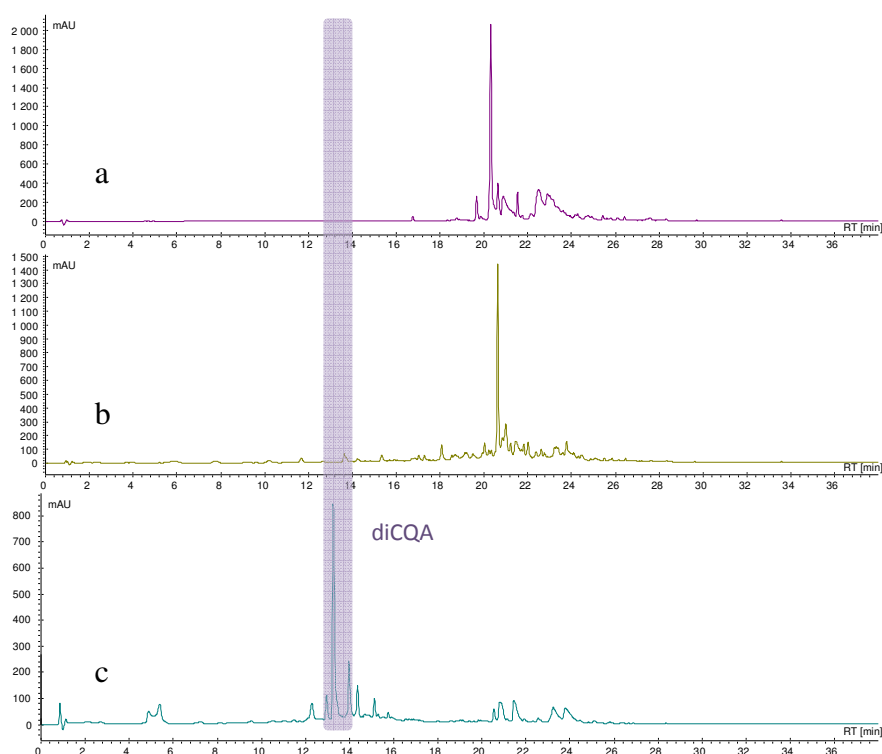


Figure 3.20 : Profils HPLC-DAD (à 280 nm) des extraits d'*H. stoechas* obtenus par SFE dans différentes conditions

a. 100% CO₂, b. 90% CO₂ + 10% éthanol, c. 90 % CO₂ + 10% éthanol/eau (80:20; v/v)

Le CO₂ seul n'extrait pas les acides phénoliques. En effet, dans ces conditions, les molécules extraites majoritairement sont beaucoup plus apolaires (elles apparaissent sur les chromatogrammes après 19 min d'analyse). L'ajout d'éthanol dans le CO₂ permet d'augmenter la polarité du fluide d'extraction, mais l'extrait ainsi obtenu présente un profil chromatographique similaire à celui de l'extrait au CO₂ pur. L'ajout de 20% d'eau dans l'éthanol permet d'obtenir un extrait enrichi en molécules d'intérêt (vers 13,5 min). Le profil HPLC de ce dernier extrait est très similaire à un extrait obtenu par sonication ou un extrait obtenu par MAE ou PFE, les diCQA sont donc très bien extraits (Figure 3.19). Ainsi, l'ajout d'eau dans le co-solvant change de façon significative la polarité du fluide d'extraction, permettant ainsi d'extraire des métabolites de polarité différente par rapport au CO₂ seul. Le méthanol, que nous avons aussi testé et qui est souvent décrit comme co-solvant dans la littérature (Murga et al., 2000; Palma and Taylor, 1999), ne s'est pas avéré aussi efficace que le mélange éthanol/eau. De plus, les caractéristiques CMR (Cancérogène, Mutagène et Reprotoxique) de ce solvant limitent aujourd'hui son utilisation au sein des laboratoires comme à l'échelle industrielle.

En parallèle, des essais ont aussi été réalisés à 60 °C. Cette augmentation de la température n'influe pas sur l'empreinte phytochimique de l'extrait obtenu, mais l'extraction du diCQA est légèrement supérieure (510 mV au lieu de 460 mV), sans générer de dédoublement de pic. L'extraction peut donc avoir lieu à 60 °C pour être plus efficace.

Après avoir démontré le pouvoir extractant du co-solvant éthanol/eau (80:20 v/v), l'impact de son ratio par rapport au CO₂ a été étudié à raison de 5, 10 ou 20%. Avec 5%, la réponse pour le diCQA atteint 74 mV/min, avec 10% 171 mV/min et 211 mV/min avec 20% (Figure 3.21).

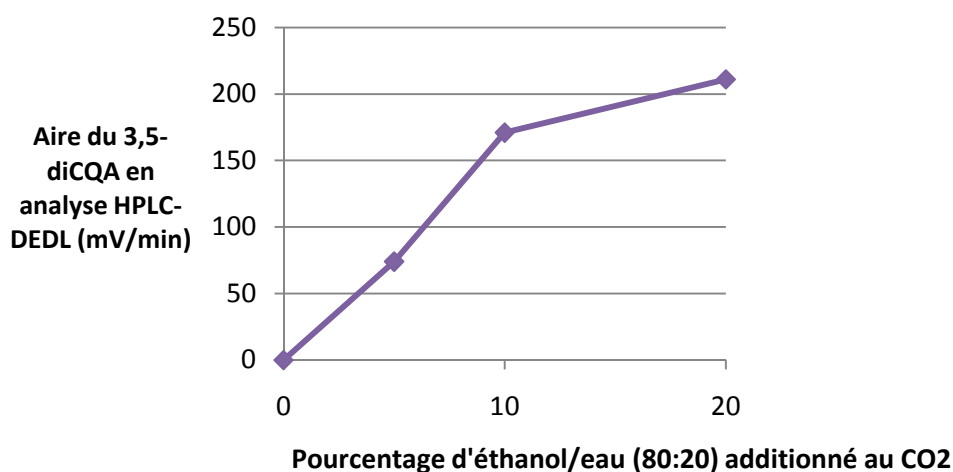


Figure 3.21 : Influence du pourcentage de co-solvant sur l'extraction des diCQA par SFE

L'extraction du diCQA augmente donc avec le pourcentage de co-solvant. Néanmoins, la proportion utilisée peut être discutée pour que la SFE ne soit finalement pas utilisée comme une PFE, c'est pourquoi des ajouts de co-solvant supérieurs à 20% n'ont pas été testés. Ainsi pour le reste des tests, le pourcentage a été fixé à 10%.

Comme le système MV-10ASFE Waters permet la récupération du solvant d'extraction dans différents flacons de collecte, il a été possible de réaliser une cinétique d'extraction pendant 3h avec des durées de collecte par flacon de 30 min. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3.22.

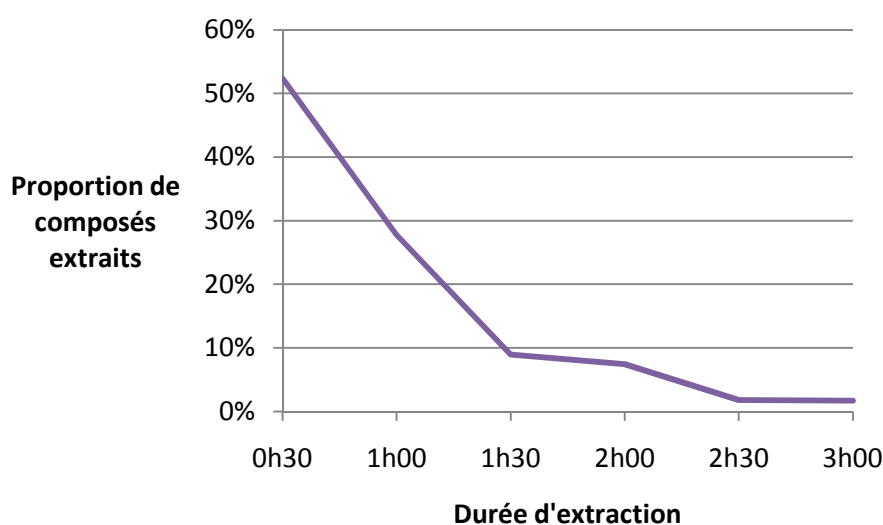


Figure 3.22 : Cinétique d'extraction supercritique avec un co-solvant : CO_2 + 10% EtOH/eau (80:20 ; v/v)

La première heure, on obtient 80% de la masse finale de l'extrait, contre seulement 16% la deuxième heure et 3% la troisième heure.

Les conditions optimales sont donc : 1 h à 60 °C avec 10% de co-solvant éthanol/eau (80:20 ; v/v) (Tableau 3.10).

5. Praticité des méthodes

La MAE est une technique très facile à mettre en œuvre, très rapide et peu consommatrice de solvant. Cependant, pour une évaluation comparative des méthodes d'extraction testées (durée totale, consommation de solvants, étapes intermédiaires), il est important de prendre en compte les temps de refroidissement du mélange entre chaque cycle d'extraction ainsi que le traitement de l'échantillon après extraction, qui comprend une étape de filtration ou centrifugation puis une étape de concentration de l'échantillon. La difficulté à récupérer l'extrait dans le réacteur de 12 mL est aussi à souligner car elle peut engendrer des pertes.

La PFE et la SFE sont des méthodes entièrement automatisées qui présentent l'avantage d'obtenir un extrait déjà filtré, qu'il ne reste plus qu'à concentrer. Cependant pour la PFE et la SFE, une étape préliminaire de remplissage des cellules d'extraction est nécessaire. Dans le cas de la PFE, les cellules sont complétées avec de la cérite (terre de diatomées) qui est un

CMR, ainsi l'étape de préparation est dangereuse pour le manipulateur en plus d'être chronophage. Pour la SFE, c'est du sable de fontainebleau qui est utilisé selon les recommandations du fournisseur. Il pourrait aussi être intéressant de l'utiliser pour la PFE.

La SFE présente un avantage certain en termes de temps de manipulation. En effet, le retour à l'état gazeux du CO₂ supercritique, permet de concentrer une grande partie de l'extrait (la fraction CO₂). Par exemple, pour une extraction d'1h30 à 5 mL/min de solvant d'extraction contenant 10% de co-solvant, le volume final de l'extrait est de seulement 45 mL, d'où une concentration d'un facteur 10 par rapport au volume de fluide utilisé. De plus, c'est la seule méthode d'extraction réellement dynamique, ce qui favorise le transfert de masse des composés en maintenant au maximum le gradient de concentration entre la matrice et le fluide d'extraction.

Tableau 3.10 : Comparaison des méthodes d'extraction MAE, PFE et SFE optimisées.

	MAE	PFE	SFE
Etape de traitement échantillon	Refroidissement Filtration Evaporation	Préparation cartouche Evaporation	Préparation cartouche Evaporation
Durée extraction	1,5 min	60 min	60 min
Température d'extraction	120 °C	65 °C	60 °C
Consommation solvant par prise d'essai	5 mL / 200 mg	8 mL / 200 mg	30 mL (co-solvant) / 500 mg
Solvant	EtOH 80%	EtOH 80%	90% CO ₂ 10% EtOH/H ₂ O
Rendement d'extraction global par masse de plante sèche	18%	20%	15%
Extraction des composés phénoliques (analyses HPLC)	Profils phytochimiques similaires		

6. Conclusion de la comparaison de techniques d'extraction

Les différents paramètres testés pour la **MAE** et la **PFE** n'influent pas de façon significative sur l'extraction des diCQA. Dans les conditions utilisées, ces deux techniques permettent une extraction facile et rapide de ces molécules d'intérêt qui sont fortement solubles dans le solvant éthanol/eau (80:20 ; v/v) choisi, et présentes en grande quantité dans *H. stoechas*.

Tous les paramètres testés en **SFE** se sont révélés plus déterminants, notamment l'ajout de quelques pourcents de **co-solvant hydro-alcoolique** qui permet d'extraire des polyphénols très polaires comme les acides phénoliques. Comme pour une extraction solide/liquide par MAE ou PFE, la composition du fluide influe sur la polarité et permet d'extraire sélectivement certains composés. De plus, l'utilisation d'eau dans le co-solvant est peu citée dans la littérature (Da Porto et al., 2014; Seabra et al., 2010). Cette étude a permis de confirmer son intérêt. Ainsi, la SFE, surtout décrite dans la littérature pour l'extraction de métabolites végétaux apolaires (Martinez-Correa et al., 2017; Viguera et al., 2016), se révèle aussi être une méthode de choix pour l'extraction des diCQA contenus dans *H. stoechas*. Le choix de l'extraction de composés polaires par SFE constitue une **innovation méthodologique**. Enfin cette technique de chimie verte qui ne nécessite que peu de solvant, présente l'avantage d'être transposable à **grande échelle**. Elle pourra donc être utilisée dans l'industrie pour l'extraction de molécules à haute valeur ajoutée et ce, en respectant l'**environnement**.

III. Evaluation des activités biologiques d'*H. stoechas*

Les extraits de parties aériennes (HsP) et de cellules dédifférenciées (HsC) d'*H. stoechas* ainsi que le 3,5-diCQA ont été testés sur différentes activités biologiques à visée dermo-cosmétique (antioxydante, anti-inflammatoire, cicatrisation).

A. Activité antioxydante

L'activité antioxydante a été mesurée grâce au test ORAC (cf. Chap.4, § V A 2). Plus l'indice ORAC est élevé plus l'extrait est antioxydant.

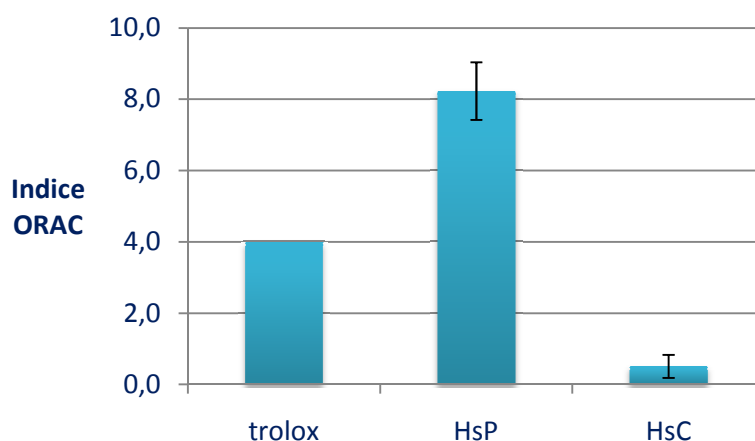


Figure 3.23 : Indices ORAC (exprimés en $\mu\text{mol TE/ mg}$ d'extrait sec) des extraits d'*H. stoechas*

Le témoin utilisé dans ce test est le Trolox (analogue hydrophile de la vitamine E). L'extrait de plante est 2 fois plus antioxydant que le témoin, alors que l'extrait de cellules l'est 8 fois moins. L'extrait de plante est 16 fois plus antioxydant que l'extrait de cellule. On peut donc dire que l'extrait de plante est très antioxydant, alors que l'extrait de cellule ne l'est pratiquement pas. Pour une même espèce, des différences de potentiel antioxydant entre les plantes entières et les cellules cultivées *in vitro* ont déjà été observées. Généralement, les extraits de cultures *in vitro* sont moins antioxydants que les extraits de plantes (Costa et al., 2012, 2013), d'où l'intérêt d'envisager des stratégies permettant d'augmenter la teneur en métabolites secondaires antioxydants en CVIV, comme par exemple l'élicitation (cf. § IV et cf. Chap.1 § III B).

B. Evaluation de la cytotoxicité

Deux tests de cytotoxicité ont été conduits en parallèle des tests d'activités biologiques, sur des macrophages murins et des cellules mononucléées humaines du sang périphérique (PBMC), puisque ces deux types de cellules sont utilisés pour déterminer les activités anti-inflammatoires dans notre étude.

1. Evaluation de la cytotoxicité des extraits sur des macrophages murins

En parallèle aux essais d'inhibition de la production de NO par des macrophages murins, des tests de cytotoxicité sur le même type de cellules ont été réalisés à l'aide du test WST (Water Soluble Tetrazolium salts). Le quercétol étant utilisé comme contrôle positif dans les tests anti-inflammatoires, sa cytotoxicité a également été testée.

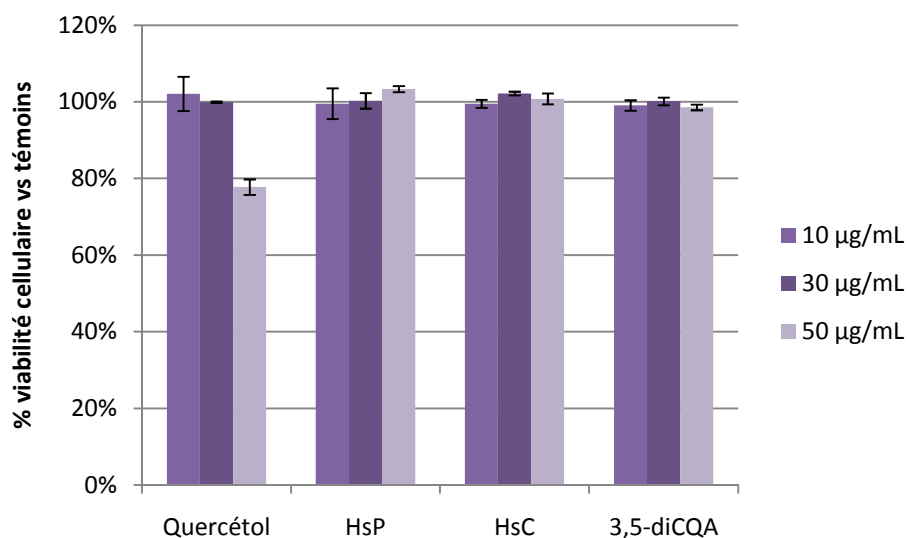


Figure 3.24 : Evaluation de la toxicité des extraits d'*H. stoechas* et du 3,5-diCQA sur les macrophages murins (test WST).

Aucune toxicité sur les macrophages murins n'est observée pour nos extraits. Contrairement au quercétol qui inhibe de 22% la viabilité cellulaire à 50 µg/mL.

2. Evaluation de la cytotoxicité des extraits sur des cellules mononucléées humaines

En parallèle aux essais d'inhibition de la sécrétion de cytokines par des PBMC (Cellules mononucléées de sang périphérique) traitées au LPS (lipopolysaccharide), des tests de cytotoxicité ont été réalisés à l'aide du test WST sur ce type de cellules. La dexaméthasone étant utilisée comme contrôle positif dans les tests anti-inflammatoires, sa cytotoxicité a également été testée.

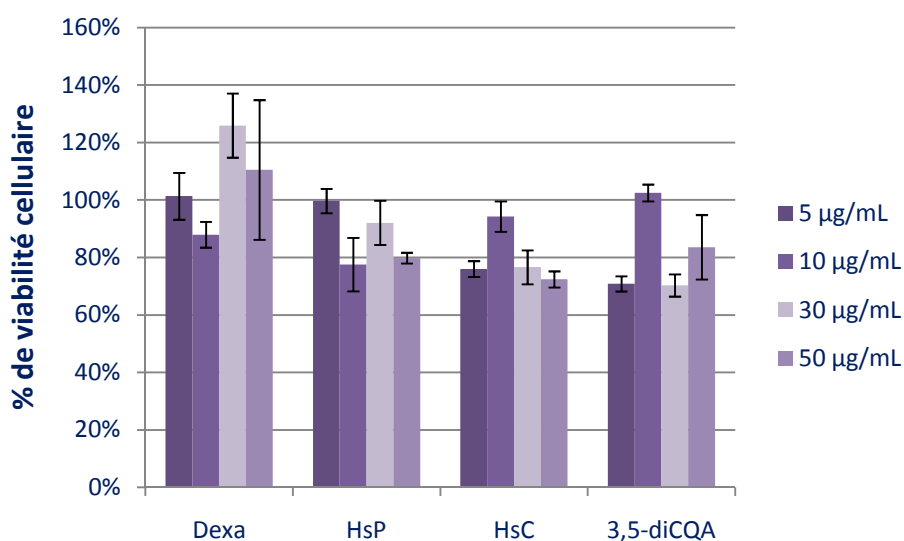


Figure 3.25 : Evaluation de la toxicité des extraits d'*H. stoechas* et du 3,5-diCQA sur les cellules mononucléées humaines par (test WST).

Contrairement aux essais sur les macrophages murins, on observe sur les PBMC une légère toxicité des extraits et du 3,5-diCQA (70% de viabilité cellulaire avec 5 ou 30 µg/mL de diCQA), sans relation dose-effet néanmoins. Des tests d'activité anti-inflammatoire ont tout de même été conduits sur les PBMC car on considère la toxicité seulement à partir de 30% de mortalité (*valeur fixée par les biologistes qui ont réalisé ces essais*). La dexaméthasone semble influencer aussi sur la viabilité cellulaire (ce qui n'avait pas été observé lors des tests d'évaluation biologique d'*A. maritima*), mais sans relation dose-effet et dans une gamme acceptable au vu des écart-types.

C. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des extraits HsP et HsC et du 3,5-diCQA a été testée *via* deux tests complémentaires : l'inhibition de la production de monoxyde d'azote (NO), et l'inhibition de la sécrétion de cytokines.

1. Inhibition de la production de NO

Dans un premier temps, la viabilité cellulaire a été mesurée par le test WST, pour s'assurer de la non toxicité des extraits sur les macrophages murins utilisés pour la mesure de l'inhibition de la production de NO (cf. § B.1).

Le quercétol est utilisé comme témoin positif dans ce test.

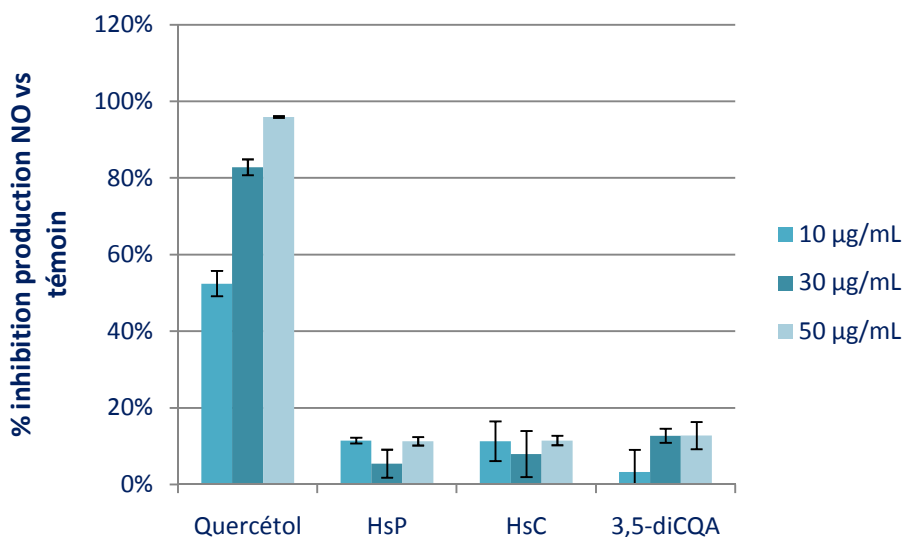


Figure 3.26 : Effet des extraits de plantes et de cellules d'*H. stoechas* et du 3,5-diCQA sur la production de NO par des macrophages murins traités au LPS.

Une inhibition de la production de NO à 15 % est observée pour les deux extraits et le 3,5-diCQA. Cette activité est extrêmement faible comparée à celle du témoin. L'effet d'extraits d'*Helichrysum* sp. sur la production de NO n'a jamais été rapporté dans la littérature. En revanche, des extraits hydro-alcooliques d'*H. stoechas* ont déjà montré un effet inhibiteur de l'activation du facteur NF- κ B (Bremner et al., 2009), qui lui est directement corrélé à la production de NO (Xie et al., 1994). Il en est de même pour le 3,5-diCQA, qui est décrit dans la littérature comme étant un inhibiteur de la transcription du gène codant pour l'oxyde nitrique synthase (Park et al., 2009) et de la production de NO d'environ 30 % à 50 % (Hong et al., 2015). Par la suite, il sera intéressant de tester des concentrations plus élevées de 3,5-

diCQA pour voir si on retrouve une relation dose-effet comme ces auteurs qui ont testé 250 µg/mL comme concentration maximale.

2. Inhibition de la sécrétion de cytokines

Comme dans le test précédent, la viabilité cellulaire a été mesurée par le test WST, pour s'assurer de la non toxicité des extraits sur les PBMC. On a ainsi observé une légère toxicité des extraits d'*H. stoechas* et du 3,5-diCQA (cf. § B.2).

La sécrétion de quatre cytokines a été mesurée : le TNFα, l'IL-1β, l'IL-6 et l'IL-8.

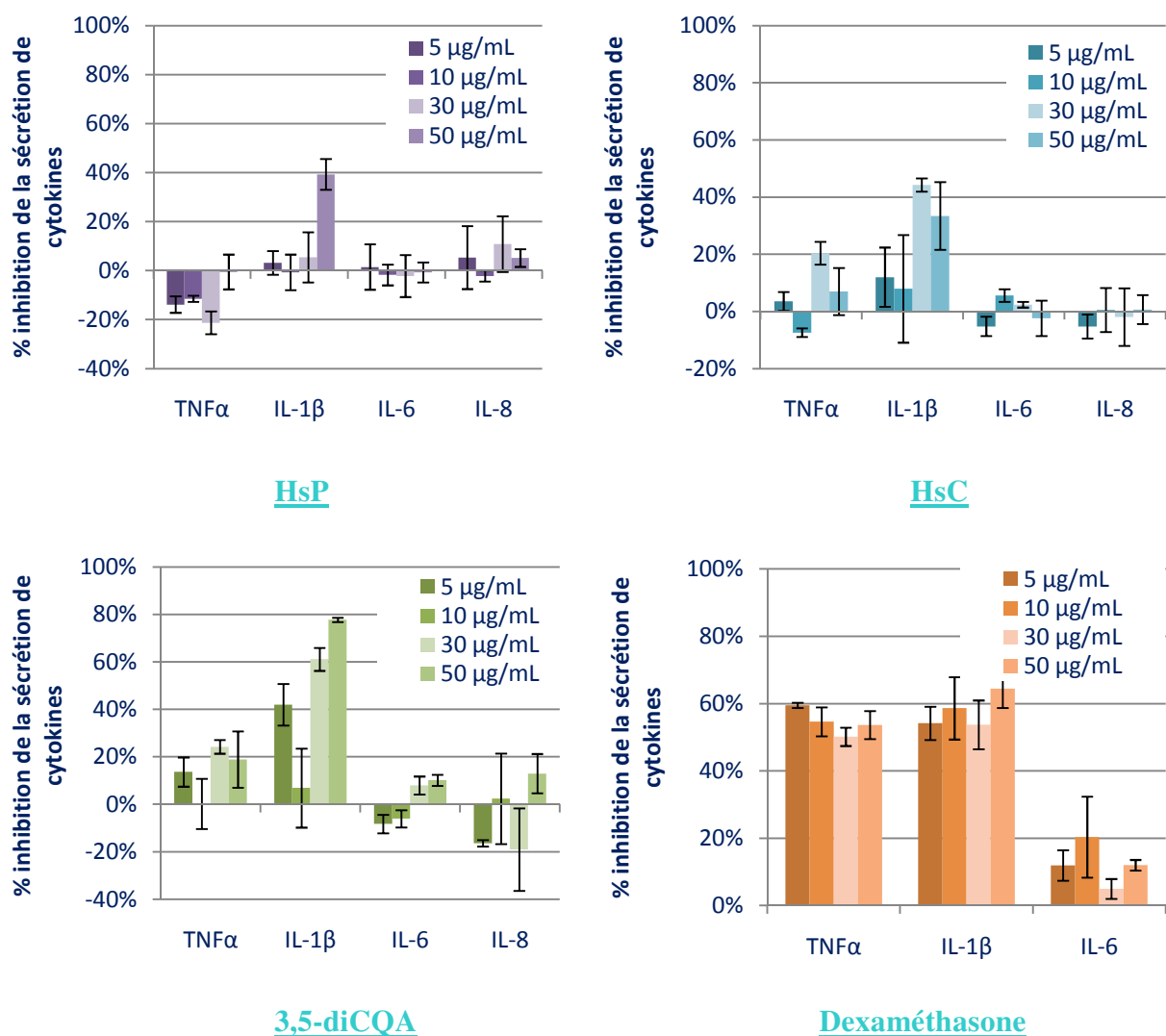


Figure 3.27 : Effet des extraits d'*H. stoechas*, du 3,5-diCQA et de la dexaméthasone sur la sécrétion de cytokines par des PBMC traitées au LPS.

(HsP : Extrait de parties aériennes de *H. stoechas* ; HsC : Extrait de cellules d'*H. stoechas*)

L'extrait de plante inhibe de 39% la sécrétion d'IL-1 β à 50 μ g/mL; aucune autre inhibition n'est observée pour cet extrait. L'extrait de cellules inhibe aussi la sécrétion d'IL-1 β , et de façon plus importante, puisque l'inhibition est de 44% à 30 μ g/mL. Cet extrait inhibe de 19 % la sécrétion du TNF α à 30 μ g/mL, mais de façon peu significative au vu de l'écart-type. Ainsi les deux extraits inhibent de façon spécifique la sécrétion d'IL-1 β , alors que dans la littérature c'est l'inhibition de la sécrétion d'IL-6 et de TNF α qui est généralement décrite (Bremner et al., 2009). Cependant il s'agit de tests réalisés avec des extraits acétate d'éthyle, ce qui pourrait expliquer cette différence ; mais une inhibition de la sécrétion du TNF α supérieure à 50% est tout de même observée pour l'extrait hydroalcoolique, qui lui est bien de même nature que les extraits HsP et HsC, permettant ainsi une comparaison des activités obtenues.

Le 3,5-diCQA inhibe de 78% la sécrétion d'IL-1 β à 50 μ g/mL. De plus, on observe une relation dose-effet (excepté pour 10 μ g/mL). Ainsi, nous pouvons supposer que cette molécule est en partie porteuse de l'activité des deux extraits qui la contiennent. De plus, le 3,5-diCQA inhibe légèrement la sécrétion de TNF α . Ces activités sont cohérentes avec les données de la littérature dans laquelle l'inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α et IL-6) par le 3,5-diCQA avait déjà été décrite. En effet, Li et al. (2013) ont déjà démontré que le 3,5-diCQA à 25,8 μ g/mL inhibait de 76% la sécrétion d'IL-6 par des macrophages murins. Motaal et al., 2016 ont démontré l'inhibition de la sécrétion du TNF α et de l'IL-1 β par le 3,5-diCQA *in vivo* (pratiquement 50% d'inhibition à 25 mg/kg). Il s'agit néanmoins de tests différents puisque l'un est réalisé sur des cellules murines et l'autre *in vivo*. La littérature laissait donc présager ce potentiel anti-inflammatoire du 3,5-diCQA, mais aucune inhibition de la sécrétion de l'IL-1 β dans notre modèle biologique n'avait été démontrée auparavant. Nos résultats apportent donc de nouveaux éléments concernant le potentiel anti-inflammatoire de cette molécule.

D. Conclusion sur les activités biologiques d'*H. stoechas*

L'extrait hydro-alcoolique de plantes d'*H. stoechas* possède un **fort pouvoir antioxydant** (indice ORAC de 8,1) ce qui n'est pas le cas de l'extrait de cellules. Néanmoins ils présentent tous les deux une activité intéressante sur **l'inhibition de la sécrétion d'IL1- β** , qui est une cytokine pro-inflammatoire. Le **3,5-diCQA** qui est le composé majoritaire dans ces deux extraits, permet d'inhiber jusqu'à 80% de la sécrétion d'IL1- β . Il contribue donc à augmenter le potentiel anti-inflammatoire des extraits qui la contiennent, il s'agit d'un **bio-marqueur**. Pour augmenter le potentiel **anti-inflammatoire** de ces derniers, il serait intéressant d'augmenter la teneur en 3,5-diCQA, ce que nous avons cherché à faire en élicitant les suspensions d'*H. stoechas*.

IV. Elicitation des cellules d'*H. stoechas*

A. Contexte

Dans cette étude, nous avons travaillé sur des suspensions cellulaires d'*H. stoechas* qui nous ont été fournies par notre partenaire BiotechMarine. Nous n'avons donc pas eu besoin, contrairement au travail réalisé sur *A. maritima*, de mettre au point un protocole de callogénèse puis de mise en suspension. Le profil phytochimique des cellules a été établi préalablement (cf. § II), montrant une richesse en acides dicaféoylquiniques. Ces molécules ont été choisies comme traceurs car elles sont majoritaires, mais aussi potentiellement dotées d'activités biologiques (cf. § III). Ainsi, dans cette approche biotechnologique, nous avons testé l'effet de différents éliciteurs sur la production des 3,4-, 3,5- et 4,5-diCQA. Il s'agit d'une étude préliminaire visant à cribler un maximum d'éliciteurs (traitements simples et combinés), pour identifier les plus efficaces qui feront ensuite l'objet d'études plus approfondies. L'ensemble des tests ont été réalisés selon les conditions de cultures et le milieu détaillé dans le chapitre 4.

B. Caractérisation de la suspension

Des études préliminaires à l'élicitation ont été menées pour caractériser la suspension et mettre en place notre protocole, en particulier en ce qui concerne le moment optimal du traitement. Ainsi nous avons réalisé une courbe de croissance sur les suspensions cellulaires d'*H. stoechas*.

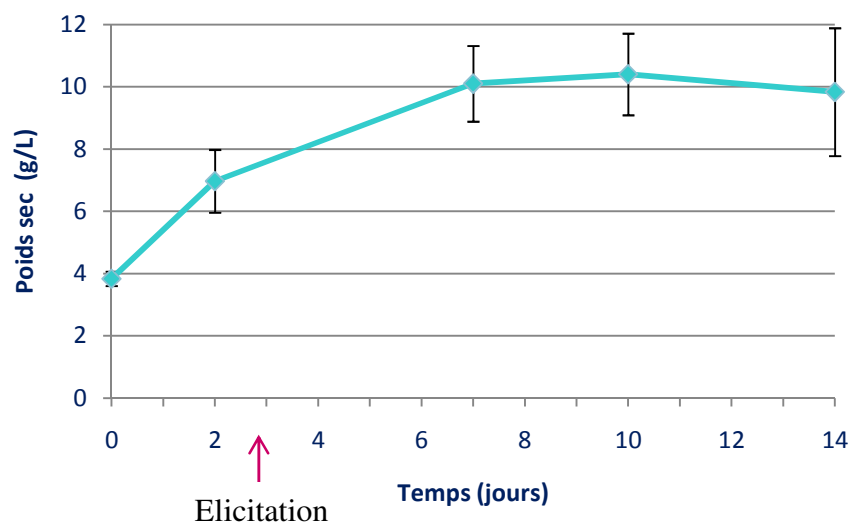


Figure 3.28 : Courbe de croissance des suspensions d'*H. stoechas* (n=3)

On observe une phase exponentielle jusqu'à j10 puis une phase stationnaire pendant 4 jours. Lors de la phase stationnaire les cellules sont en carence nutritive et elles activent alors leur métabolisme secondaire. Des essais préliminaires nous ont permis d'observer une augmentation de la teneur en diCQAs au cours de la phase stationnaire, c'est pourquoi nous avons conservé un cycle de 14 jours et non de 10. Dans la littérature, il a été démontré que la teneur en 3,5-diCQA dans des suspensions cellulaires d'artichaut ne variait pas au cours du cycle contrairement au 1,5 et 4,5-diCQA (Pandino et al., 2017).

Le choix du moment optimal pour l'élicitation fait l'objet de travaux (Ketchum et al., 1999; Lee-Parsons et al., 2004), cependant il dépend de l'espèce et des molécules d'intérêt que l'on cherche à produire. Dans notre cas, nous avons fait le choix d'ajouter l'éliciteur à j3, soit à la fin du premier tiers de la phase exponentielle.

C. Elicitations

Plusieurs éliciteurs ont été testés à différentes concentrations sur les suspensions cellulaires d'*H. stoechas*. Nous avons testé 2 phytohormones : méthyl jasmonate (MeJa) et acide salicylique (SA) ; deux autres éliciteurs biotiques : chitosan et coronatine et un éliciteur abiotique : chlorure de sodium (NaCl). Les concentrations ont été choisies sur la base des données de la littérature. Les éliciteurs ont d'abord été testés seuls, puis de façon combinée pour certains d'entre eux. Dans tous nos tests, l'éliciteur a été ajouté à j3 de la culture et les cellules ont été récoltées à j14. Pour chaque traitement, nous avons mesuré l'effet sur la

croissance en mesurant le poids frais et le poids sec des cellules à j14, et l'impact de l'éliciteur sur la concentration en 3,4-, 3,5- et 4,5-diCQA. Des tests statistiques ont été réalisés pour chacun des traitements afin de déterminer la significativité des différences observées.

Tableau 3.11 : Récapitulatif des éliciteurs testés

Eliciteurs	Concentrations
Chlorure de sodium	50 - 100 - 200 mM
Chitosan (Chito)	10 - 50 - 100 mg/L
Méthyl jasmonate (MeJa)	50 - 100 - 150 - 200 μ M
Acide salicylique (SA)	50 - 100 - 150 - 200 μ M
Coronatine	0,5 - 1 - 2 - 4 μ M
Méthyl jasmonate + chitosan	200 μ M MeJa + 100 mg/L chito
Méthyl jasmonate + acide salicylique	200 μ M MeJa + 150 μ M SA
Acide salicylique + Chitosan	150 μ M SA + 100 mg/L chito
MeJa + chitosan + SA	200 μ M MeJa + 100 mg/L chito + 150 μ M SA

1. Elicitation par le chlorure de sodium

H. stoechas étant une plante qui pousse essentiellement sur le littoral, elle est soumise aux embruns marins et elle peut donc potentiellement résister au sel. Il nous a donc semblé logique de tester le NaCl comme éliciteur abiotique. En effet le NaCl est connu pour stimuler la production de composés phénoliques chez les plantes, en particulier les halophytes (Alhdad et al., 2013) (cf .chap. 1 § I-B). Cette molécule a déjà été décrite comme éliciteur pour des halophytes mais aussi pour des glycophytes. Les concentrations de NaCl utilisées pour l'élicitation varient dans la littérature d'environ de 5 à 200 mM (Chen et al., 2014; Hayatsu et al., 2014; Lim et al., 2013; Tabuchi et al., 2003) et jusqu'à 400 mM pour des halophytes (Ben Hamed-Laouti et al., 2016; Thomas et al., 1992).

Dans un premier temps, nous avons observé l'impact du NaCl sur la croissance des cellules.

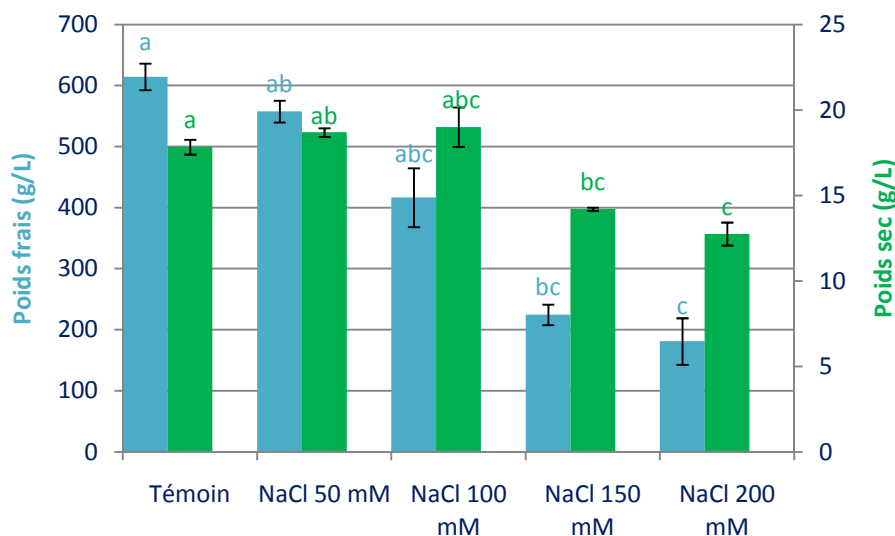


Figure 3.29 : Effet du NaCl sur la croissance des suspensions d'*H. stoechas*
(n=3 ; les données qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes)

On observe un effet important du NaCl sur la croissance des cellules d'*H. stoechas*, surtout sur le poids frais et à partir de 150 mM de NaCl (diminution de 2,7 fois). Pour le poids sec les résultats sont différents : on observe une perte de biomasse significative à partir de 150 mM par rapport au témoin. Le fait que les poids frais et sec ne suivent pas la même tendance peut s'expliquer par le fait que le NaCl engendre un stress osmotique, pouvant conduire à des mouvements d'eau importants entre les cellules et le milieu de culture suivant le principe de l'osmose. Ainsi à faible concentration le NaCl engendrerait une perte en eau des cellules, ce qui explique une diminution du poids frais et non du poids sec. Puis à partir de 150 mM, poids sec et poids frais décroissent par rapport au témoin, le stress osmotique devient certainement trop intense, conduisant à une toxicité cellulaire. Cette différence de profil entre poids sec et poids frais a déjà été observée pour des cultures d'*Oryza sativa* élicitées au NaCl (Hayatsu et al., 2014). La faible résistance au NaCl d'*H. stoechas* confirme qu'il ne s'agit pas d'une plante halophile *stricto sensu*, comme *Salicornia europaea* ou *Suaeda maritima* par exemple, dont des suspensions cellulaires se développent mieux en présence de 128 mM de NaCl qu'en absence de NaCl (von Hedenström and Breckle, 1974). Le NaCl est également indispensable pour la micropropagation de *Salicornia brachiata* (Joshi et al., 2012), *in vitro* il favorise également le développement de *Sesuvium portulacastrum* (Lokhande et al., 2011). Des cals d'*Aster tripolium* tolèrent très bien 150 mM de NaCl (Uno et al., 1996), ainsi que des suspensions de *Distichlis spicata* (Warren and Gould, 1982). La suspension d'*H. stoechas* que nous étudions semble capable de tolérer des concentrations de NaCl allant jusqu'à 100 mM, ce

qui reste plus élevé que dans les glycophytes comme le *Ginkgo biloba*, dont les suspensions tolèrent jusqu'à 25 mM de NaCl seulement, ou encore *Stevia rebaudiana* dont la croissance des suspensions est inhibée significativement à partir de 17 mM (Gupta et al., 2014). Les suspensions de *Cakile maritima*, qui est une halophyte obligatoire, voient aussi leur viabilité diminuer à partir de 200 mM de NaCl (Ben Hamed-Laouti et al., 2016).

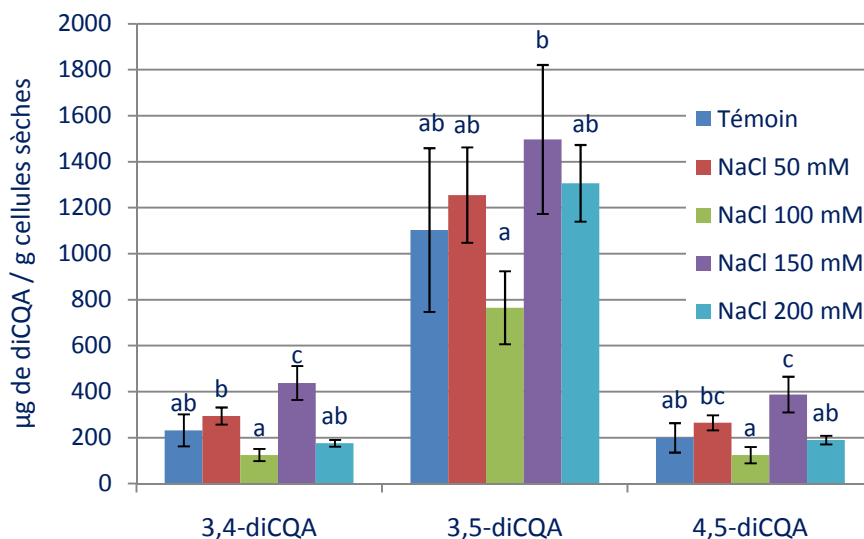


Figure 3.30 : Effet du NaCl sur la teneur en diCQA intracellulaire de suspensions d'*H. stoechas*

(n=3 ; les données qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes)

Le NaCl ne semble pas affecter de manière significative la production de diCQA par les cellules. Aucun résultat significatif n'a été obtenu et aucune tendance n'est observée, excepté peut-être pour 150 mM. La diminution de la teneur en diCQA lorsque les cellules sont traitées avec 100 mM est assez étrange, et nécessiterait des essais complémentaires pour être confirmée. La non efficacité du NaCl sur l'augmentation de la teneur en diCQA peut s'expliquer par l'absence d'impact du NaCl sur le métabolisme secondaire dans notre cas, mais aussi par une excrétion accrue du diCQA dans le milieu de culture, due au choc osmotique engendré par le NaCl. Ainsi, dans le cas de l'élicitation au NaCl, il aurait été tout particulièrement intéressant de quantifier en parallèle la teneur en diCQAs intra- et extra-cellulaire. La quantification des molécules d'intérêt dans le milieu de culture a déjà été réalisée pour d'autres espèces et d'autres éliciteurs. Par exemple, pour *Catharanthus roseus*, il a été démontré que les teneurs en vindoline intra- et extra-cellulaire sont équivalentes lorsque les suspensions sont élicitées avec 30 mg/L d'acide artémisinique, avec un facteur 5,4 de surproduction globale (Liu et al., 2014).

D'autres travaux montrent que l'élicitation par le NaCl (de 5 à 175 mM) de suspensions de *Ginkgo biloba* augmente la teneur en flavonoïdes des cellules d'un facteur 4, et permet un doublement de l'activité de la PAL (Phénylalanine Ammonia-Lyase), enzyme-clé dans la biosynthèse des acides cinnamiques, et donc des diCQAs (Chen et al., 2014). Néanmoins, dans d'autres travaux, le NaCl a conduit à une diminution de la teneur en polyphénols dans des suspensions cellulaires de *Orthosiphon stamineus*, une glycophyte, puisque la teneur en polyphénols totaux passe de 1 mg/mL à 0,6 mg/mL suite à un traitement avec 68 mM de NaCl (Lim et al., 2013).

Par la suite, il serait intéressant de mesurer la teneur en diCQAs intra- et extra-cellulaire, pour observer une éventuelle excrétion des métabolites d'intérêt dans le milieu. La gamme de concentration de NaCl devra également être restreinte afin de ne pas dépasser 100 mM, qui semble être la concentration maximale tolérée par les suspensions d'*H. stoechas* que nous avons étudiées.

2. Elicitation par le chitosan

Le chitosan est un polysaccharide formé d'unités D-glucosamine acétylée ou non, liées en $\beta 1 \rightarrow 4$. Il s'agit d'un produit issu de la déacétylation de la chitine, qui est le constituant principal de l'endosquelette des céphalopodes, de la paroi des champignons ou encore de l'exosquelette des arthropodes.

L'utilisation de cette molécule comme éliciteur est très décrite (Jeandet et al., 2014; Namdeo, 2007; Orhan et al., 2012; Sivanandhan et al., 2014). On la préfère à la chitine, qui est insoluble. Dans ces travaux, le chitosan permet d'augmenter la production de triterpènes, mais aussi de polyphénols, se comportant ainsi comme un éliciteur aspécifique. Le chitosan est utilisé à des concentrations allant jusqu'à 250 mg/L (Sivanandhan et al., 2014), mais généralement le maximum testé est de 100 mg/L (Kamalipourazad et al., 2016; Xu et al., 2016).

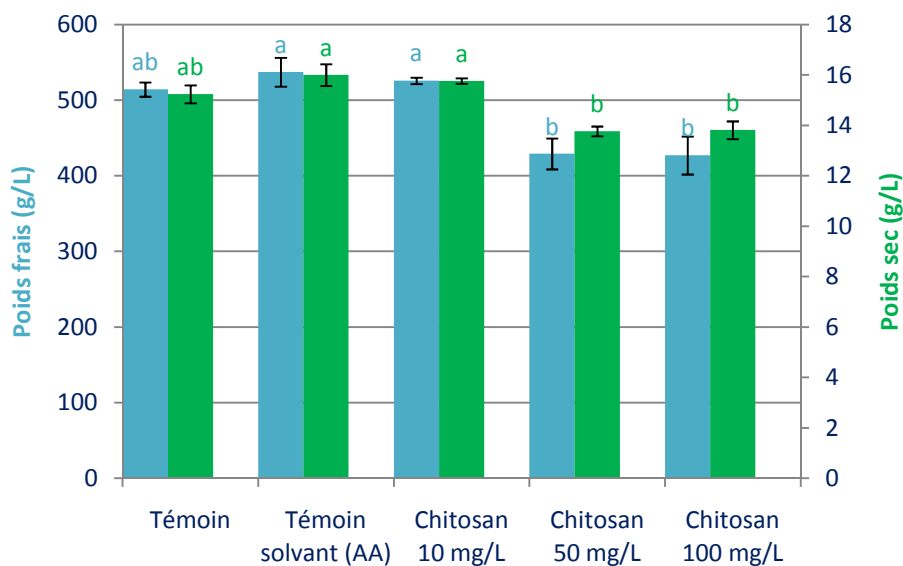


Figure 3.31 : Effet du chitosan sur la croissance des suspensions d'*H. stoechas*
(n=3 ; les données qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes)

Nos résultats (Figure 3.31) montrent que le solvant de dilution du chitosan (acide acétique - AA) n'impacte pas significativement la croissance des suspensions. D'autre part, les cellules traitées au chitosan, quelle que soit la concentration considérée, ont une croissance qui n'est pas significativement différente des cellules non traitées. Ainsi le chitosan et son solvant de dilution n'impactent pas la croissance des suspensions cellulaires aux doses testées, que ce soit sur la base de la mesure du poids sec ou du poids frais. A noter que la faible diminution de biomasse à partir de 50 mg/L de chitosan a déjà été observée dans la littérature, notamment dans les suspensions de *Cistanche deserticola* (Cheng et al., 2006).

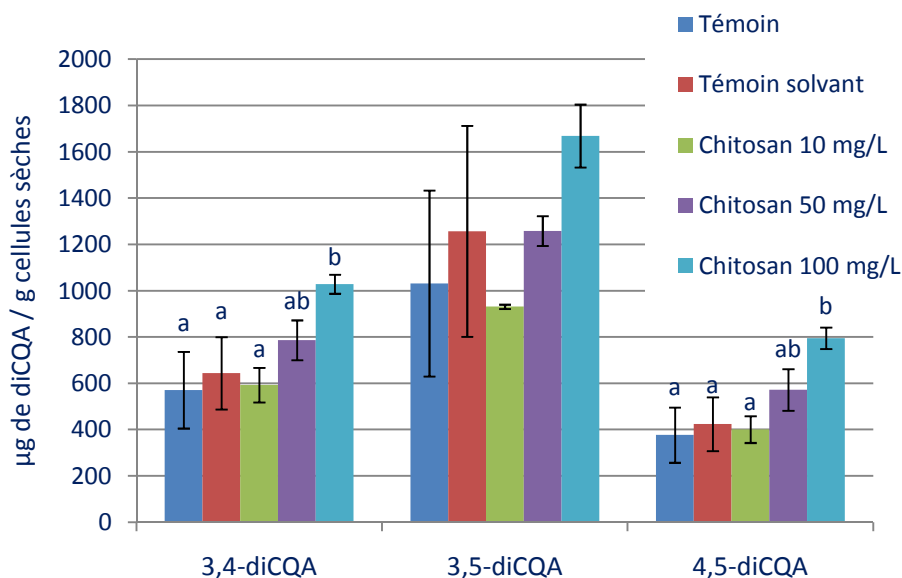


Figure 3.32 : Effet du chitosan sur la teneur en diCQA intracellulaire de suspensions d' *H. stoechas*

(n=3 ; les données qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes)

En ce qui concerne l'impact du chitosan sur la teneur en diCQA, à 100 mg/L il augmente significativement la teneur en 3,4- et 4,5-diCQA, puisque celle-ci est pratiquement doublée dans les deux cas. Néanmoins aucune différence significative n'est observée pour le 3,5-diCQA. Non pas qu'il n'y ait pas d'augmentation de la teneur en diCQA avec l'ajout de chitosan, mais les barres d'erreurs sont trop grandes, pour obtenir une significativité. Afin de diminuer cette hétérogénéité, de nouveaux essais sont en cours avec un nombre d'échantillons plus important. Néanmoins, on observe quand même une tendance à l'augmentation de concentration des 3 isomères suite à l'ajout de chitosan à 100 mg/L.

C'est la première fois qu'une augmentation de la teneur en diCQA suite à un traitement par le chitosan est décrite. Le chitosan a déjà été utilisé pour augmenter la teneur en métabolites secondaires d'autres plantes, avec une augmentation en molécules d'intérêt encore plus importante. On observe notamment un doublement de la concentration en lactones stéroïdiques dans des suspensions de *Withania somnifera* suite à un traitement avec 100 mg/L de chitosan (Sivanandhan et al., 2014). Concernant les composés phénoliques, un doublement de la teneur en hétérosides de phényléthanoïdes est observé dans des suspensions de *Cistanche deserticola* traitées avec seulement 10 mg/L de chitosan (Cheng et al., 2006) ; une multiplication par 8 de la teneur en tanins hydrolysables, qui sont des polyphénols comme les diCQA, dans des suspensions de *Phyllanthus debilis* (Malayaman et al., 2017) . Aussi la

littérature montre l'intérêt de combiner le chitosan avec d'autres éliciteurs de type abiotique comme les rayons ultraviolets par exemple (Xu et al., 2016).

Par la suite il serait intéressant d'obtenir des valeurs plus homogènes de 3,5 diCQA pour le témoin, en augmenter le nombre d'échantillon par exemple, et de tester des doses plus élevées de chitosan, jusqu'à 150 ou même 250 mg/L comme dans la littérature (Cheng et al., 2006; Sivanandhan et al., 2014).

3. Elicitation par le méthyl jasmonate

Le méthyl jasmonate (MeJa) est une phytohormone impliquée dans les réactions de défense de la plante. Il s'agit d'une molécule de signalisation qui induit la transcription de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse des métabolites secondaires (Zhao et al., 2005). Cette molécule est donc couramment utilisée pour l'élicitation de suspensions cellulaires (Orhan et al., 2012; Ramirez-Estrada et al., 2016; Yue et al., 2016).

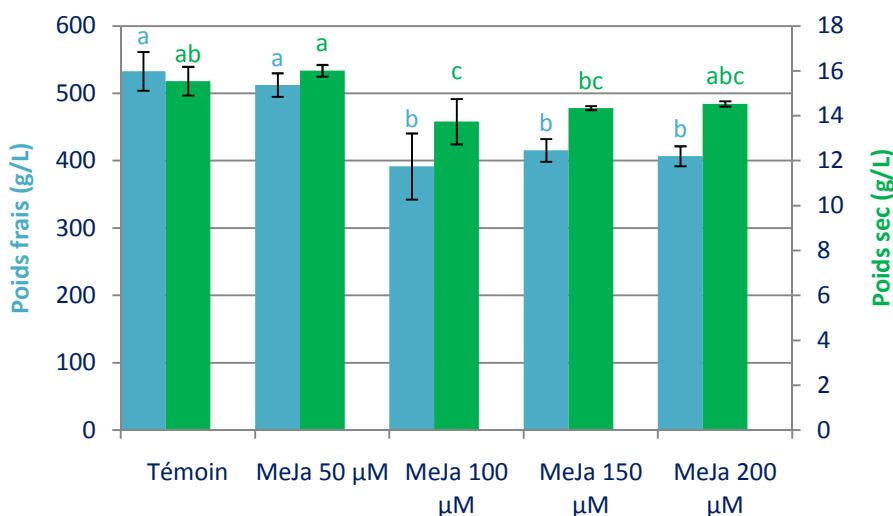


Figure 3.33 : Effet du MeJa sur la croissance des suspensions d'*H. stoechas*
(n=3 ; les données qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes)

L'effet du solvant de dilution du MeJa (EtOH) a été testé par ailleurs et n'était pas significatif. Le MeJa, à partir d'une concentration de 100 µM, impacte significativement le poids frais, mais pas significativement le poids sec, ou alors sans relation dose-effet. Nous avons jugé cette baisse de croissance acceptable.

La légère phytotoxicité du MeJa à partir de 150 µM a déjà été démontrée sur des suspensions de *Vitis vinifera* (Xu et al., 2015).

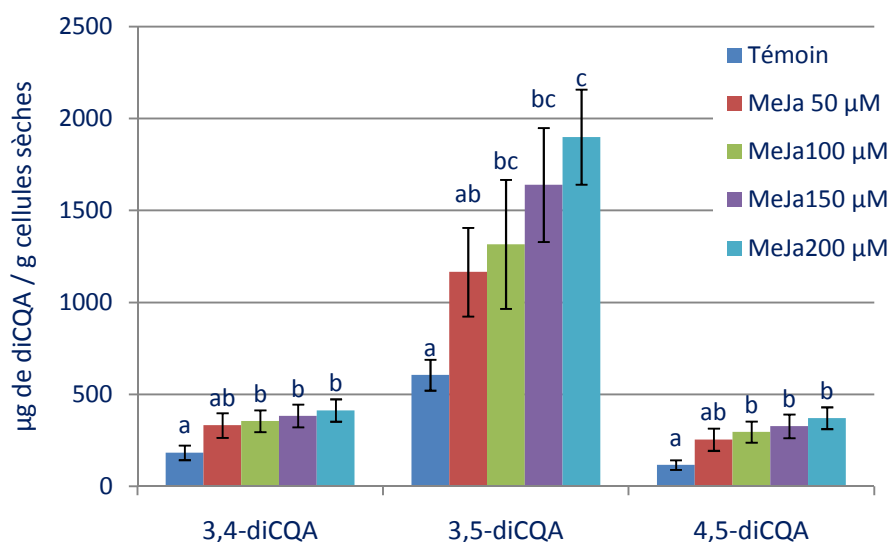


Figure 3.34 : Effet du MeJa sur la teneur en diCQA intracellulaire dans des suspensions d'*H. stoechas*

(n=3 ; les données qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes)

On observe une augmentation de la concentration en 3,4-; 3,5- et 4,5-diCQA lorsque les suspensions sont élicitées avec du MeJa. Pour les 3 isomères l'augmentation est significative à partir de 100 µM de MeJa. Avec un traitement à 200 µM de MeJa, la teneur en 3,5- et 4,5-diCQAs dans les cellules est triplée et doublée pour le 3,4-diCQA. Pour le 3,5-diCQA, la relation dose-effet est très marquée. Le MeJa est donc un éliciteur très prometteur, que nous sélectionnerons pour des études plus approfondies.

Dans des suspensions de *Vitis vinifera* la synthèse de stilbènes d'intérêt (picéine, resvératrol, viniférine) augmente de 2,5 fois à partir de concentrations en MeJa de 100 µM (Xu et al., 2015). Les auteurs ont testé des concentrations plus élevées en MeJa (150 et 200 µM), mais les résultats obtenus sont les mêmes qu'avec 100 µM, ce qui signifie que la synthèse maximale de stilbènes est atteinte lorsque les suspensions de *V. vinifera* sont traitées avec 100 µM. Aussi à cette concentration, le MeJa permet un doublement de la production d'acide rosmarinique, dérivé d'acide caféique, dans des suspensions de *Satureja khuzistanica* (Khojasteh et al., 2016).

Par la suite, nous avons testé l'effet du MeJa à 400 µM, concentration déjà utilisée dans la littérature (Guimarães et al., 2013). Cette concentration n'a pas été plus efficace que 200 µM pour augmenter la teneur en diCQAs, de plus elle a montré une légère phytotoxicité. Des doses intermédiaires comme 250, 300 et 350 µM pourraient être testées pour confirmer la perte de la relation dose-effet au-delà de 200 µM.

4. Elicitation par l'acide salicylique

Comme le MeJa, l'acide salicylique (SA) est une phytohormone impliquée dans les mécanismes de défense de la plante (Zhao et al., 2005). Cette molécule est couramment utilisée comme éliciteur (Dias et al., 2016; Ramirez-Estrada et al., 2016).

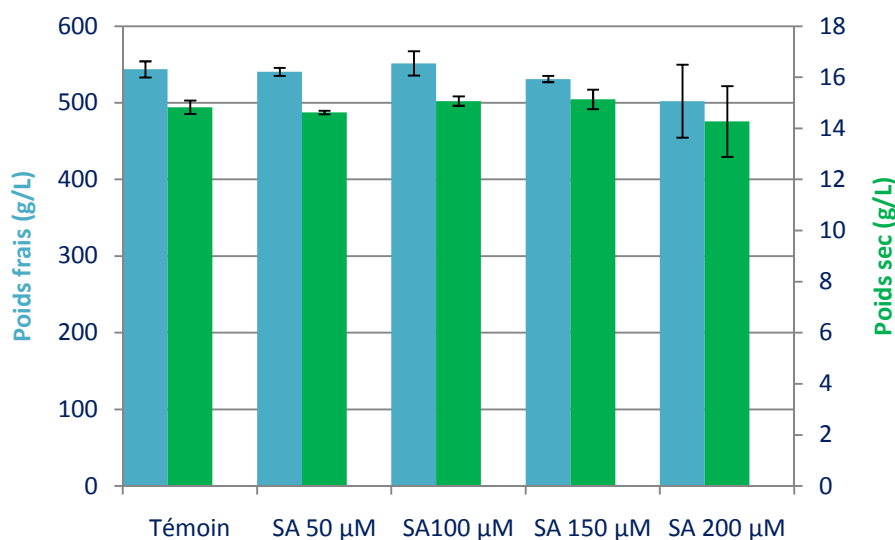


Figure 3.36 : Effet du SA sur la croissance des suspensions d'*H. stoechas*
(n=3 ; les données qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes)

L'effet du solvant de dilution du SA (EtOH) a été testé par ailleurs et n'était pas significatif. Le SA n'impacte pas significativement sur la croissance des cellules.

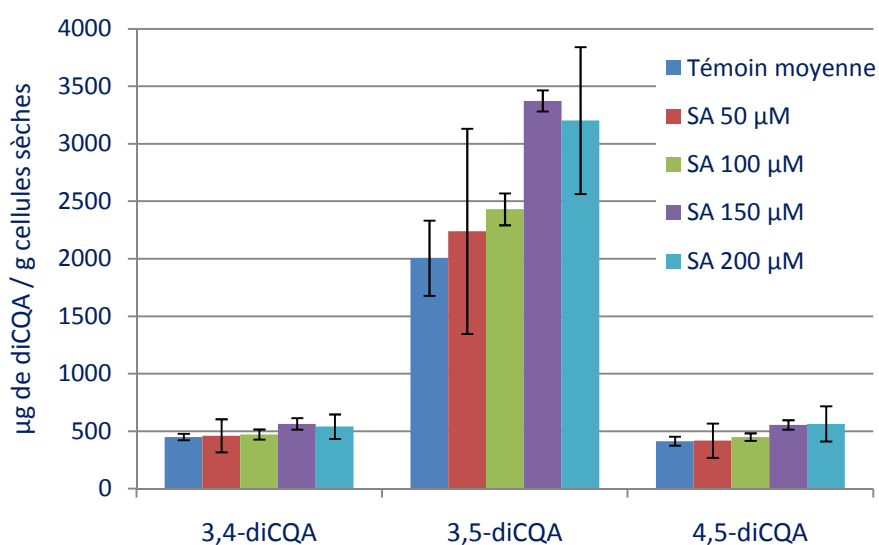


Figure 3.37 : Effet du SA sur la teneur en diCQA intracellulaire
(n=3 ; les données qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes)

Les écart-types calculés pour les valeurs obtenues sont très importants. Ainsi, aucun résultat n'est apparu comme significativement différent du contrôle. Cependant, on observe une tendance à l'augmentation de la production de diCQA, surtout pour le 3,5-diCQA, lorsque les suspensions sont traitées avec du SA. La concentration de SA la plus efficace semble être 150 μM ; elle permet de multiplier par 1,6 la teneur en 3,5-diCQA dans les cellules. Les résultats obtenus restent cependant moins intéressants que ceux obtenus avec le MeJa.

Les résultats obtenus pour la production de molécules bioactives par des suspensions de *Vitis vinifera* sont similaires : on observe une augmentation, mais inférieure à un facteur deux, de la teneur en stilbènes lorsque les cellules sont traitées avec 100 μM de SA (Xu et al., 2015). De plus les auteurs observent une augmentation de la teneur en molécules d'intérêt en traitant avec 50 μM de SA, mais un plateau est atteint à partir de 100 μM , c'est-à-dire qu'avec 150 ou 200 μM , la teneur en stilbénoides n'augmente plus. Ce phénomène de plateau est aussi décrit à partir de 50 μM de SA pour la production de naphthodianthrones chez *Hypericum perforatum* (Gadzovska et al., 2013). Dans cette étude, la présence d'un plateau pour les composés phénoliques (flavonoïdes et anthocyanes) est moins franche. Les auteurs ont aussi montré une augmentation de l'expression du gène codant pour la PAL en présence de SA, jusqu'à 7 fois lorsque les suspensions sont traitées avec 250 μM de SA.

Une augmentation de l'activité de la PAL devrait aboutir à une augmentation de la teneur en acide caféique ou en dérivé d'acide caféique (cf. voie de biosynthèse § II.A.5), ce qui confirme que le SA est un éliciteur intéressant dans notre cas. Les tests devront être reconduits pour tenter d'obtenir des résultats moins variables.

5. Elicitation par la coronatine

La coronatine est une toxine bactérienne qui induit les réactions de défense chez les plantes (Weiler et al., 1994). C'est pourquoi cette molécule peut être utilisée comme éliciteur (Almagro et al., 2015). Elle a été testée à 0,5 ; 1 ; 2 et 4 μM .

A ces doses la coronatine n'a montré aucun effet sur la croissance, néanmoins aucun résultat intéressant n'a été observé sur la teneur intracellulaire en diCQA, alors qu'elle permettait d'augmenter la teneur en trans-resvératrol à partir d'1 μM dans des suspensions de *Vitis*

vinifera (Almagro et al., 2015). Néanmoins ces auteurs ont démontré qu'elle avait un effet beaucoup plus important (jusqu'à 16 fois) lorsqu'elle était combinée à de la cyclodextrine.

Il serait donc intéressant de tester la coronatine en combinaison à des cyclodextrines, mais aussi de la tester seule à des concentrations plus élevées.

6. Elicitations combinées

Des études ont déjà montré que la combinaison de différents éliciteurs pouvait augmenter considérablement la synthèse en métabolites secondaires, que ce soit dans des suspensions cellulaires ou dans des cellules différenciées (Bae et al., 2006; Johnson et al., 1991; Xu et al., 2015, 2016). En effet, les éliciteurs ne ciblant pas forcément les mêmes mécanismes, comme dans le cas du MeJa et du chitosan, ils peuvent alors agir en synergie, ce qui serait intéressant pour amplifier l'effet stimulant sur la production des molécules recherchées.

Nous avons choisi de tester la combinaison de trois éliciteurs testés précédemment en traitements simples: MeJa, SA et chitosan, d'abord deux à deux, puis les trois ensemble. Pour chaque expérience, nous avons en parallèle contrôlé l'effet des éliciteurs seuls.

a. Elicitation méthyl jasmonate / chitosan

Le MeJa et le chitosan sont des molécules de nature différente (cf. Chap.1, § III.B.2.b). Ils ont donné des résultats prometteurs lors des traitements simples, c'est pourquoi nous avons choisi la combinaison de ces deux éliciteurs dans l'objectif d'augmenter de manière synergique la production de diCQAs par les cellules. Le témoin solvant est composé d'un mélange d'éthanol et d'acide acétique qui sont les deux solvants utilisés pour solubiliser respectivement le MeJa et le chitosan

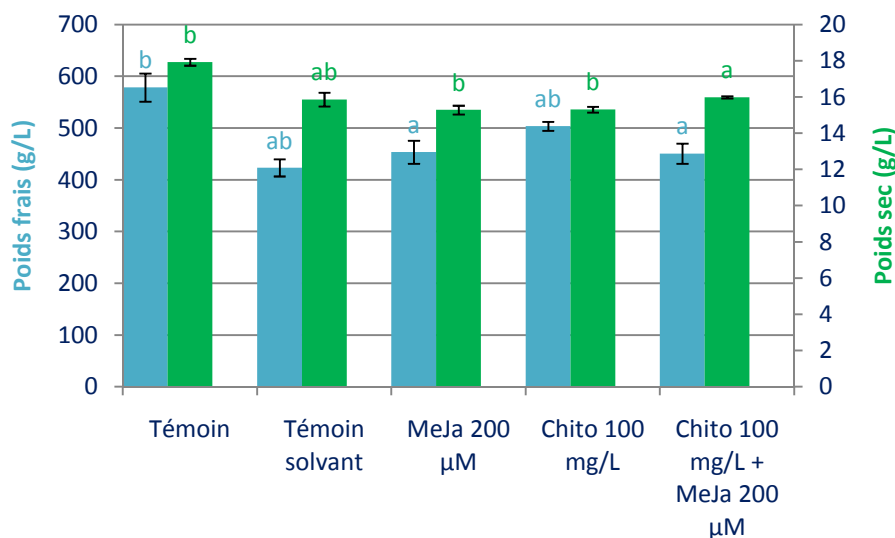


Figure 3.38 : Effet du MeJa et du chitosan, seuls ou combinés, sur la croissance des suspensions d'*H. stoechas*
(n=3 ; les données qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes)

Seuls ou combinés, le MeJa et le chitosan n'impactent pas la croissance des cellules. Ainsi un mélange avec des concentrations plus importantes pourrait être testé.

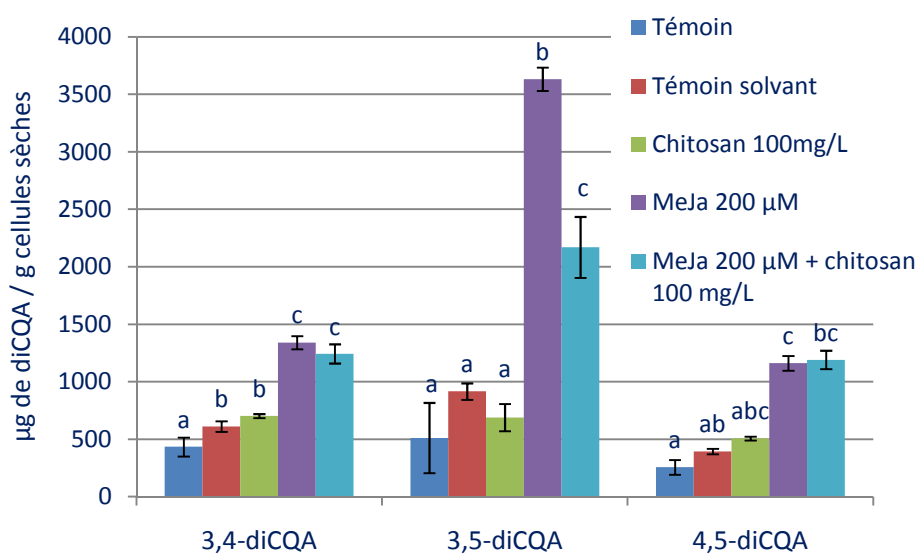


Figure 3.39 : Effet du chitosan et du MeJa, seuls ou combinés, sur la teneur en diCQA intracellulaire
(n=3 ; les données qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes)

Les résultats exposés dans la figure 3.39 montrent que l'ajout de chitosan en plus du MeJa dans les suspensions cellulaires n'augmente pas la teneur en diCQA par rapport à un traitement par du MeJa seul. On observe même une diminution de la teneur en 3,5-diCQA, ce

qui n'est pas le cas pour les 3,4- et 4,5-diCQA, alors que dans les autres traitements testés ces 3 isomères réagissent de la même façon aux traitements éliciteurs.

b. Elicitation méthyl jasmonate / acide salicylique

Le méthyl jasmonate et l'acide salicylique sont tous les deux des phytohormones impliquées dans les mécanismes de défense. Nous avons cherché à voir si ces deux molécules pouvaient avoir un effet synergique.

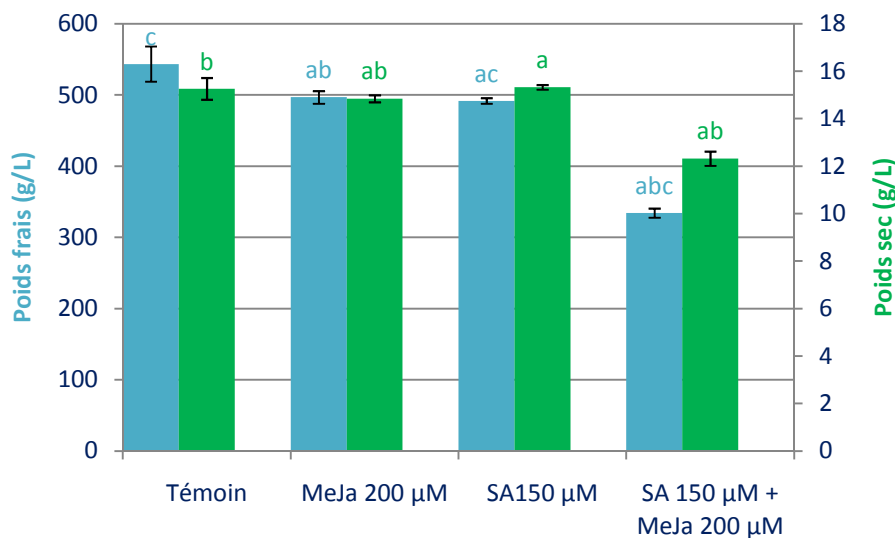


Figure 3.40 : Effet du SA et du MeJa, seuls ou combinés, sur la croissance des suspensions d'*H. stoechas*

(n=3 ; les données qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes)

Séparément le MeJa et le SA n'impactent pas la croissance des cellules. Néanmoins, lorsqu'ils sont combinés, on observe une diminution non négligeable de la croissance mais pas significativement différente du témoin solvant.

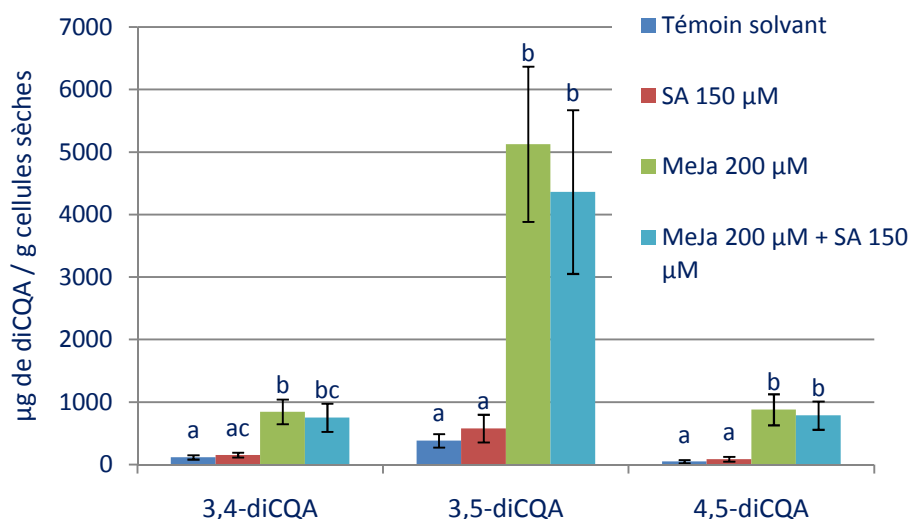


Figure 3.41 : Effet du SA et du MeJa, seuls ou combinés, sur la teneur en diCQA intracellulaire

(n=3 ; les données qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes)

Les résultats précédents sont confirmés : la teneur totale en diCQAs est multipliée par 12 en présence de MeJa et par 1,5 en présence de SA. Néanmoins, la combinaison de SA et de MeJa ne permet pas de dépasser la teneur en diCQA plus qu'un traitement au MeJa seul.

c. Elicitation chitosan / acide salicylique

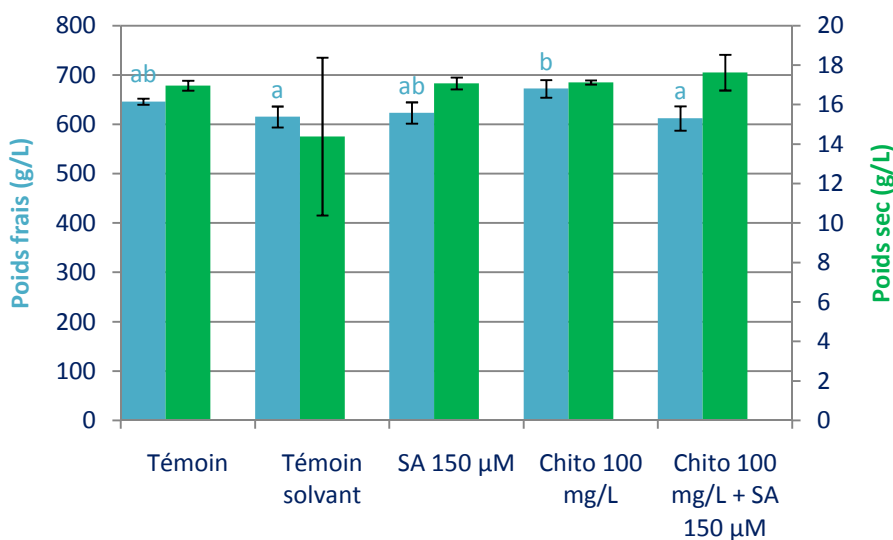


Figure 3.42 : Effet du SA et du chitosan, seuls ou combinés, sur la croissance des suspensions d'*H. stoechas*

(n=3 ; les données qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes)

Le témoin solvant est composé d'un mélange d'éthanol et acide acétique qui sont les deux solvants utilisés pour solubiliser respectivement le SA et le chitosan. Aucun des traitements ne provoque un effet sur la croissance des cellules, ni-même le traitement combiné SA et chitosan. Aucune différence significative n'a été observée pour les poids secs.

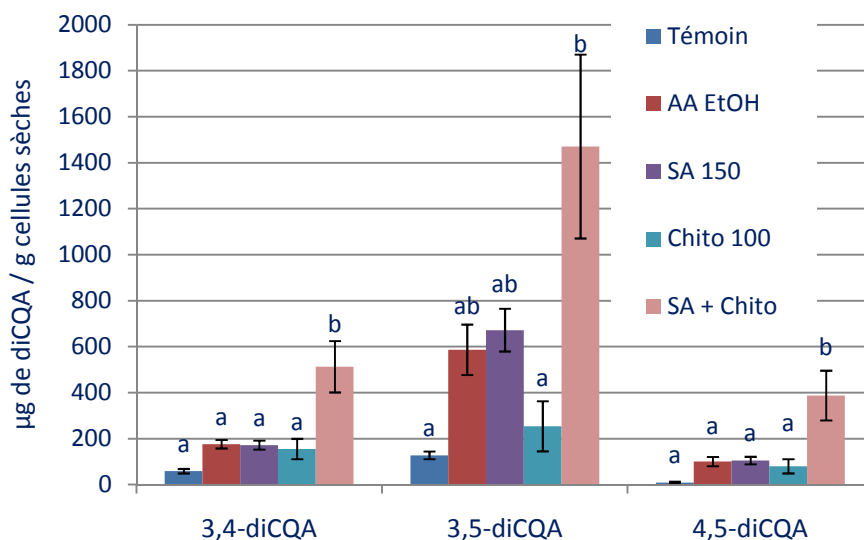


Figure 3.43 : Effet du SA et du chitosan, seuls ou combinés, sur la teneur en diCQA intracellulaire

(n=3 ; des données qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes)

Le mélange de solvant éthanol-acide acétique semble avoir un effet éliciteur à lui seul sur la production de diCQAs, ce qui n'était pas le cas lorsque les solvants étaient testés de façon séparées, comme cela a déjà été observé lors de la combinaison MeJa/chitosan. Lorsque les éliciteurs sont utilisés de façon séparée, on observe des teneurs de 671 et 253 µg de 3,5-diCQA / g de cellule, pour le SA et le chitosan respectivement. Lorsque les deux sont combinés, on obtient 1470 µg de 3,5-diCQA / g de cellule, soit 2,2 fois plus qu'avec le chitosan seul et 5,8 fois plus que le SA seul. La teneur totale en diCQAs lorsque les deux éliciteurs sont appliqués (2370 µg/g) est supérieure à la somme des teneurs en diCQA avec des traitements indépendants (1420 µg/g), on peut donc affirmer qu'il existe une synergie. Il serait intéressant de comparer, au sein d'une même manipulation, cette double élicitation au SA et chitosan à notre meilleur éliciteur qui est le MeJa 200 µM. De très grandes variations ont été observées entre les manipulations, il n'est pas donc possible de faire des comparaisons inter-expériences, mais seulement intra-expériences.

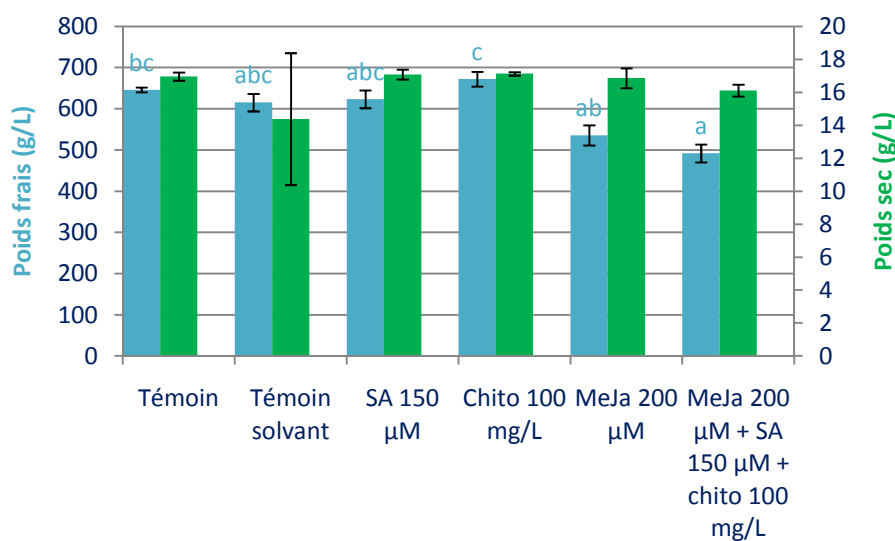
d. Elicitation MeJa / SA / chitosan

Figure 3.44 : Effet du MeJa, du SA et du chitosan, seuls ou combinés, sur la croissance des suspensions d'*H. stoechas*

(n=3 ; les données qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes)

Le témoin solvant est composé d'un mélange d'éthanol et acide acétique qui sont les deux solvants utilisés pour solubiliser respectivement le MeJa, le SA et le chitosan. Globalement les traitements n'impactent pas la croissance des cellules, excepté peut-être le traitement triple pour laquelle le poids frais est significativement différent du témoin, mais pas du témoin solvant. Pour les poids secs, aucune différence significative n'a été observée.

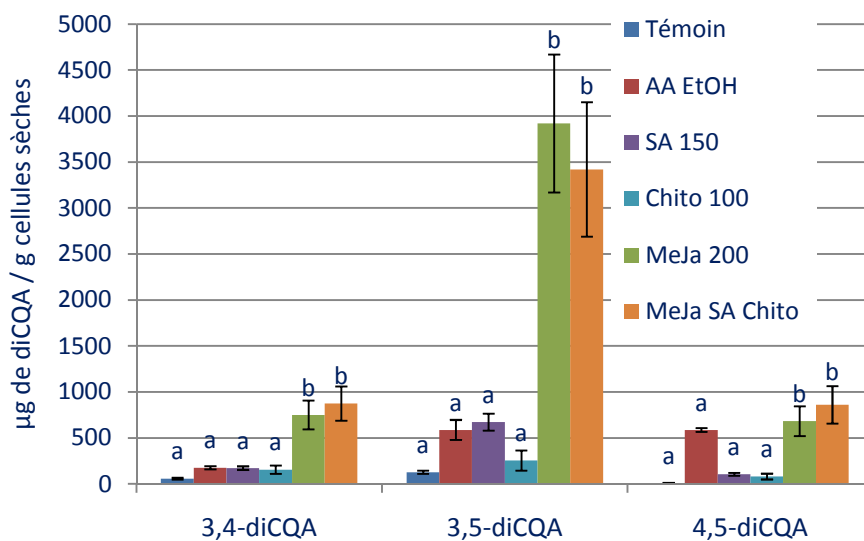


Figure 3.45 : Effet du SA, du chitosan et du MeJa, seuls ou combinés, sur la teneur en diCQA intracellulaire

(n=3 ; les données qui partagent des lettres ne sont pas significativement différentes)

Les résultats obtenus sont cohérents avec ce que l'on a pu voir lors des élicitations doubles, l'élicitation triple permet d'augmenter considérablement la teneur en diCQA, sans pour autant égaler la teneur obtenue avec le MeJa 200 μ M.

D. Conclusion des tests d'élicitation d'*H. stoechas*

Une très grande **hétérogénéité** des concentrations en **diCQAs** a été observée pour tous les traitements éliciteurs, ce qui n'est pas le cas pour le suivi de croissance pour lequel les résultats obtenus sont **répétables**. Ce manque d'hétérogénéité peut-être inhérent au matériel végétal. Pour tenter de diminuer les variations, des tests sur un plus grand nombre d'échantillons seront conduits. Nous avons aussi observé que globalement les 3 isomères répondent de façon identique aux éliciteurs, excepté pour le traitement mixte MeJa et chitosan.

Cinq éliciteurs ont été testés : le **NaCl**, le **chitosan**, le **MeJa**, le **SA** et la **coronatine**. Lorsqu'ils sont utilisés en traitement simple, le MeJa à 200 μ M est le plus efficace puisqu'il permet **d'augmenter jusqu'à 12 fois la teneur en 3,5-diCQA** par rapport à des cellules non traitées. Le NaCl s'est avéré phytotoxique et pas efficace. La coronatine n'a pas provoqué d'effet, que ce soit sur la croissance ou la teneur en diCQA. Le SA et le chitosan permettent d'augmenter la teneur en diCQA. La combinaison des éliciteurs ne permet pas de dépasser les résultats obtenus avec le MeJa 200 μ M seul, néanmoins la combinaison SA et chitosan a montré un effet synergique.

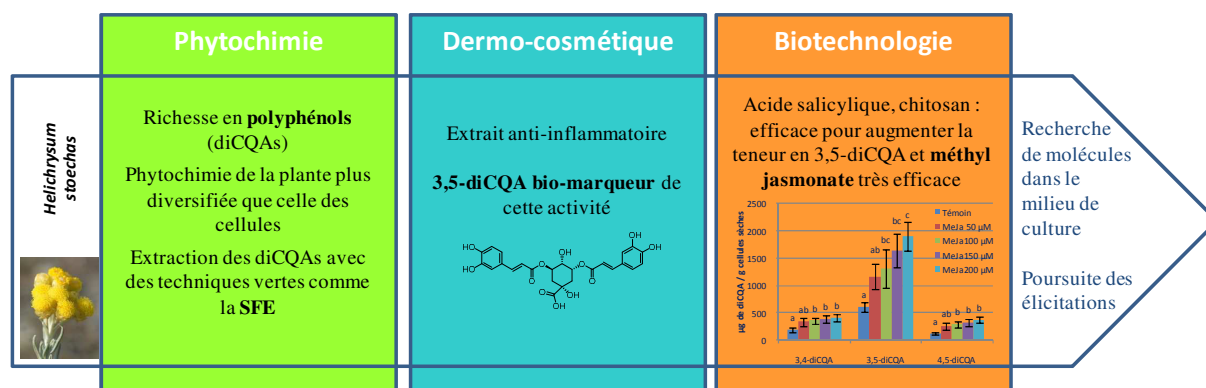
Par la suite, il sera intéressant de conserver les trois meilleurs éliciteurs (MeJa, SA, chitosan) et **d'augmenter le nombre de répliquats** pour essayer de faire diminuer l'hétérogénéité de nos résultats, particulièrement importante en ce qui concerne le dosage des diCQAs. Une quantification des diCQAs extracellulaires serait également nécessaire. L'impact sur d'autres molécules pourrait également être étudié, notamment pour étudier l'influence des traitements éliciteurs sur la diversité moléculaire des suspensions d'*H. stoechas*.

V. Bilan & perspectives de l'étude d'*H. stoechas*

La comparaison des profils phytochimiques des extraits de cellules différenciées et de plante d' *H. stoechas* met en évidence des spécificités et des similarités. En effet, dans les deux cas, les composés majoritaires sont des **polyphénols** et plus particulièrement des **acides phénoliques**, avec comme molécule majoritaire le **3,5-diCQA**. Malgré sa richesse en polyphénols, l'extrait de cellules n'est pas antioxydant, contrairement à l'extrait de plante. Par contre ils possèdent tous les deux un **effet inhibiteur sur la sécrétion de l'IL1- β** , qui est une cytokine pro-inflammatoire. Cette activité semble pouvoir être attribuée, au moins en partie, à la teneur en 3,5-diCQA qui inhibe très fortement la sécrétion de cette même cytokine. Ainsi, nous avons cherché à faire surproduire ce **bio-marqueur** par les suspensions cellulaires en les élicitant. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le **MeJa à 200 μ M**, il permet de multiplier jusqu'à **12 fois** la teneur en diCQAs intracellulaires.

Par la suite il serait nécessaire de tester l'activité biologique des cellules élicitées pour voir si l'augmentation de la teneur en diCQA permet d'augmenter l'activité biologique. Il serait également intéressant d'utiliser une technique d'extraction plus éco-responsable, comme l'extraction au **CO₂ supercritique** qui, lorsqu'il est additionné d'un co-solvant hydro-alcoolique, est capable d'extraire les diCQAs qui sont des molécules polaires.

La combinaison de ces trois approches : phytochimique, biologique et biotechnologique, nous a permis d'obtenir un **extrait anti-inflammatoire**, issu de **technologies respectueuses de l'environnement**, et pouvant être proposé comme **actif dermo-cosmétique innovant**.



Conclusion générale

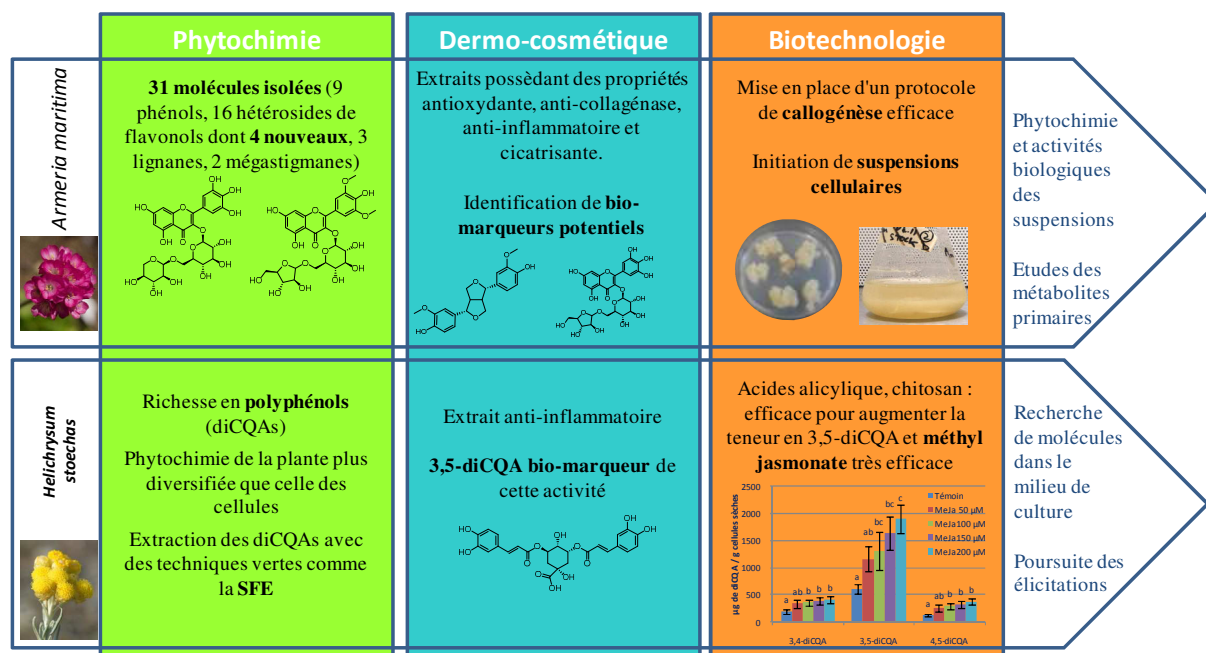
Ce travail de thèse a été réalisé en collaboration avec la société **BiotechMarine**, spécialisée dans les actifs dermo-cosmétiques issus de plantes du littoral ou d'algues. Dans ce cadre, notre étude a porté sur deux halophytes : *Armeria maritima* et *Helichrysum stoechas*.

Les halophytes sont des plantes particulièrement riches en métabolites d'intérêt comme les polyphénols, ce qui a été confirmé par les investigations phytochimiques réalisées sur ces deux espèces. *A. maritima* étant une espèce très peu étudiée, nous avons mis en œuvre une approche phytochimique classique de fractionnement qui a permis l'isolement pour la première fois dans le genre *Armeria* de **31 molécules** (9 phénols, 17 hétérosides de flavonols, 3 lignanes, 2 mégastigmanes) dont **4 nouveaux diglycosides de flavonol**. *Helichrysum stoechas* étant davantage décrite dans la littérature, l'étude phytochimique a majoritairement porté sur des suspensions cellulaires en tant que matière première alternative, et a été réalisée par dérégulation. La présence de **diCQA** (acides dicaféoylquiniques), composé majoritaire, a pu être confirmée par comparaison avec des standards.

Des extraits d'*A. maritima* ont montré des propriétés **anti-oxydante**, **anti-collagénase**, **anti-inflammatoire** et **cicatrisante**. Dans certains cas, ces activités ont pu être corrélées à la présence de molécules particulières, comme par exemple le **pinorésinol**, qui inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. La **myricétine-3-O-vicianoside**, molécule nouvellement décrite augmente *in vitro* la migration cellulaire sur un modèle expérimental reproduisant une blessure de l'épiderme, et réduit également la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Les extraits d'*H. stoechas* ont montré un potentiel **anti-inflammatoire** notable qui semble être porté en partie par le 3,5-diCQA. Ainsi, bien qu'une stratégie de bio-guidage à proprement parler n'ait pas été adoptée, nous avons obtenu des résultats biologiques novateurs ouvrant la voie à la valorisation de ces deux halophytes dans le secteur dermo-cosmétique.

Un criblage d'éliciteurs a été réalisé en vue d'augmenter la teneur en diCQAs dans les suspensions cellulaires d'*H. stoechas*. Nous avons démontré l'intérêt du chitosan, de l'acide salicylique et plus particulièrement celui du **méthyl jasmonate**, qui permet d'augmenter jusqu'à 12 fois la teneur en diCQAs par rapport au témoin. En parallèle, la mise en place d'un protocole de callogénèse efficace nous a permis d'obtenir plusieurs lignées de cals d'*A. maritima*, qui ont été utilisés pour initier des **suspensions cellulaires**. Ces suspensions

pourront par la suite faire l'objet d'une étude similaire à celle réalisée sur *H. stoechas* (déréplication, nouveau criblage biologique, élicitation).



Ce travail nous a permis d'étudier deux espèces d'halophytes sous trois **angles complémentaires** : **phytochimique, biologique et biotechnologique**. Comme les travaux préliminaires à notre étude en étaient à des stades différents pour *A. maritima* et *H. stoechas*, cela nous a permis d'aborder toutes les étapes de cette **stratégie interdisciplinaire**, de l'établissement de cultures cellulaires à l'optimisation de la bio-production, en passant par des études phytochimiques classiques ou plus modernes, ainsi que l'évaluation biologique. Dans les deux cas, nous avons démontré une phytochimie riche et diversifiée, pouvant être corrélée à des activités sur des cibles biologiques pertinentes dans un contexte de valorisation dermo-cosmétique, telles que l'inflammation, le vieillissement cutané ou encore la cicatrisation. Nous avons aussi démontré le fort potentiel de production de molécules d'intérêt par voie biotechnologique.

Un travail de réflexion devrait être conduit afin d'imaginer des **actifs dermo-cosmétiques** non seulement innovants, mais également **plus respectueux de l'environnement**. C'est dans ce cadre que nous avons voulu démontrer le potentiel des techniques d'extraction modernes comme l'extraction par fluide supercritique. Dans un objectif de valorisation industrielle, les solvants organiques devront aussi laisser la place à des solvants "verts", qui seront judicieusement choisis pour obtenir des extraits enrichis en molécules bioactives.

Conclusion générale

Ce travail de thèse a conduit à l'obtention de nombreux résultats scientifiques suggérant plusieurs pistes de valorisation industrielle en dermo-cosmétique. Il répond ainsi aux critères de **recherche fondamentale et d'innovation industrielle** fixés initialement. Mener à bien un **travail pluridisciplinaire** m'a amenée à **collaborer** avec les **experts** de chacun des domaines explorés, ce qui m'a permis de développer des compétences transversales, et qui a constitué une expérience très enrichissante, tant humainement que scientifiquement.

Chapitre 4 : Partie expérimentale

I. Matériel végétal

A. *Armeria maritima*

1. Matériel végétal utilisé pour l'étude phytochimique

Quatre kilos de parties aériennes en fleurs, séchées, d'*A. maritima* (Mill.) Willd. ont été obtenues par BiotechMarine auprès de la société Setalg (Pleubian, France) en octobre 2014. Elles ont été broyées pour obtenir une poudre à l'aide d'un broyeur ultra-centrifuge ZM 200 Retsch.

2. Matériel végétal utilisé pour la culture in vitro (CIV)

Pour la CIV, trois types d'explants ont été utilisés:

- Des graines d'*A. maritima splendens* (conservées à 4 °C) de Sluis Garden (www.sluisgarden.com) (Enkhuizen, Pays-Bas)
- Des explants de plantules axéniques obtenues à partir de ces graines (germination effectuée au laboratoire, (cf. § VII.A.2))
- Des feuilles de plants d'*A. maritima splendens* obtenues auprès de la société « jardin du pic-vert » (www.jardindupivert.com) (Orchies, France).

B. *Helichrysum stoechas*

1. Matériel végétal utilisé pour les criblages phytochimique et biologique

Des parties aériennes fraîches d'*H. stoechas*, collectées dans le golfe du Morbihan et fournies par le conservatoire botanique de Brest en juin 2015, ont été lyophilisées.

2. Suspensions cellulaires

Les suspensions cellulaires utilisées pour l'analyse phytochimique et l'élicitation ont été fournies par BiotechMarine (Erwan Le Gélébart - chef de projet en biotechnologies algales) sous deux formes : lyophilisées (réception au printemps 2014) et vivantes (en conditions

stériles) (réception en automne 2015). Les suspensions avaient été cultivées dans des erlenmeyers de 300 mL à 25 °C et éclairées à 5000 lux 24h/24, avec une agitation de 100 rpm. (La composition du milieu de culture est détaillée dans la partie culture *in vitro*).

II. Analyse phytochimique : procédures générales

A. Solvants et réactifs

Tous les solvants utilisés pour les extractions provenaient de chez Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). Ceux utilisés pour l'extraction étaient de qualité technique, et ceux utilisés en chromatographie étaient de qualité HPLC. L'eau utilisée pour les extractions était de l'eau déminéralisée et l'eau utilisée en HPLC de l'eau milli-Q.

B. Techniques d'extraction

1. *Armeria maritima*

Un extrait éthanol/eau (80:20; v/v) des parties aériennes d'*A. maritima* (ratio : 1 g de plante dans 16 mL) a été réalisé par macération, sous agitation à température ambiante pendant 1h30. Pour ce faire, nous avons utilisé un ultra-turrax IKA équipé d'une tige à hélice 4 ailettes. L'extrait ainsi obtenu a été filtré sur papier dans un entonnoir Büchner. Le marc récupéré a été ré-extrait deux fois de la même façon. Les extraits ont ensuite été rassemblés puis évaporés à sec au rotavapor.

2. *Helichrysum stoechas*

a. Extraction assistée par ultra-sons

Des extraits éthanol/eau (80/20; v/v) ou méthanoliques ont été réalisés dans un bain à ultra-sons Fischer Scientific (Illkirch, France).

Pour les extraits utilisés pour la dérégulation (plantes et cellules non élicitées), ceux-ci ont été réalisés avec un ratio de 1g dans 25 mL de solvant. Le mélange a été placé 15 min aux ultra-

sons puis filtré sur papier dans un entonnoir Büchner. Le marc est ré-extrait deux fois de la même façon, puis les 3 extraits sont rassemblés et évaporés à sec au rotavapor à 40 °C.

Pour les extraits de cellules élicitées, les cellules ont été extraites dans du méthanol pendant 25 min aux ultra-sons, avec le ratio 1g dans 25 mL de solvant, puis centrifugées 15 min à 9000 rpm. Le surnageant a été récupéré, une partie est injectée en HPLC, l'autre est séchée sous azote à l'aide d'un système Biotage puis lyophilisée et conservée à -20 °C.

Les techniques d'extractions présentées ci-dessous ont été utilisées au sein de l'ICOA d'Orléans, en collaboration avec les Dr Destandau et Lesellier.

b. Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

Le four à micro-ondes utilisé est un modèle MycroSYNTH (Milestone, Shelton, USA) piloté par une console 'easyCONTROL'. 200 mg de poudre de plante ont été placés dans un réacteur en verre de 12 mL contenant 5 mL du mélange éthanol/eau (80:20 ; v/v). Un barreau aimanté est placé dans le réacteur pour assurer une bonne homogénéisation entre le matériel végétal et le solvant. La température maximale autorisée pour cet appareil est de 180 °C. Les mélanges sont ensuite centrifugés et le surnageant récupéré puis évaporé à sec sous flux d'azote.

Plusieurs paramètres ont été étudiés: la durée d'extraction (15, 30, 45, 60 et 120 s), la puissance (200, 500 et 1000 W) et le nombre de cycles (1, 2 ou 3). Dans le cas où plusieurs cycles d'extraction ont été réalisés, le réacteur a été placé dans un bac de glace entre chaque cycle pour un retour à température ambiante, ce qui permet d'éviter de dépasser les 180 °C.

Les conditions initiales utilisées lors de l'optimisation des différents paramètres étaient : 3 cycles de 30 s à 1000 W sans renouvellement de solvant à chaque cycle, tous les paramètres étant par la suite optimisés indépendamment.

c. Extraction accélérée par solvant (ASE)

L'appareil qui a été utilisé est un ASE 150 Dionex (Thermo-Fisher) équipé d'une cellule d'extraction de 5 mL. Celle-ci a été remplie avec 200 mg de poudre de plante préalablement mélangée avec de la terre de diatomée (Sigma). Le solvant d'extraction était un mélange éthanol/eau (80/20; v/v), et la pression fixée à 100 bars. Les extraits ont été évaporés à sec sous flux d'azote.

Plusieurs paramètres ont été étudiés : la durée de contact (5, 10, 20, 30 min), la température (40, 65 et 100 °C), le volume de rinçage (30, 60 et 100%, exprimé par rapport au volume total de la cellule) et le nombre de cycles (1 ou 3).

Les conditions initiales utilisées lors de l'optimisation étaient : 3 cycles de 10 min à 40 °C avec un volume de rinçage de 60%, tous les paramètres ont par la suite été optimisés indépendamment.

d. Extraction par fluide supercritique (SFE)

L'extracteur supercritique utilisé est un MV-10 ASFE (Waters, Guyancourt, France). Cet extracteur est équipé de 10 cellules d'extraction de 5 mL et de 12 flacons de collecte. La cellule a été remplie de la façon suivante : coton, sable de Fontainebleau (Sigma), 500 mg de poudre de plante, sable de Fontainebleau et coton.

Le CO₂ était à débit constant (5 mL/min) et la pression de sortie était maintenue à 150 bars. La température peut être modifiée (30 ou 60 °C dans notre cas) ainsi que la durée d'extraction. Un co-solvant dont la nature peut varier (éthanol, éthanol/eau 80/20, v/v) a pu être ajouté au CO₂ et ce dans différentes proportions (5, 10 et 15%).

C. Méthodes chromatographiques

1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les plaques utilisées pour les CCM sont des feuilles d'aluminium TLC Silica gel 60 F254 (Merck, Molsheim, France). La révélation s'est faite par observation à la lumière visible puis sous UV à 254 et 366 nm. Les plaques ont ensuite été révélées par pulvérisation de la vanilline sulfurique (vanilline 10 g/L et acide sulfurique 20 mL/L dans de l'éthanol) dans le cas d'une étude non ciblée, puis chauffées, soit au Neu-PEG (Naturstoffreagenz puis polyéthylène glycol) et observées à 366 nm (Wagner and Bladt, 1996), dans le cas d'une étude des polyphénols.

2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC-DAD)

Une colonne Kinetex C18 (2,6 μm , 100 \AA , 100 mm x 3 mm) Phenomenex a été utilisée. L'éluant était constitué de deux phases : A - eau + 0,05% HCOOH et B - ACN + 0,05% HCOOH, à un débit de 0,6 mL/min. Le volume d'injection variait en fonction de la concentration des échantillons (de 0,5 μL à 1,5 μL).

Toutes les analyses (exceptées celles réalisées pour l'analyse des extraits obtenus par SFE, ASE et MO) ont été réalisées à l'aide d'une HPLC Agilent 1260. L'HPLC-DAD est pilotée par le logiciel LC-OpenLab. Elle est équipée d'une pompe quaternaire et d'un détecteur à barrette de diodes permettant l'acquisition de spectres UV/visible. Pour *A. maritima*, la colonne a été placée à 30 °C, et à 40 °C pour *H. stoechas*. Différents gradients ont été utilisés (présentés ci-contre).

Tableau 4.1 : Numérotation des gradients

N° de gradient	Utilisation du gradient
1	criblage des extraits d' <i>A. maritima</i>
2	criblage des fractions issues d'AmB
3	criblage des fractions issues d'AmA
4	criblage des fractions issues d'AmD
5	criblage des fractions issues d'AmD
6	criblage des extraits de cellules d' <i>H. stoechas</i> après élicitation
7	analyses des extraits d' <i>H. stoechas</i> obtenus avec différentes techniques d'extraction (SFE, ASE, MO)
8	déréplication des extraits d' <i>H. stoechas</i>

Le suivi analytique des extraits obtenus par les différentes techniques d'extraction pour *Helichrysum stoechas* a été réalisé à l'aide d'une HPLC-DAD-DEDL. La chaîne HPLC-DAD est une LaChrom Elite (VWR) équipée d'une pompe quaternaire. Le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) est un SEDEX 85 (SEDERE) réglé à une température de 50 °C, à une pression de 3 bars et à un gain de 7. Le pilotage se fait grâce au logiciel EZChrom Elite. Pour le DAD, les hauteurs de pics sont exprimées en mAU et pour le DEDL en mV. Le gradient qui a été utilisé est le numéro 7 (Tableau 4.1.b).

Tableau 4.2 : Gradients utilisés en HPLC analytique

N° de gradient	Temps (min)	% ACN	N° de gradient	Temps (min)	% ACN
1	0	5	6	0→ 5	10
	25→ 50	100		7	20
2	0	5		12	30
	2	10		17→ 20	100
	9	15	7	0	5
12→ 16	100	5		10	
3	0	10		10	20
	5	15		15	40
	12→ 18	20	25→ 38	100	
4	20→ 22	100	8	0→ 5	10
	0→ 5	10		10	20
	6→ 11	15		15	30
20→ 25	100	20→ 25		100	
5	0→ 6	15			
	20→ 30	100			

3. Chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse (HPLC-DAD-HRMS)

La masse exacte des molécules purifiées a été obtenue grâce à un système HPLC Agilent 1200 couplé à un DAD et à un spectromètre de masse haute résolution Agilent 6520 composé d'une source électro-spray et d'un analyseur quadripôle à temps de vol (QTOF). Les paramètres utilisés pour le spectromètre de masse sont précisés dans la partie E.1. La colonne chromatographique utilisée est une colonne Zorbax RRHT SB-C18 (5µm, 50mm x 2,1 mm) Agilent thermostatée à 35 °C. La phase mobile est constituée de deux phases : A - eau + 0,05% FA et B - ACN + 0,05% FA, à un débit de 0.6 mL/min. Le gradient était le suivant : ACN de 2% à 100% en 8 min, puis 100% pendant 4,5 min.

Les analyses des extraits bruts d'*H. stoechas* par LC-HRMS ont été réalisées sur un système Ultimate 3000 RSLC (Dionex), équipé d'un passeur automatique, d'une pompe binaire, d'un DAD et d'un four à colonnes. Le spectromètre de masse haute résolution utilisé est un maXis Q-TOF (Bruker) dont les paramètres sont précisés dans la partie E.1. Les acquisitions ont été réalisées avec le logiciel Hystar (Bruker) et le retraitement des analyses a été effectué avec le logiciel DataAnalysis. Le gradient qui a été utilisé est le n°8 (Tableau 4.2). (*collaboration ICOA Dr Cyril Colas*).

4. Chromatographie en phase gazeuse (GC-MS)

La fraction AmC a été analysée en chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse haute résolution. L'appareil qui a été utilisé est un JMS-T100GCV de marque Jeol. Le gaz utilisé est l'hélium. La colonne de chromatographie est une DB-5ms (phase polymère phenylarylène équivalente à une phase 5% phényl - méthylpolysiloxane, longueur 20 m, diamètre 0,18 mm, épaisseur du film 0,18 μm). La température initiale (à 0 min était de 40°C), puis élevée à 320 °C en 6 min, et appliquée pendant 48 min. La durée totale d'un run était de 54 min. La source d'ionisation du spectromètre de masse est à impact électronique, le détecteur est un temps de vol (TOF) et l'acquisition a été faite pour des molécules allant de 15 à 800 g/mol.

D. Méthodes de fractionnement et purification

1. Partages liquide-liquide

L'extrait hydro-alcoolique d'*A. maritima* (m = 170,6 g) a été dissout dans de l'eau déminéralisée (8 litres), puis partagé successivement avec des solvants organiques de polarité croissante : cyclohexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et enfin *n*-butanol saturé en eau. Dans une ampoule à décanter, 750 mL de phase organique ont été ajoutés à un litre de phase aqueuse, puis le mélange biphasique a été agité. L'extraction a été répétée quatre fois afin d'épuiser la phase aqueuse.

L'opération a été renouvelée 8 fois pour traiter la totalité des 8 litres de phase aqueuse. 5 fractions sont ainsi obtenues : AmC (cHex), AmD (CH₂Cl₂), AmA (AcOEt), AmB (BuOH), AmO (phase aqueuse résiduelle). La phase aqueuse résiduelle n'a pas été travaillée.

Tableau 4.3: Récapitulatif des extraits obtenus après le partage liquide/liquide de l'extrait hydro-alcoolique d'*A. maritima*

Extrait	Solvant utilisé	Masse (g)
AmC	cHex	11,77
AmD	DCM	2,54
AmA	AcOEt	5,99
AmB	BuOH	13,87

2. Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Les extraits AmA et AmB ont été fractionnés par VLC sur phase inverse (silice greffée C18, particules de 15-25 μm et pores de 100 Å). La phase stationnaire qui occupait un volume de 250 mL a été lavée avec 750 mL de MeOH puis conditionnée avec 750 mL de MeOH 5%. L'échantillon préalablement dissout dans du MeOH 5% a été déposé sur toute la surface de la phase stationnaire. L'élution a été réalisée avec un mélange MeOH/eau de polarité décroissante.

4,4 g de l'extrait AmB ont été déposés puis élués successivement avec du MeOH 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 75 et 100%, à raison de 600 mL pour chaque proportion de MeOH. Deux VLC identiques ont été nécessaires pour la totalité de AmB.

2,2 g de l'extrait AmA ont été déposés puis élués successivement avec du MeOH 15, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 80 et 100%, à raison de 600 mL pour chaque proportion de MeOH.

Les fractions ont été nommées AmXZ avec X = A (issu de AmA) ou B (issu de AmB) et Z = proportions de MeOH utilisée pour l'élution. Par exemple AmB35 correspond à la fraction de l'extrait butanolique AmB élue avec 35% de MeOH sur la VLC.

L'extrait AmD a été fractionné par VLC sur phase normale (silice 40-63 μm). Environ 2 g d'extrait ont été dissouts dans du dichlorométhane puis mélangé à de la silice (15-40 μm) afin d'obtenir un extrait sec sous forme de poudre ayant permis de réaliser un dépôt sec sur toute la surface de la silice préalablement compactée avec du MeOH puis conditionnée avec du cyclohexane. La phase stationnaire occupait un volume de 350 mL. L'élution a été réalisée avec des mélanges cHex/AcOEt puis AcOEt/MeOH (présentés ci-contre). 1 litre de chaque mélange a été passé sur la silice.

Tableau 4.4 : Fractionnement de l'extrait AmD sur VLC de SiOH

% cHex	% AcOEt	% MeOH	Nomenclature
100	0		AmD1
90	10		AmD2
80	20		AmD3
70	30		AmD4
60	40		AmD5
50	50		AmD6
40	60		AmD7
30	70		AmD8
20	80		AmD9
10	90		AmD10
	100	0	AmD11
	80	20	AmD12
	70	30	AmD13
	60	40	AmD14
	50	50	AmD15
	30	70	AmD16
	20	80	AmD17
	0	100	AmD18

3. Chromatographie d'exclusion

Certaines fractions issues des VLC ont été re-fractionnées sur une colonne Sephadex LH20 (LH20100 Sigma) (25-100 μm) de 45 cm avec un débit d'environ 0,9 mL/min et un volume mort de 220 mL. Le solvant utilisé pour l'élution était du MeOH. Les fractions déposées ont été solubilisées dans du MeOH. Des sous-fractions de 7 mL ont été collectées.

4. Chromatographie liquide haute performance semi-préparative

Toutes les molécules ont été isolées à l'aide d'une HPLC semi-préparative Gilson 322 équipée de pompe binaire et d'un détecteur UV/visible 151.

Une colonne Axia C18 (5 μm , 100 Å, 100 mm x 21,20 mm) Phenomenex a été utilisée et l'éluant est constitué de deux phases : A - eau + 0,05% FA et B- ACN + 0,05% FA, à un débit de 25 mL/min. La détection a été réalisée soit à 210 nm soit à 280 nm en fonction des fractions injectées. 10 à 40 μg d'échantillon ont été solubilisés dans 250 mL et injectés dans une boucle de 500 μL .

Tableau 4.5 : Gradients utilisés en HPLC semi-préparative

Fraction (n° gradient)	Temps (min)	% ACN	Fraction (n° gradient)	Temps (min)	% ACN
AmB20-F7 (A)	0→25	5,5	AmA45 (I)	0→3	10
	29	15		4→24	15
	35→40	100		25→45	19
AmB35 (B)	0→20	10	AmA55 (J)	50→55	100
	23→30	100		0→20	17
AmB40 (C)	0→45	10	AmD4 (K)	21→40	19
	55→60	100		46→55	100
AmB45 (D)	0→30	12	AmD6 (L)	0	10
	40→45	100		8	15
AmB50 (E)	0→3	5		9	55
	4→35	14		19	65
	36→45	100	20→35	100	
AmA15'-F3 (F)	0→5	2	AmD7 (M)	0	10
	7→17	5		12	19
	19→38	10		14→25	100
	40→45	100	AmD14 (O)	0	10
AmA35 (G)	0→19	8		8	15
	20→40	10		20	33
	45→60	100	25→30	100	
AmA40-F3 (H)	0→25	13	AmD14 (O)	0→5	10
	28→35	20		6→11	15
	40→45	100		15	40
17→22				100	

E. Méthodes physiques et spectrales

1. Spectrométrie de masse (MS)

Les spectres de masse des molécules issues d'*A. maritima* ont été obtenus avec un spectromètre de masse Accurate Mass Q-TOF 6520 (Agilent) composé d'une source électro-

spray (en mode positif) et d'un analyseur quadripôle - temps de vol. Les analyses ont été effectuées dans les conditions suivantes : température de la source 340 °C, gaz de désolvatation N₂ à 8 L/h, voltage du capillaire 4000 V, voltage du fragmenteur : 120 V et voltage du tube de vol : 9000 V. Les spectres de masse (50 à 2000 amu) ont été enregistrés à une fréquence de 3 spectres par seconde. A partir de ces spectres de masse, la masse exacte des molécules a été déterminée, permettant ainsi de générer des formules brutes pour chacune des molécules isolées.

Les analyses de déréduplication pour *H. stoechas* ont été réalisées sur un spectromètre de masse haute résolution, un maXis Q-TOF (Bruker). La source d'ionisation utilisée est une source de type électrospray utilisée en mode d'ionisation négatif. La tension de capillaire appliquée a été fixée à - 4.5 kV. L'azote est utilisé comme gaz de nébulisation et comme gaz séchant. Le gaz de nébulisation est à une pression de 1,2 bar et le débit du gaz séchant chauffé à 200 °C à un débit de 8,5 L/min. Les spectres de masse ont été enregistrés à la fréquence de 1 Hz et la plage de masse balayée a été de 50 à 2500 m/z. L'utilisation de calibrants aussi appelés 'lock mass' est nécessaire pour la spectrométrie de masse haute résolution afin de s'assurer de l'exactitude des masses mesurées. Pour calibrer l'appareil, des lock mass de m/z 622 et 1222 (mode d'ionisation négatif) ont été utilisées. Celles-ci appartiennent à la famille des hexakis phosphazènes qui sont des éthers perfluorés.

2. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La plupart des spectres RMN ¹H et ¹³C ont été mesurés respectivement à 500, 130 MHz et 125,758 MHz sur un spectromètre RMN Bruker Avance II – 500 MHz muni d'un passeur automatique. Le spectromètre est équipé d'une cryosonde duale ¹H/¹³C (5 mm cryoprobe DCH 13C/1H/D z-grad). Les spectres 1D DEPT, TOCSY sélectif ainsi que les spectres 2D HSQC, HMBC, COSY, NOESY ont été enregistrés à l'aide de séquences impulsionsnelles spécifiques fournies par Bruker. Les molécules ont été solubilisées dans des solvants deutérés (MeOD pour la majorité ; Sigma). Les déplacements chimiques δ ont été exprimés en ppm par rapport au signal résiduel du solvant deutéré utilisé comme référence interne (méthanol-*d*₄ δH : 3,31 ppm δC : 49,15 ppm).

Certaines acquisitions de spectres ont été réalisées sur un spectromètre RMN Bruker Avance III à 400 MHz muni d'un passeur automatique d'échantillons et d'une sonde Sonde BBFO + 5 mm (multi-noyaux).

Le travail d'élucidation structural a été réalisé en collaboration avec le Pr Lavaud de l'ICMR de Reims.

3. Pouvoir rotatoire

Pour les molécules originales ou celles possédant des carbones asymétriques, le pouvoir rotatoire a été mesuré avec un Polarimètre Jasco P200. La raie D (589 nm) d'une lampe au sodium a été utilisée comme source de lumière incidente. La rotation α de la lumière polarisée par les molécules dissoutes dans du méthanol a été mesurée dans une cuve de 10 cm de long thermostatée à 25 °C. Le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D^{25}$ (en degré) est défini de la manière suivante :

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{\alpha_D \times 1000}{c \times l}$$

Avec :

- α_D : valeur mesurée (moyenne de 20 lectures) à 25°C
- c : concentration de la solution (mg/mL)
- l : longueur de la cuve (dm)

III. Purifications des composés d'*A. maritima*

Les parties aériennes séchées et broyées d'*A. maritima* (1 kg, à raison de 4 x 250 g) ont été extraites avec un mélange EtOH/eau (80 :20) (16 L, à raison de 4 x 4 L) par macération pendant 1h30 puis aux ultra-sons. Tous les extraits ont été assemblés avant d'être évaporés à sec à l'évaporateur rotatif, permettant d'obtenir 171 g d'extrait sec.

Cet extrait a été soumis à un partage liquide/liquide avec des solvants organiques de polarité croissante permettant l'obtention des fractionnements suivants : AmC (11,77 g), AmD (2,54 g), AmA (5,99 g) et AmB (13,87 g).

Les fractions AmA, AmB et AmD ont été re-fractionnés par VLC, puis les composés purifiés en HPLC semi-préparative après (ou non) passage sur une colonne Sephadex (cf. § II.D.3).

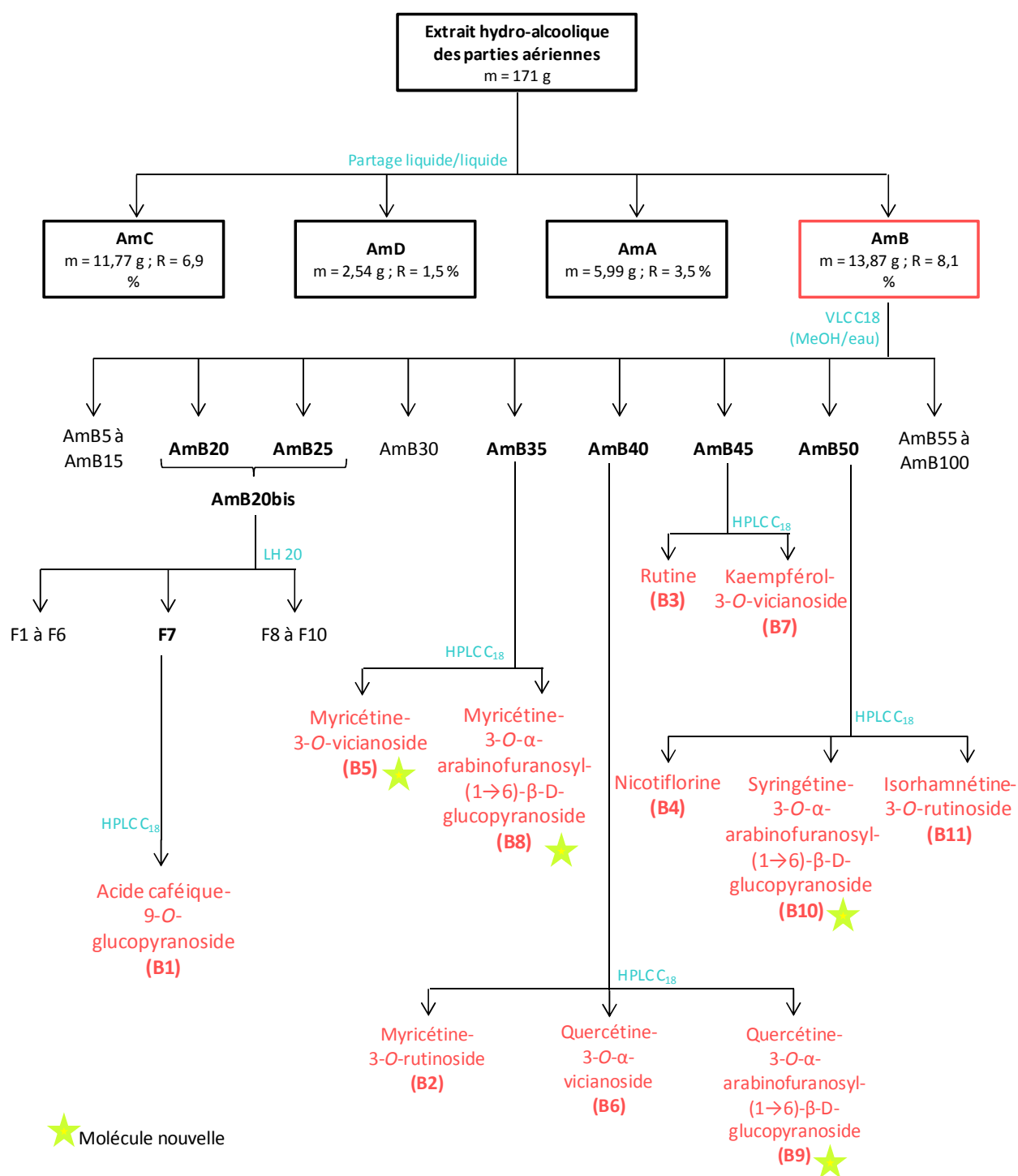


Figure 4.1 Schéma de purification des composés du fractionnement butanolique (AmB) d'*A. maritima*

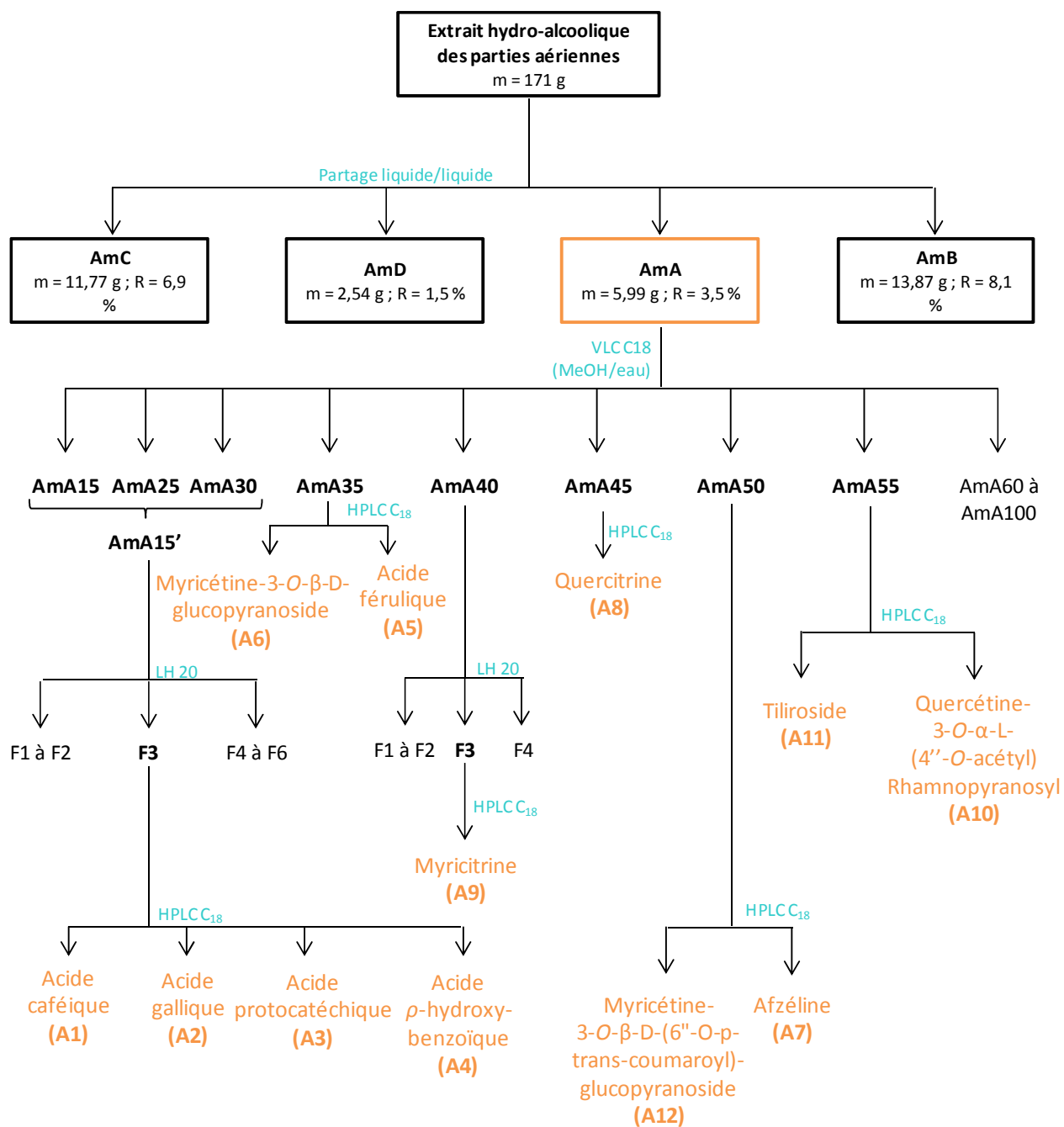


Figure 4.2 : Schéma de purification des composés du fractionnement AcOEt (AmA) d'*A. maritima*

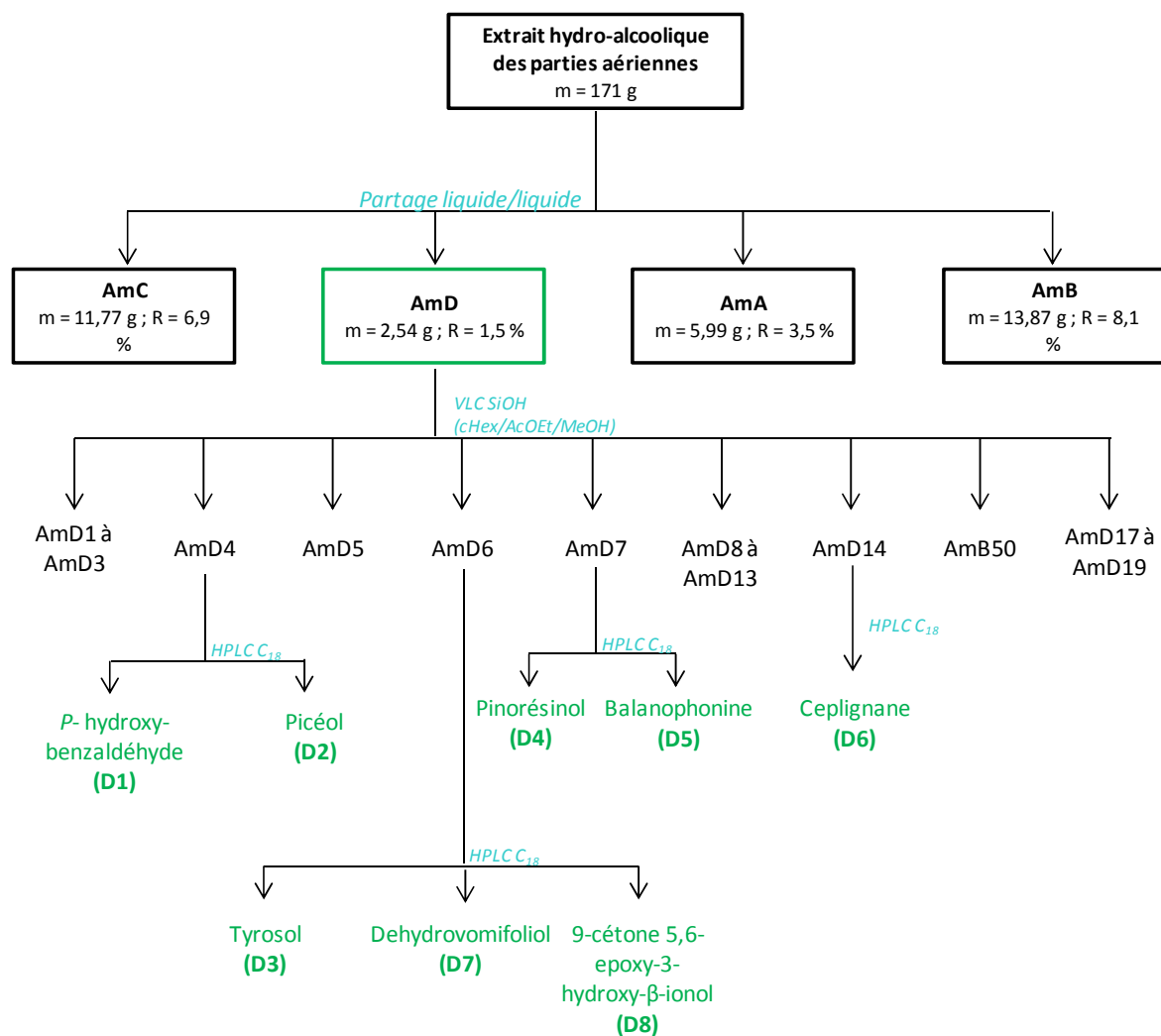
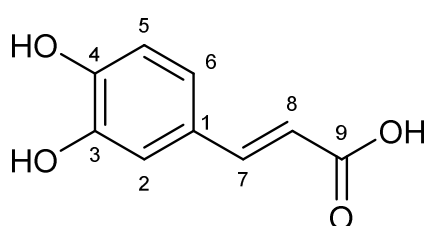


Figure 4.3 : Schéma de purification des composés du fractionnement dichlorométhanique (AmD) d'*A. maritima*

IV. Caractéristiques physiques et spectrales des molécules isolées dans les parties aériennes *A. maritima*

Acide caféique

(A1)



Origine: AmA15'F3

Masse isolée: 2,5 mg

C₉H₈O₄

MM = 180,16 g.mol⁻¹

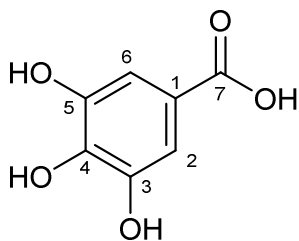
Synonyme : acide 3,4-dihydroxycinnamique

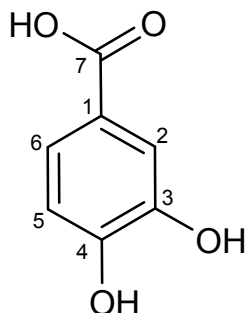
Aspect: poudre amorphe beige

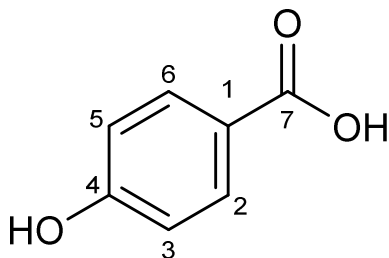
UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) : 215, 324 (épaulement à 295) nm

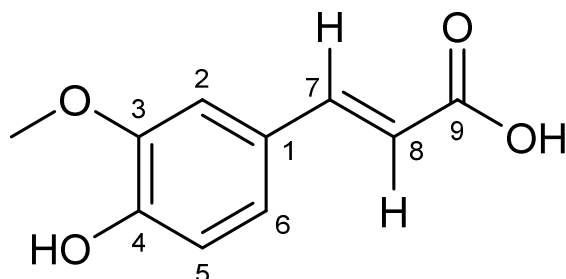
HR-ESI⁺-QTOF (m/z): [M+H]⁺ = 181,0488

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ ppm : 6.23 (1H, br d, $J=15.8$ Hz, H8), 6.77 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H5), 6.93 (1H, dd, $J=8.2, 1.5$ Hz, H6), 7.03 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H2), 7.50 (1H, br d, $J=15.8$ Hz, H7)

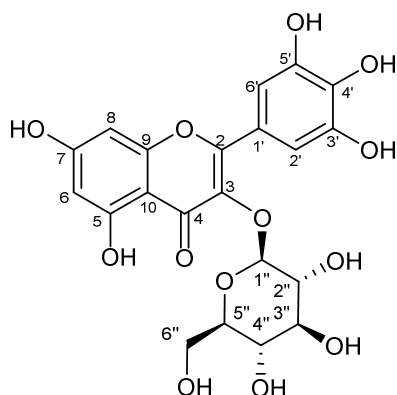
Acide gallique**(A2)****Origine:** AmA15'F3**Masse isolée:** 1,6 mg**C₇H₆O₅****MM = 170,12 g.mol⁻¹****Synonyme :** acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque**Aspect:** poudre amorphe beige**UV λ_{\max} (CH₃OH,nm) :** 215, 271 nm**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 171,0292**RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ ppm :** 7.08 (2H, s)

Acide protocatéchique**(A3)****Origine:** AmA15'F3**Masse isolée:** 1,1 mg**C₇H₆O₄****MM = 154,12 g.mol⁻¹****Synonyme :** acide 3,4-dihydroxybenzoïque**Aspect:** poudre amorphe beige**UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) :** 192, 257, 292 nm**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 155,0335**RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ ppm :** 6.78 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H5), 7.40 (1H, dd, *J*=8.2, 2.0 Hz, H6), 7.43 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H2)

Acide *p*-hydroxybenzoïque**(A4)****Origine:** AmA15'F3**Masse isolée:** 0,9 mg**C₇H₆O₃****MM = 138,12 g.mol⁻¹****Synonyme :** acide 4-hydroxybenzoïque**Aspect:** poudre amorphe beige**UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) :** 193, 255 nm**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 139,0385**RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ ppm :** 6.82 (2H, d-like, *J*=8.8 Hz, H3, H5), 7.9 (2H, d-like, *J*=8.8 Hz, H2-H6)

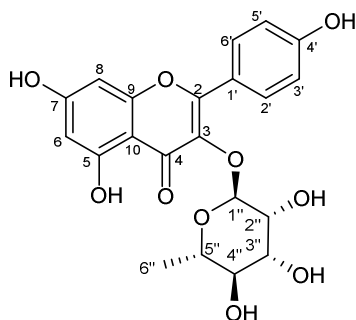
Acide trans-férulique**(A5)****Origine:** AmA35**Masse isolée:** 0,8 mg**C₁₀H₁₀O₄****MM = 194,18 g.mol⁻¹****Synonyme :** acide 3-méthoxy-4-hydroxycinnamique**Aspect:** poudre amorphe beige**UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) :** 219, 240, 324 (épaulement à 284) nm**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 195,0651

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 3.89 (3 H, s, OMe), 6.32 (1 H, d, $J=15.9$ Hz, H7), 6.80 (1 H, d, $J=8.2$ Hz, H5), 7.04 (1 H, dd, $J=8.5, 1.8$ Hz, H6), 7.17 (1 H, d, $J=1.8$ Hz, H2), 7.53 (1 H, d, $J=15.9$ Hz, H8)

Myricétine-3-O-β-D-glucopyranoside**(A6)****Origine:** AmA35**Masse isolée:** 1,8 mg**C₂₁H₂₀O₁₃****MM = 480,38 g.mol⁻¹****Aspect:** poudre jaune**UV λ_{max} (CH₃OH, nm) :** 206, 265 et 359**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 481,0980

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 3.23 (1H, ddd, *J*=7.3, 4.5, 3.5 Hz, H5''), 3.39 (1H, brt, *J*=9.0 Hz, H4''), 3.44 (1H, brt, *J*=9.0 Hz, H3''), 3.51 (1H, dd, *J*=9.0, 8.0 Hz, H2''), 3.62 (1H, br dd, *J*=12.5, 4.5 Hz, H6''a), 3.73 (1H, dd, *J*=12.5, 3.5 Hz, H6''b), 5.25 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H1''), 6.19 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H6), 6.37 1H, (d, *J*=2.1 Hz, H8), 7.30 (2H, s, H2', H6')

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 62.6 (C6''), 71.2 (C4''), 75.8 (C2''), 78.4 (C3''), 78.5 (C5''), 95.0 (C8), 100.3 (C6), 104.4 (C1''), 105.6 (C10), 110.1 (C2', C6'), 122.0 (C1'), 135.9 (C3), 138.2 (C4'), 146.6 (C3', C5'), 158.6 (C9), 159.0 (C2), 163.2 (C5), 167.0 (C7), 179.5 (C4)

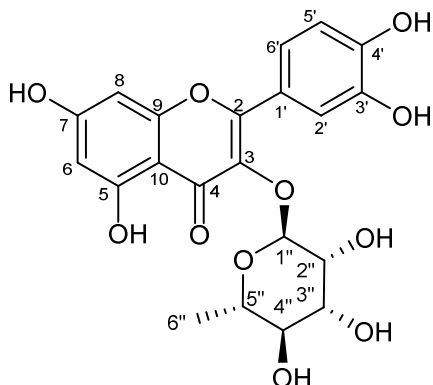
Afzeline**(A7)****Origine:** AmA50**Masse isolée:** 1,1 mg**C₂₁H₂₀O₁₀****MM = 432,38 g.mol⁻¹****Synonyme :** Kaempférol-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside**Aspect:** poudre jaune**UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) :** 199, 265, 346 nm**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 433,1121

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OH) δ ppm : 0.92 (3 H, d, $J=5.8$ Hz, H6''), 3.32 - 3.35 (2 H, m, H5'', H4''), 3.71 (1 H, br dd, $J=9.0, 3.3$ Hz, H3''), 4.22 (1 H, dd, $J=3.3, 1.8$ Hz, H2''), 5.38 (1 H, d, $J=1.8$ Hz, H1''), 6.20 (1 H, d, $J=2.1$ Hz, H6), 6.38 (1 H, d, $J=2.1$ Hz, H8), 6.94 (2 H, d, $J=8.9$ Hz, H3', H5'), 7.77 (2 H, d, $J=8.9$ Hz, H2', H6')

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OH) δ ppm : 17.8 (C6''), 72.1 (C2''), 72.2 (C3''), 72.3 (C5''), 73.3 (C4''), 94.9 (C8), 100.0 (C6), 103.6 (C1''), 106.0 (C10), 116.7 (C3', C5'), 122.8 (C1'), 132.0 (C2', C6'), 136.3 (C3), 158.7 (C2), 159.4 (C9), 161.7 (C4'), 163.4 (C5), 166.2 (C7), 179.7 (C4)

Quercitrine

(A8)



Origine: AmA45

Masse isolée: 1,2 mg

C₂₁H₂₀O₁₁

MM = 448,38 g.mol⁻¹

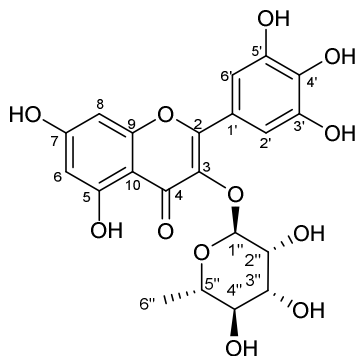
Synonyme : Quercétine-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside

Aspect: poudre jaune

UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) : 203, 256, 350 nm

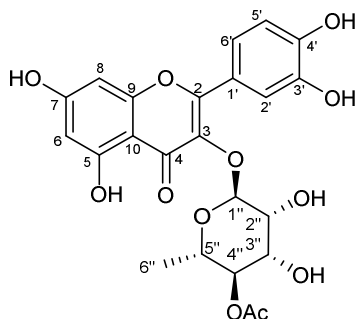
HR-ESI⁺-QTOF (m/z): [M+H]⁺ = 449,1071

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 0.94 (3 H, d, $J=6.1$ Hz, H6''), 3.33 (1 H, m, H4''), 3.42 (1 H, m, H5''), 3.75 (1 H, dd, $J=9.4, 3.4$ Hz, H3''), 4.22 (1 H, dd, $J=3.3, 1.5$ Hz, H2''), 5.35 (1 H, d, $J=1.5$ Hz, H1''), 6.20 (1 H, d, $J=2.0$ Hz, H6), 6.37 (1 H, d, $J=2.0$ Hz, H8), 6.91 (1 H, d, $J=8.3$ Hz, H5'), 7.31 (1 H, dd, $J=8.3, 2.1$ Hz, H6'), 7.34 (1 H, d, $J=2.1$ Hz, H2')

Myricitrine**(A9)****Origine:** AmA40**Masse isolée:** 17,8 mg**C₂₁H₂₀O₁₂****MM = 464,38 g.mol⁻¹****Synonyme :** Myricétine-3-*O*-α-L-rhamnopyranoside**Aspect:** poudre jaune**UV λ_{max} (CH₃OH, nm) :** 206, 263, 351**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 465,1040

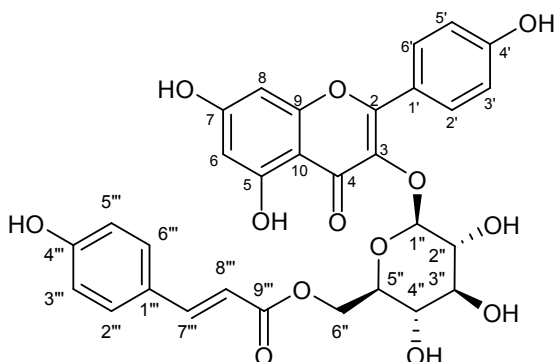
RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 0.97 (3 H, d, *J*=6.2 Hz, H6''), 3.35 (1 H, t, *J*=9.6 Hz, H4''), 3.52 (1 H, dq, *J*=9.6, 6.2 Hz, H5''), 3.80 (1 H, dd, *J*=9.5, 3.2 Hz, H3''), 4.23 (1 H, dd, *J*=3.2, 1.5 Hz, H2''), 5.32 (1 H, d, *J*=1.6 Hz, H1''), 6.20 (1 H, d, *J*=2.1 Hz, H6), 6.36 (1 H, d, *J*=2.1 Hz, H8), 6.95 (2 H, s, H2', H6')

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 17.8 (C6''), 72.0 (C2''), 72.2 (C3''), 72.3 (C5''), 73.5 (C4''), 94.8 (C8), 99.9 (C6), 103.8 (C1''), 106.0 (C10), 109.7 (C2' et C6'), 122.1 (C1'), 136.4 (C3), 138.0 (C4'), 147.0 (C3' et C5'), 158.6 (C9), 159.6 (C2), 163.3 (C5), 166.0 (C7), 179.8 (C4)

4''-O-acétyl-quercitrine**(A10)****Origine:** AmA55**Masse isolée:** 7,3 mg**C₂₃H₂₂O₁₂****MM = 490,41 g.mol⁻¹****Synonyme :** Quercétine-3-O- α -L-(4''-O-acétyl)-rhamnopyranoside**Aspect:** poudre jaune**UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) :** 203, 256, 349**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 491,1176

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 0.79 (3 H, d, $J=6.3$ Hz, H6''), 2.05 (3 H, s, CH₃-CO), 3.35 (1 H, m, H5''), 3.88 (1 H, dd, $J=9.7, 3.2$ Hz, H3''), 4.21 (1 H, dd, $J=3.2, 1.6$ Hz, H2''), 4.81 (1 H, m, H4''), 5.49 (1 H, d, $J=1.6$ Hz, H1''), 6.21 (1 H, d, $J=2.1$ Hz, H6), 6.38 (1 H, d, $J=2.1$ Hz, H8), 6.92 (1 H, d, $J=8.3$ Hz, H5'), 7.26 (1 H, dd, $J=8.3, 2.0$ Hz, H6'), 7.31 (1 H, d, $J=2.0$ Hz, H2')

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 16.2 (C6''), 19.6 (CH₃-CO), 70.3 (C2''), 68.7 (C3''), 68.2 (C5''), 73.6(C4''), 93.4 (C8), 98.5 (C6), 101.1 (C1''), 104.5 (C10), 114.9 (C5'), 115.5 (C2'), 121.3 (C6'), 121.5 (C1'), 134.1 (C3), 145.2 (C3'), 148.4 (C4'), 157.2 (C9), 158.2 (C2), 164.5 (C7), 161.8 (C5), 171.1 (CH₃-CO), 178.1 (C4)

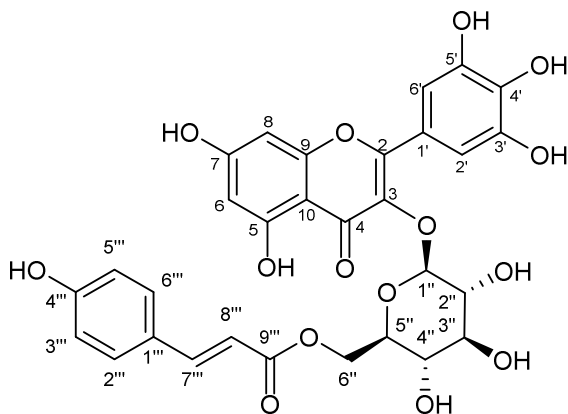
Tiliroside**(A11)****Origine:** AmA55**Masse isolée:** 0,9 mg**C₃₀H₂₆O₁₃****MM = 594,53 g.mol⁻¹****Synonyme :** Kaempférol-3-*O*-β-D-(6''-*O*-*trans*-*p*-coumaroyl)-glucopyranoside**Aspect:** poudre jaune claire**UV λ_{max} (CH₃OH, nm) :** 200, 268, 315**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 595,1430

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 3.33 (1 H, t, *J*=1.7 Hz, H4''), 3.42 - 3.50 (3H, m, H5'', H3'', H2''), 4.19 (1 H, dd, *J*=11.8, 6.6 Hz, H6''a), 4.29 (1 H, dd, *J*=11.8, 3.0 Hz, H6''b), 5.23 (1 H, d, *J*=7.5 Hz, H1''), 6.07 (1 H, d, *J*=16.0 Hz, H8'''), 6.14 (1 H, d, *J*=2.1 Hz, H6), 6.31 (1 H, d, *J*=2.1 Hz, H8), 6.78 - 6.84 (4 H, m, H3', H5', H3''', H5'''), 7.32 (2 H, d, *J*=8.6 Hz, H2''', H6'''), 7.41 (1 H, d, *J*=16.0 Hz, H7'''), 7.99 (2 H, d, *J*=9.0 Hz, H2', H6')

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 64.6 (C6''), 72.1 (C4''), 76.1 (C5''), 76.2 (C2''), 78.4 (C3''), 95.3 (C8), 100.5 (C6), 104.4 (C1''), 105.8 (C10), 115.1 (C8'''), 116.4 (C3', C5'), 117.1 (C3''', C5'''), 123.1 (C1'), 127.5 (C1'''), 131.5 (C2''', C6'''), 132.5 (C2', C6'), 135.5 (C3), 146.9 (C7'''), 158.8 (C2), 159.7 (C9), 161.5 (C4'), 162.4 (C4'''), 163.3 (C5), 166.8 (C7), 169.1 (C9'''), 179.7 (C4)

Myricétine-3-O-β-D-(6''-O-trans-p-coumaroyl)-glucopyranoside

(A12)



Origine: AmA50

Masse isolée: 0,9 mg

C₃₀H₂₆O₁₅

MM = 626,52 g.mol⁻¹

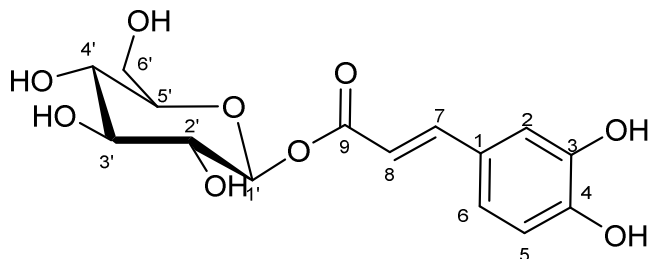
Aspect: poudre jaune claire

UV λ_{max} (CH₃OH, nm) : 200, 269, 375 (épaulement à 322)

HR-ESI⁺-QTOF (m/z): [M+H]⁺ = 627,13030

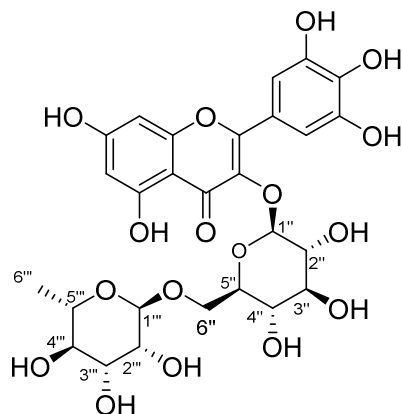
RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 3.36 (H, m, H4''), 3.43-3.46 (2H, m, H3'', H5''), 3.55 (2 H, brt, *J*=8.5 Hz, H2''), 4.22 (H, br dd, *J*=11.6, 7.0 Hz, H6''a), 4.32 (H, dd, *J*=11.6, 1.5 Hz, H6''b), 5.28 (1 H, br d, *J*=7.9 Hz, H1''), 6.10 (1 H, d, *J*=16,1 Hz, H8'''), 6.11 (1 H, d, *J*=2,0 Hz, H6), 6.29 (1 H, br d, *J*=2.0 Hz, H8), 6.79 (2 H, brd, *J*=8.9 Hz, H3''', H5'''), 7.23 (2 H, s, H2'', H6''), 7.32 (1 H, br d, *J*=8.9 Hz, H2''', H6'''), 7.39 (1 H, d, *J*=16.1 Hz, H7''')

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 64.5 (C6''), 71.7 (C4''), 75.6 (C2''), 75,9 (C5''), 78.0 (C3''), 94.6 (C8), 99.9 (C6), 103.5 (C1''), 105.7 (C10), 109.9 (C2''), 114.7 (C8'''), 116.7 (C3'''-C5'''), 122.0 (C1''), 127.1 (C1'''), 131.2 (C2'''-C6'''), 135.2 (C3), 137.5 (C4'), 146.3 (C3'-C5'), 146.5 (C7'''), 158.3 (C2), 158.5 (C9), 161.1 (C4'''), 162.9 (C5), 165.9 (C7), 168.9 (C9'''), 179.4 (C4)

1'-*O-E*-caféoyl- β -D-glucopyranose**(B1)****Origine:** AmB20'F7**Masse isolée:** 3,8 mg**C₁₅H₁₈O₉****MM = 342,30 g.mol⁻¹****Aspect:** poudre amorphe beige**UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) :** 218, 241, 329 (épaulement à 303)**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 343,1017

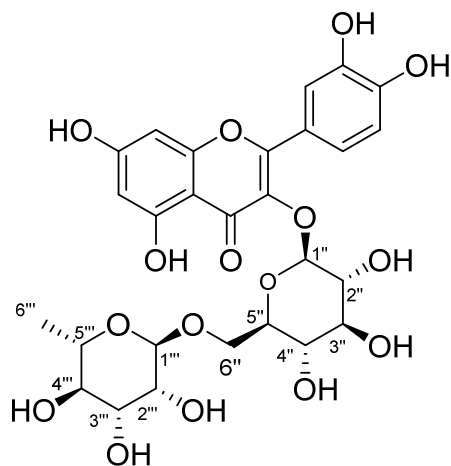
RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 3.39 (1H, m, H4'), 3.42 (1H, m, H5'), 3.43 (1H, m, H3'), 3.45 (1H, m, H2'), 3.70 (1 H, dd, $J=12.1, 4.7$ Hz, H6'a), 3.85 (1 H, dd, $J=12.1, 1.7$ Hz, H6'b), 5.57 (1 H, d, $J=7.9$ Hz, H1'), 6.31 (1 H, d, $J=15.9$ Hz, H8), 6.79 (1 H, d, $J=8.2$ Hz, H5), 6.97 (1 H, dd, $J=8.2, 1.8$ Hz, H6), 7.06 (1 H, d, $J=1.8$ Hz, H2), 7.66 (1 H, d, $J=15.9$ Hz, H7)

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 62.5 (C6'), 71.2 (C4'), 74.2 (C2'), 78.1 (C3'), 78.9 (C5'), 95.9 (C1'), 114.5 (C8), 115.4 (C2), 116.6 (C5), 123.4 (C6), 127.7 (C1), 147.0 (C3), 148.5 (C7), 150.1 (C4), 167.9 (C9)

Myricétine-3-O-rutinoside**(B2)****Origine:** AmB40**Masse isolée:** 4,1 mg**C₂₇H₃₀O₁₇****MM = 626,52 g.mol⁻¹****Synonyme :** Myricétine-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1'' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside**Aspect:** poudre jaune**UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) :** 204, 266, 359**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 627, 1552

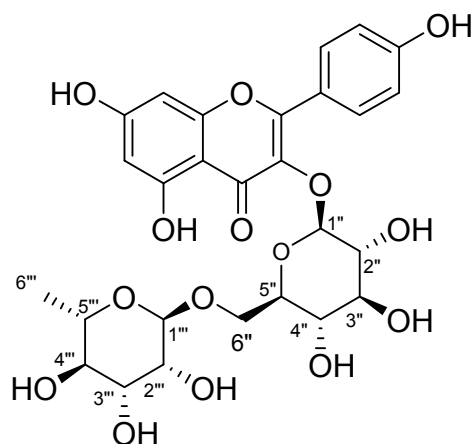
RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 1.12 (3 H, br d, $J=6.2$ Hz, H6'''), 3.28 (1 H, t, $J=9.1$ Hz, H4''), 3.30 (1 H, m, H4'''), 3.33 (1 H, m, H5'''), 3.40 (1 H, dd, $J=10.9, 5.5$ Hz, H6''a), 3.42 (1 H, t, $J=9.1$ Hz, H3'''), 3.44 (1 H, m, H5'''), 3.50 (1 H, dd, $J=9.1, 7.8$ Hz, H2''), 3.55 (1 H, br dd, $J=9.3, 3.3$ Hz, H3'''), 3.63 (1 H, dd, $J=3.3, 1.2$ Hz, H2'''), 3.81 (1 H, dd, $J=10.9, 3.0$ Hz, H6''b), 4.53 (1 H, d, $J=1.2$ Hz, H1'''), 5.08 (1 H, d, $J=7.8$ Hz, H1''), 6.21 (1 H, d, $J=2.0$, H6), 6.40 (1 H, d, $J=2.0$ Hz, H8), 7.30 (2 H, s, H2', H6')

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 18.0 (C6'''), 68.7 (C6''), 69.9 (C5'''), 71.5 (C4''), 72.3 (C2'''), 72.4 (C3'''), 74.1 (C4'''), 75.8 (C2''), 77.4 (C5''), 78.4 (C3''), 95.0 (C8), 100.1 (C6), 102.6 (C1'''), 105.0 (C1''), 105.8 (C10), 110.5 (C2', C6'), 122.2 (C1'), 135.9 (C3), 138.2 (C4'), 146.5 (C3' C5'), 158.6 (C9), 159.5 (C2), 163.1 (C5), 166.2 (C7), 179.6 (C4)

Quercétine-3-O-rutinoside**(B3)****Origine:** AmB45**Masse isolée:** 1,7 mg**C₂₇H₃₀O₁₆****MM = 610,52 g.mol⁻¹****Synonymes :** Rutine, Quercétine-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside**Aspect:** poudre jaune**UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) :** 197, 265, 349**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 611,1609

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 1.13 (3 H, d, $J=6.1$ Hz, C6'''), 3.26 (2 H, br t, $J=8.7$ Hz, H4''), 3.28 (1 H, t, $J=7.9$ Hz, H4'''), 3.31 (H, m, H5''), 3.39 (2 H, dd, $J=11.1, 6.1$ Hz, H6''b), 3.41 (1 H, t, $J=8.7$ Hz, H3''), 3.45 (1 H, m, H5'''), 3.47 (1H, t, $J=8.7$ Hz, H2''), 3.55 (1 H, dd, $J=9.5, 3.5$ Hz, H3'''), 3.64 (1 H, dd, $J=3.5, 1.3$ Hz, H2'''), 3.81 (1 H, dd, $J=11.1, 1.2$ Hz, H6''a), 4.52 (1 H, d, $J=1.3$ Hz, H1'''), 5.07 (1 H, d, $J=7.6$ Hz, H1''), 6.18 (1 H, d, $J=2.1$ Hz, H6), 6.36 (1 H, d, $J=2.1$ Hz, H8), 6.87 (1 H, d, $J=8.5$ Hz, H5'), 7.63 (1 H, dd, $J=8.5, 2.1$ Hz, H6'), 7.67 (1 H, d, $J=2.1$ Hz, H2')

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 17.9 (C6'''), 68.7 (C6''), 69.9 (C5), 71.5 (C4''), 72.2 (C2'''), 72.4 (C3'''), 75.9 (C2''), 74.1 (C4'''), 77.3 (C5''), 78.4 (C3''), 95.4 (C8), 100.7 (C6), 102.6 (C1'''), 105.1 (C1''), 105.2 (C10), 116.2 (C5'), 117.7 (C2'), 123.2 (C1'), 123.7 (C6'), 135.7 (C3), 146.0 (C3'), 150.1 (C4'), 158.8 (C9), 159.2 (C2), 170.4 (C7), 179.3 (C4),

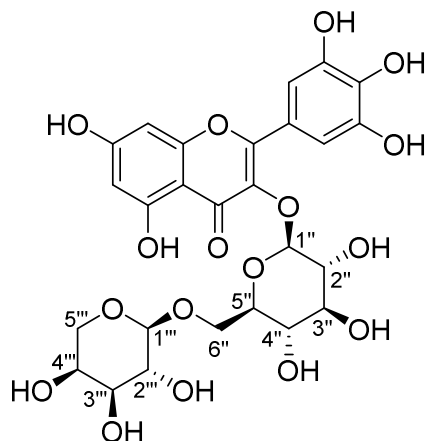
Kaempférol-3-O-rutinoside**(B4)****Origine:** AmB50**Masse isolée:** 0,7 mg**C₂₇H₃₀O₁₅****MM = 594,52 g.mol⁻¹**

Synonymes : Kaempférol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1'' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside, nicotiflorine

Aspect: poudre jaune**UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) :** 195, 265, 349**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 595,1656

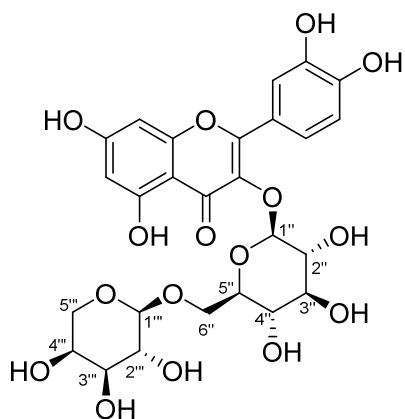
RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 1.14 (3 H, d, $J=6.3$ Hz, H6'''), 3.25 (1 H, t, $J=8.8$ Hz, H4''), 3.29 (1H, m, H4'''), 3.32 (1 H, m, H5'''), 3.37 (1 H, dd, $J=11.0, 6.7$ Hz, H6''a), 3.41 (1 H, br t, $J=8.8$ Hz, H3'''), 3.44 (1 H, dd, $J=9.6, 2.0$ Hz, H2''), 3.46 (1 H, dd, $J=9.3, 6.6$ Hz, H5'''), 3.54 (1 H, dd, $J=9.4, 3.3$ Hz, H3'''), 3.64 (1 H, br d, $J=1.3$ Hz, H2'''), 3.81 (1 H, br dd, $J=11.0, 1.1$ Hz, H6''b), 4.52 (1 H, d, $J=1.3$ Hz, H1'''), 5.04 (1 H, br d, $J=7.5$ Hz, H1''), 6.11 (1 H, d, $J=1.7$ Hz, H6), 6.28 (1 H, d, $J=1.7$ Hz, H8), 6.88 (2 H, br d, $J=8.8$ Hz, H3', H5'), 8.06 (2 H, br d, $J=8.8$ Hz, H2', H6')

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 18.1 (C6'''), 49.8 (s), 49.9 (s), 50.1 (s), 50.2 (s), 68.7 (C6''), 69.9 (C5'''), 71.5 (C4''), 72.2 (C2'''), 72.4 (C3'''), 74.1 (C4'''), 75.9 (C2''), 77.3 (C5''), 78.4 (C3''), 96.3 (C8), 101.9 (C6), 102.6 (C1'''), 104.2 (C10), 105.3 (C1''), 116.3 (C3', C5'), 122.9 (C1'), 132.4 (C2', C6'), 135.5 (C3), 158.8 (C2), 159.1 (C9), 159.1 (s), 161.8 (C4'), 162.9 (C5) 171.6 (C7), 178.9 (C4)

Myricétine-3-*O*-vicianoside**(B5)****Origine:** AmB35**Masse isolée:** 10,0 mg**C₂₆H₂₈O₁₇****MM = 612,49 g.mol⁻¹****Synonyme :** Myricétine-3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1'''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside**Aspect:** poudre jaune**UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) :** 207, 260, 357**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 613,1392

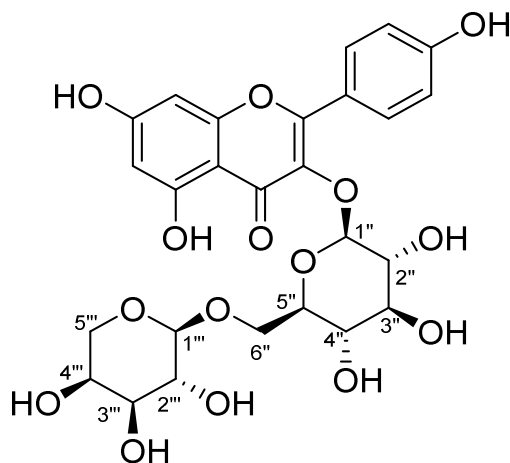
RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 3.13 (1 H, dd, $J=12.4, 1.1$ Hz, H5'''), 3.21 (1 H, dd, $J=9.8, 3.6$ Hz, H3'''), 3.31 (1 H, dd, $J=9.5, 8.9$ Hz, H4''), 3.36 (1 H, dd, $J=9.8, 7.3$ Hz, H2'''), 3.43 (1 H, t, $J=8.9$ Hz, H3''), 3.43 (1H, t, m, H5''), 3.54 (1 H, dd, $J=9.5, 7.8$ Hz, H2''), 3.62 (1 H, dd, $J=12.3, 3.3$ Hz, H6''a), 6.66 (1 H, m, H4'''), 3.69 (1 H, br dd, $J=12.4, 2.8$ Hz, H5''a), 3.92 (1 H, dd, $J=12.2, 1.5$ Hz, H6''b), 4.04 (1 H, d, $J=7.3$ Hz, H1'''), 5.19 (1 H, d, $J=7.9$ Hz, H1''), 6.20 (1 H, d, $J=2.1$ Hz, H6), 6.40 (1 H, d, $J=2.1$ Hz, H8), 7.34 (2 H, s, H2', H6')

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 66.9 (C5'''), 69.4 (C6''), 69.7 (C4'''), 71.6 (C4''), 72.6 (C2'''), 74.2 (C3'''), 75.8 (C2''), 78.3 (C3''), 78.5 (C5''), 94.9 (C8), 100.0 (C6), 104.3 (C1''), 105.0 (C1'''), 105.9 (C10), 110.3 (C2', C6'), 122.2 (C1'), 136.0 (C3), 138.3 (C4'), 146.6 (C3', C5'), 158.6 (C9), 158.9 (C2), 163.2 (C5), 166.2 (C7), 179.5 (C4)

Quercétine-3-O-vicianoside**(B6)****Origine:** AmB40**Masse isolée:** 2,5 mg**C₂₆H₂₈O₁₆****MM = 596,49 g.mol⁻¹****Synonyme :** Quercétine-3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside**Aspect:** poudre jaune**UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) :** 203, 256, 357**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 597,1445

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 3.14 (1 H, dd, $J=12.3, 1.4$ Hz, H5'''b), 3.20 (1 H, dd, $J=8.9, 3.4$ Hz, H3'''), 3.33 (1 H, dd, $J=9.8, 8.8$ Hz, H4''), 3.37 (1 H, dd, $J=8.9, 7.0$ Hz, H2'''), 3.40 (1 H, m, H5''), 3.42 (1 H, t, $J=8.8$ Hz, H3''), 3.51 (1 H, dd, $J=8.8, 7.7$ Hz, H2''), 3.61 (1 H, dd, $J=12.1, 6.2$ Hz, H6''a), 3.65 (1 H, m, H4'''), 3.69 (1 H, dd, $J=12.3, 3.1$ Hz, H5''a), 3.91 (1 H, dd, $J=12.1, 1.8$ Hz, H6''b), 4.05 (1 H, d, $J=7.1$ Hz, H1'''), 5.19 (1 H, d, $J=7.7$ Hz, H1''), 6.21 (1 H, d, $J=2.0$ Hz, H6), 6.41 (1 H, d, $J=2.0$ Hz, H8), 6.88 (1 H, d, $J=8.4$ Hz, H5'), 7.69 (1 H, dd, $J=8.4, 2.1$ Hz, H6'), 7.71 (1 H, d, $J=2.1$ Hz, H2')

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 66.8 (C5'''), 69.3 (C6''), 69.7 (C4'''), 71.6 (C3'''), 72.6 (C2'''), 74.2 (C3'''), 75.9 (C2''), 78.2 (C3''), 78.4 (C5''), 95.0 (C8), 100.1 (C6), 104.2 (C1'''), 105.0 (C1'''), 105.9 (C10), 116.2 (C5'), 117.6 (C2'), 123.2 (C1'), 123.7 (C6'), 135.9 (C3), 146.2 (C3'), 150.1 (C4'), 158.6 (C9), 158.9 (C2), 163.2 (C5), 166.3 (C7), 179.6 (C4)

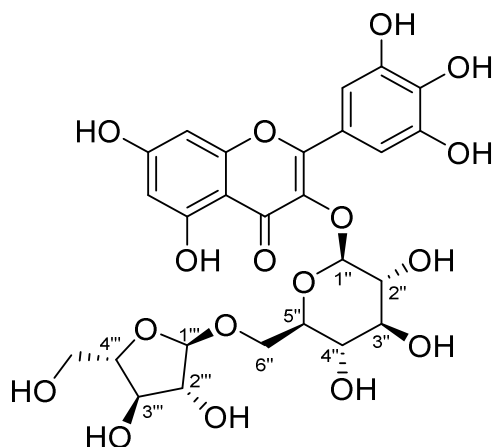
Kaempférol-3-O-vicianoside**(B7)****Origine:** AmB45**Masse isolée:** 1,5 mg**C₂₆H₂₈O₁₅****MM = 580,50 g.mol⁻¹****Synonyme :** Kaempférol-3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside**Aspect:** poudre jaune**UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) :** 198, 166, 348**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 581,1512

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 3.17 (1 H, dd, $J=12.3, 1.5$ Hz, H5'''b), 3.19 (1 H, dd, $J=8.7, 3.7$ Hz, H3'''), 3.39 (1 H, br dd, $J=8.7, 7.1$ Hz, H2'''), 3.41 (1H, br t, $J=8.9$ Hz, H3''), 3.48 (1 H, br dd, $J=9.0, 7.87$ Hz, H2''), 3.61 (1 H, dd, $J=11.8, 6.1$ Hz, H6''a), 3.64 (1 H, m, H4'''), 3.69 (1 H, br dd, $J=12.3, 2.9$ Hz, H5'''a), 3.90 (1 H, br dd, $J=11.8, 1.8$ Hz, H6''b), 4.06 (1 H, d, $J=7.1$ Hz, H1'''), 5.13 (1 H, br d, $J=7.7$ Hz, H2'''), 6.12 (1 H, d, $J=1.8$ Hz, H6), 6.31 (1 H, d, $J=1.8$ Hz, H8), 6.89 (2 H, br d, $J=8.9$ Hz, H3'-H5'), 8.10 (2 H, d, $J=8.9$ Hz, H2'-H6')

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 66.7 (C5'''), 69.2 (C6''), 69.7 (C4'''), 71.5 (C4''), 72.5 (C2'''), 74.1 (C3'''), 75.9 (C2''), 78.2 (C3''), 78.3 (C5''), 96.1 (C8), 101.6 (C6), 104.5 (C1'''), 104.8 (C10), 104.8 (C1''), 116.4(C3'-C5'), 122.9 (C1'), 132.4 (C2'-C6'), 135.5 (C3), 158.3 (C2), 159.0 (C9), 161.9 (C4'), 162.9 (C5), 170,4 (C7), 179.1 (C4)

Myricétine-3-O- α -L-arabinofuranosyl-(1'''' \rightarrow 6''')- β -D-glucopyranoside

(B8)



Origine: AmB35

Masse isolée: 13,9 mg

C₂₆H₁₈O₁₇

MM = 612, 49 g.mol⁻¹

Aspect: poudre jaune

UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) : 207, 260, 356

$[\alpha]_D^{25}$ = -28 (MeOH ; c 0.05)

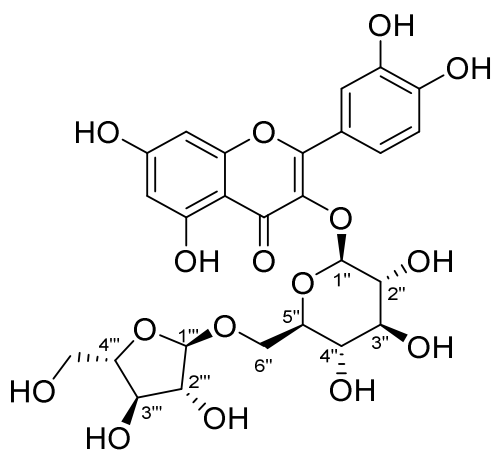
HR- ESI⁺-QTOF (m/z): [M+H]⁺ = 613,1394

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 3.29 (1 H, dd, $J=9.5, 9.1$ Hz, H4''), 3.38 (1 H, ddd, $J=9.1, 6.3, 2.3$ Hz, H5''), 3.42 (1 H, t, $J=9.5$ Hz, H3'''), 3.45 (1 H, br dd, $J=11.0, 6.3$ Hz, H6''a), 3.51 (2 H, dd, $J=9.5, 7.9$ Hz, H2'''), 3.56 (1 H, dd, $J=11.9, 5.0$ Hz, H5'''a), 3.66 (1 H, br dd, $J=11.9, 3.1$ Hz, H5'''b), 3.74 (1 H, dd, $J=5.6, 3.2$ Hz, H3'''), 3.81 (1 H, ddd, $J=5.6, 5.0, 3.1$ Hz, H4'''), 3.84 (1 H, br dd, $J=3.2, 1.0$ Hz, H2'''), 3.85 (1 H, dd, $J=11.0, 2.3$ Hz, H6''b), 4.76 (1 H, d, $J=1.0$ Hz, H1'''), 5.14 (1 H, d, $J=7.9$ Hz, H1''), 6.20 (1 H, d, $J=2.0$ Hz, H6), 6.38 (1 H, d, $J=2.0$ Hz, H8), 7.26 (2 H, s, H2', H6')

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 63.0 (C5'''), 68.4 (C6''), 72.0 (C4''), 75.8 (C2''), 77.4 (C4''), 78.2 (C3'''), 78.7 (C3'''), 83.0 (C2'''), 85.7 (C4'''), 94.9 (C8), 100.0 (C6), 104.5 (C1''), 105.9 (C10), 109.8 (C1'''), 110.4 (C2', C6'), 122.3 (C1'), 135.8 (C3), 138.2 (C4'), 146.5 (C3', C5'), 158.6 (C9), 159.5 (C2), 163.2 (C5), 166.1 (C7), 179.6 (C4)

Quercétine-3-O- α -L-arabinofuranosyl-(1'''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside

(B9)



Origine: AmB40

Masse isolée: 2,9 mg

C₂₆H₂₈O₁₆

MM = 596, 49 g.mol⁻¹

Aspect: poudre jaune

UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) : 204, 256, 355

$[\alpha]_D^{25} = -33$ (MeOH ; c 0.06)

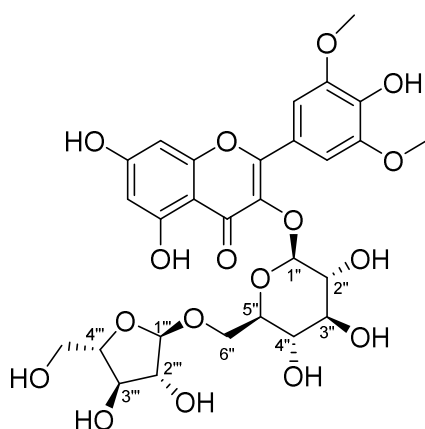
HR-ESI⁺-QTOF (m/z): [M+H]⁺ = 597,1440

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 3.29 (1 H, dd, $J=9.2, 8.8$ Hz, H4''), 3.41 (t, $J=9.2$ Hz, H3''), 3.44 (1 H, dd, $J=11.2, 5.9$ Hz, H6''b), 3.47 (1 H, dd, $J=9.2, 7.8$ Hz, H2''), 3.47 (1 H, m, H5''), 3.56 (1 H, dd, $J=11.9, 4.9$ Hz, H5'''b), 3.65 (1 H, dd, $J=11.9, 3.0$ Hz, H5'''a), 3.74 (1 H, dd, $J=5.4, 3.4$ Hz, H3'''), 3.81 (1 H, m, H4'''), 3.83 (1 H, dd, $J=3.3, 1.3$ Hz, H2'''), 3.85 (1 H, br dd, $J=11.2, 1.7$ Hz, H6''a), 4.75 (1 H, d, $J=1.3$ Hz, H1'''), 5.16 (1 H, d, $J=7.8$ Hz, H1''), 6.21 (1 H, d, $J=2.0$ Hz, H6), 6.40 (1 H, d, $J=2.0$ Hz, H8), 6.87 (1 H, d, $J=8.7$ Hz, H2'), 7.63 (1 H, d, $J=2.1$ Hz, H5'), 7.63 (1 H, dd, $J=8.7, 2.1$ Hz, H6')

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 63.0 (C6'''), 68.4 (C6''), 72.0 (C4''), 75.8 (C2''), 77.4 (C5''), 78.2 (C3''), 78.7 (C3'''), 83.0 (C2'''), 85.8 (C4'''), 95.0 (C8), 100.1 (C6), 104.4 (C1''), 105.9 (C10), 109.8 (C1'''), 116.2 (C2'), 117.7 (C5'), 123.3 (C1'), 123.7 (C6'), 135.7 (C3), 146.0 (C3'), 149.9 (C4'), 158.7 (C9), 159.5 (C2), 163.2 (C5), 166.2 (C7), 179.6 (C4)

Syringetine-3- *O*- α -L-arabinofuranosyl-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside

(B10)

**Origine:** AmB50**Masse isolée:** 1 mg**C₂₈H₃₂O₁₇****MM = 640,55 g.mol⁻¹**

Synonyme : 3',5'-diméthoxy-myricétine-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside

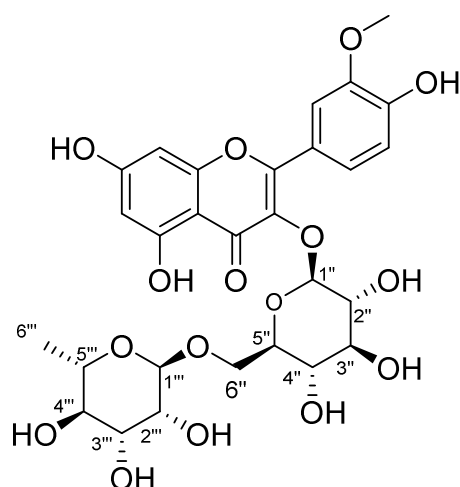
Aspect: poudre jaune

UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) : 207, 253, 360 **HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 641,1721

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 3.29 (1 H, m, H4''), 3.41 (1 H, ddd, $J=8.4, 6.0, 2.3$ Hz, H5''), 3.44 (1 H, t, $J=9.3$ Hz, H3''), 3.48 (1 H, dd, $J=11.5, 6.0$ Hz, H6''b), 3.49 (1 H, m, H2''), 3.52 (1 H, dd, $J=12.0, 5.0$ Hz, H5'''a), 3.62 (1 H, dd, $J=12.0, 3.0$ Hz, H5'''b), 3.71 (1 H, dd, $J=6.3, 3.7$ Hz, H3'''), 3.76 (1 H, ddd, $J=6.3, 5.0, 3.0$ Hz, H4'''), 3.81 (1 H, dd, $J=3.7, 1.7$ Hz, H2'''), 3.87 (2 H, dd, $J=11.5, 2.3$ Hz, H6''a), 3.94 (6 H, s, OCH₃ -3', -5'), 4.73 (2 H, d, $J=1.7$ Hz, H1'''), 5.27 (3 H, br d, $J=7.5$ Hz, H1''), 6.14 (2 H, d, $J=2.0$ Hz, H6), 6.33 (2 H, d, $J=1.8$ Hz, H8), 7.56 (2 H, s, H2', H6')

H6''a

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 57.2 (OCH₃-3', -5'), 62.9 (C5'''), 68.3 (C6''), 72.0 (C4''), 76.1 (C2''), 77.6 (C5''), 78.3 (C3''), 78.5 (C3'''), 83.2 (C2'''), 85.4 (C4'''), 96.0 (C8), 101.5 (C6), 104.5 (C1''), 104.7 (C10), 108.3 (C2', C6'), 109.9 (C1'''), 122.0 (C1'), 132.5 (s), 135.6 (C3), 140.2 (C4'), 148.9 (C3', C5'), 158.1 (C2), 158.9 (C9), 163.0 (C5), 170.4 (C7), 178.9 (C4)

Isorhamnetine-3-O-rutinoside**(B11)****Origine:** AmB50**Masse isolée:** 0,4 mg**C₂₈H₃₂O₁₆****MM = 6424,55 g.mol⁻¹**

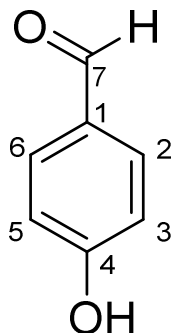
Synonyme : 3'-méthoxy-quercétine-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glucopyranoside

Aspect: poudre jaune

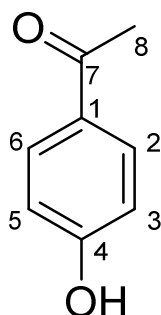
UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) : 205, 256, 357 **HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+H]⁺ = 625,1766

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 1.11 (3 H, br d, $J=6.3$ Hz, H6'''), 3.25 (1 H, t, $J=8.9$ Hz, H4''), 3.26 (1 H, br t, $J=9.3$ Hz, H4'''), 3.38 (1 H, m, H5''), 3.42 (1 H, dd, $J=9.0, 5.0$ Hz, H6''a), 3.42 (1 H, m, H5'''), 3.44 (1 H, m, Hz, H3''), 3.47 (1 H, m, Hz, H2''), 3.49 (1 H, br dd, $J=9.3, 3.4$ Hz, H3'''), 3.62 (1 H, br dd, $J=3.4, 1.1$ Hz, H2'''), 3.82 (1 H, dd, $J=9.0, 1.0$ Hz, H6''b), 3.95 (3 H, s, OCH₃), 4.53 (2 H, d, $J=1.1$ Hz, H1'''), 5.16 (1 H, d, $J=7.5$ Hz, H1''), 6.14 (1 H, d, $J=3.5$ Hz, H6), 6.32 (1 H, d, $J=3.5$ Hz, H8), 6.91 (1 H, br d, $J=8.3$ Hz, H5'), 7.63 (1 H, dd, $J=8.3, 1.5$ Hz, H6'), 7.95 (1 H, br d, $J=1.5$ Hz, H5')

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 18.0 (C6'''), 56.8 (OCH₃), 68.7 (C6''), 69.9 (C5'''), 71.7 (C4''), 72.2 (C2'''), 72.4 (C3'''), 74.0 (C4'''), 76.1 (C2''), 77.5 (C5''), 78.4 (C3''), 96.0 (C8), 101.5 (C6), 102.7 (C1'''), 104.6 (C10), 105.0 (C1''), 114.6 (C2'), 116.3 (C5'), 123.1 (C6'), 124.1 (C1'), 135.5 (C3), 148.5 (C4'), 151.2 (C3'), 158.5 (C2), 159.0 (C9), 162.9 (C5), 170.5 (C7), 179.0 (C4)

p*-hydroxybenzaldéhyde*(D1)****Origine:** AmD4**Masse isolée:** 1,3 mg**C₇H₆O₂****MM = 122,12 g.mol⁻¹****Synonyme :** 4-hydroxybenzaldéhyde**Aspect:** poudre amorphe beige**UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) :** 196, 221, 284**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+Na]⁺ = 145,0242**RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm :** 6.91 (2 H, d, *J*=8.6 Hz, H3, H5), 7.77 (2 H, d, *J*=8.6 Hz, H2, H6), 9.75 (1 H, s, C7)**RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm :** 117.2 (C3, C5), 130.2 (C1), 133.6 (C2, C6), 165.8 (C4), 193.0 (C7)

Picéol (D2)



Origine: AmD4

Masse isolée: 1,2 mg

C₈H₈O₂

MM = 136,15 g.mol⁻¹

Synonyme : *p*-hydroxyacétophénone

Aspect: poudre amorphe beige

UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) : 199, 219, 274

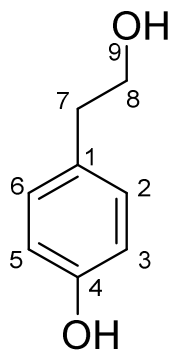
HR-ESI⁺-QTOF (m/z): [M+Na]⁺ = 137,0601

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 2.52 (3 H, s, H8), 6.83 (1 H, d, *J*=8.9 Hz, H3, H5), 7.88 (1 H, d, *J*=8.9 Hz, H2, H6)

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : 26.4 (C8), 116.5 (C3, C5), 130.2 (C1), 132.3 (C2, C6), 164.4 (C4), 199.6 (C7)

Tyrosol

(D3)



Origine: AmD6

Masse isolée: 0,9mg

C₈H₁₀O₂

MM = 138,17 g.mol⁻¹

Synonyme : *p*-hydroxyphényléthanol

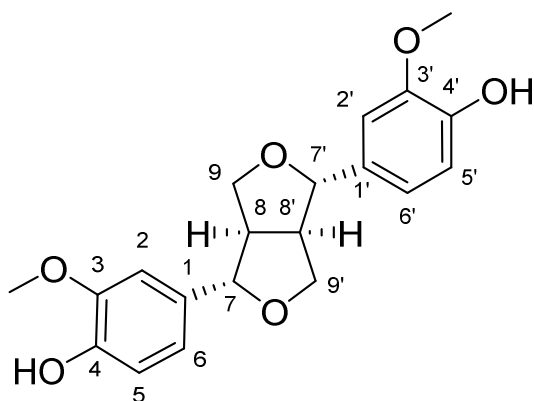
Aspect: poudre amorphe beige

UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) : 193, 221, 277

HR-ESI⁺-QTOF (m/z): [M+H]⁺ = 139,0751

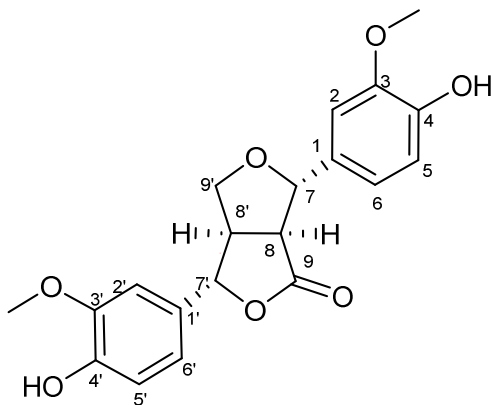
RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm : 2.71 (2 H, t, *J*=7.2 Hz, H7), 3.68 (2 H, t, *J*=7.2 Hz, H8), 6.70 (2 H, d, *J*=8.4 Hz, H3, H5), 7.03 (2 H, d, *J*=8.4 Hz, H2, H6)

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ ppm : δ ppm 39.6 (C7), 64.7 (C8), 116.3 (C3, C5), 131.0 (C2, C6), 131.1 (C1), 156.9 (C4)

Pinorésinol**(D4)****Origine: AmD7****Masse isolée: 1,8****C₂₀H₂₂O₆****MM = 358,39 g/mol****Synonyme :** 7,9',7',9-diepoxy-3,3'-diméthoxy-4,4'-lignandiol**Aspect:** beige $[\alpha]_D^{25} = 1,27$ (MeOH; c 0.13)UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) : 199, 230, 281**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+Na]⁺ = 381,1296

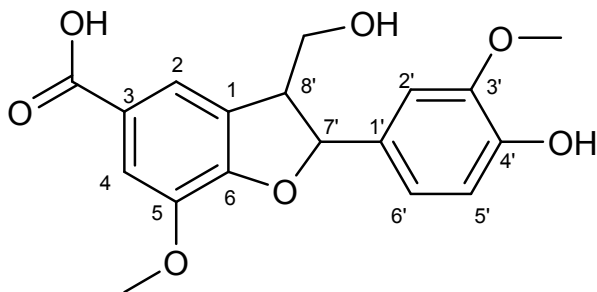
RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ : 3.15 (2 H, m, H8, H8'), 3.84 (2 H, dd, $J=9.2, 3.7$ Hz, H9b, H9b'), 3.86 (6 H, s, 2 OMe), 4.23 (2 H, m, H9a, H9a'), 4.71 (2 H, d, $J=4.3$ Hz, H7, H7'), 6.77 (2 H, d, $J=8.0$ Hz, H2, H2'), 6.81 (2 H, dd, $J=8.0, 1.8$ Hz, H6, H6'), 6.95 (2 H, d, $J=1.8$ Hz, H5, H5')

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ : 55.5 (C8, C8'), 56.5 (2 OMe), 72.7 (C9, C9'), 87.7 (C7, C7'), 111.0 (C2, C2'), 116.2 (C5, C5'), 120.2 (C6, C6'), 133.9 (C1, C1'), 147.4 (C4, C4'), 149.2 (C3, C3')

Balanophonine B**(D5)****Origine: AmD7****Masse isolée: 1,5****C₂₀H₂₀O₇****MM = 372,37 g/mol****Synonyme :** 7,9'-Epoxy-4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-9,7'-lignanolid**Aspect:** poudre blanchâtre $[\alpha]_D^{25} = 7,74$ (MeOH; c 0.05)**UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) :** 202, 234, 281**HR-ESI⁺-QTOF (m/z):** [M+Na]⁺ = 373,1289

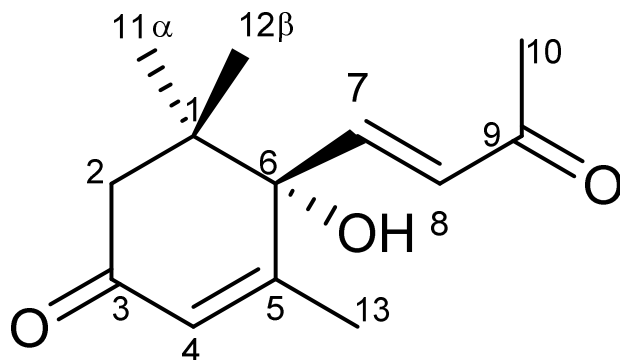
RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ : 3.35 (1 H, m, H8'), 3.67 (1 H, m, H8), 3.86 (3 H, s, OMe'), 3.87 (3 H, s, OMe), 4.03 (1 H, dd, $J=9.5, 4.3$ Hz, H9'a), 4.29 (1 H, dd, $J=9.5, 7.0$ Hz, H9'b), 5.24 (1 H, d, $J=4.0$ Hz, H7), 5.40 (1 H, d, $J=4.0$ Hz, H7'), 6.79 (1 H, d, $J=7.9$ Hz, H5), 6.83 (1 H, m, H5'), 6.83 (1 H, m, H6'), 6.85 (1 H, dd, $J=7.9, 2.1$ Hz, H6), 6.95 (1 H, d, $J=1.8$ Hz, H2'), 6.97 (1 H, d, $J=2.1$ Hz, H2)

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ : 51.2 (C8'), 54.6 (C8), 56.5 (OMe), 56.6 (OMe'), 73.9 (C9), 85.2 (C7), 87.3 (C7'), 110.7 (C2'), 110.7 (C2), 116.3 (C5), 116.5 (C5'), 119.6 (C6), 119.9 (C6'), 132.6 (C1'), 133.3 (C1), 147.6 (C4), 148.3 (C4'), 149.3 (C3'), 149.5 (C3), 179.9 (C9)

Ceplignane**(D6)****Origine: AmD14****Masse isolée: 1,1mg****C₁₈H₁₈O₇****MM = 346,34 g/mol****Aspect:** poudre blanchâtre $[\alpha]_D^{25} = 9,66$ (MeOH; c 0.08)UV λ_{\max} (CH₃OH, nm) : 202, 218, 275HR-ESI⁺-QTOF (m/z): [M+H]⁺ = 347,1117

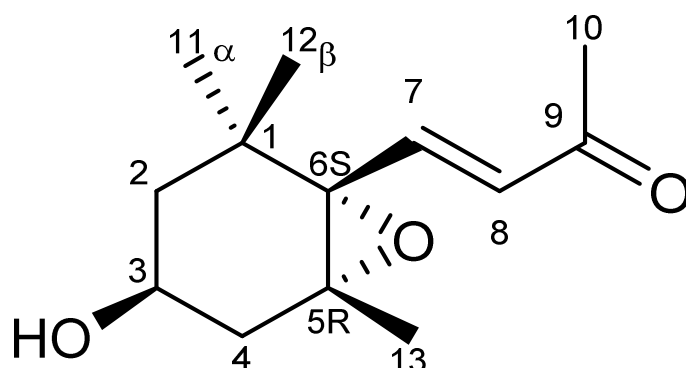
RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ : 3.54 (1 H, m, H8'), 3.80 (1 H, m, CH₂OH), 3.81 (3 H, s, OMe'), 3.86 (1 H, m, CH₂OH), 3.90 (3 H, s, OMe), 5.61 (1 H, d, $J=6.1$ Hz, H7'), 6.77 (1 H, d, $J=8.0$ Hz, H5'), 6.83 (1 H, br dd, $J=8.0, 1.9$ Hz, H6'), 6.95 (1 H, d, $J=1.9$ Hz, H2'), 7.53 (1 H, br s, H2), 7.57 (1 H, br s, H4)

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ : 55.2 (C8), 56.5 (OMe'), 56.7 (OMe), 65.0 (CH₂OH), 90.0 (C7), 110.7 (C2'), 115.4 (C4), 116.3 (C5'), 119.9 (C6'), 120.1 (C2), 129.4 (C1), 134.7 (C1'), 144.8 (C5), 147.7 (C4'), 149.3 (C3'), 152.0 (C6), 175,2 (COOH)

Dehydrovomifoliol**(D7)****Origine: AmD6****Masse isolée: 0,7 mg****C₁₃H₁₈O₃****MM = 222,28 g/mol****Aspect: huileux α****[α]_D²⁵ = 46 (CHCl₃; c 0.05)****UV λ_{max} (CH₃OH, nm) : 241****HR-ESI⁺-QTOF (m/z): [M+H]⁺ = 223,1343**

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ : 1.02 (3 H, s, H12), 1.06 (3 H, s, H11), 1.90 (3 H, d, *J*=1.2 Hz, H13), 2.28 (1 H, d, *J*=17.1 Hz, H2a), 2.31 (3 H, s, H10), 2.60 (1 H, br d, *J*=17.1 Hz, H2b), 5.94 (1 H, s, H4), 6.44 (1 H, d, *J*=15.7 Hz, H8), 6.99 (1 H, d, *J*=15.7 Hz, H7)

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ : 19.3 (C13), 23.7 (C11), 24.9 (C12), 27.8 (C10), 42.8 (C1), 50.7 (C2), 80.1 (C6), 128.2 (s), 131.9 (C8), 148.5 (C7), 164.8 (C5), 200.5 (C3), 200.9 (C9)

9-cétone-5,6-epoxy-3-hydroxy- β -ionol**(D8)****Origine: AmD6****Masse isolée: 1,4 mg****C₁₃H₂₀O₃****MM = 224,30 g/mol****Aspect: poudre blanchâtre** **$[\alpha]_D^{25} = -83.2$ (MeOH ; c 0.08)****UV λ_{max} (CH₃OH, nm) : 237****HR-ESI⁺-QTOF (m/z): [M+H]⁺ = 225,1509**

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ : 0.96 (3 H, s, H11), 1.18 (3 H, s, H13), 1.19 (3 H, s, H12), 1.27 (1 H, m, H2a), 1.58 (1 H, ddd, $J=12.8, 3.4, 1.8$ Hz, H2b), 1.66 (1 H, dd, $J=16.0, 9.2$ Hz, H4a), 2.29 (3 H, s, H10), 2.30 (1 H, ddd, $J=16.0, 4.9, 1.8$ Hz, H4b), 3.77 (1 H, m, H3), 6.18 (1 H, d, $J=15.9$ Hz, H8), 7.17 (1 H, d, $J=15.9$ Hz, H7)

RMN ¹³C (125MHz, CD₃OD) δ : 20.2 (C13), 25.3 (C11), 27.6 (C10), 29.9 (C12), 36.2 (C1), 41.5 (C4), 47.8 (C2), 64.5 (C3), 68.9 (C5), 71.0 (C6), 133.9 (C8), 145.6 (C7), 200.4 (C9)

V. Essais biologiques

A. Activités anti-oxydantes

1. Test de réduction du radical DPPH

Principe :

Le DPPH est un radical libre, stable, de couleur violette. Si l'échantillon à évaluer contient une ou plusieurs substance(s) anti-radicalaire(s), celle(s)-ci réduisent le radical DPPH par capture d'un atome d'hydrogène, formant la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (DPPH-H) incolore; la solution passe alors du violet au jaune pâle. Le suivi de la réaction se réalise par mesure des absorbances en spectrophotométrie visible à 544 nm permettant de calculer le pourcentage d'inhibition du DPPH qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon. A noter que ce test est aspécifique et non représentatif de l'activité anti-oxydante dans un système biologique complexe.

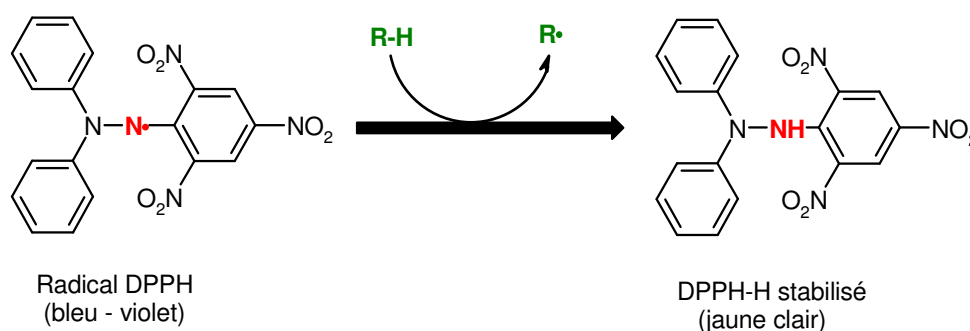


Figure 4.4 : Mécanisme réactionnel du test DPPH

Protocole:

Le test a été réalisé suivant une méthode modifiée et miniaturisée à partir des travaux de Parejo et al. (Parejo et al., 2003, 2004).

50 μ L d'une solution méthanolique de l'extrait ou de la molécule à évaluer à différentes concentrations, sont mélangés avec 100 μ L d'une solution méthanolique de DPPH (Aldrich) à 20 mg/L dans une plaque 96 puits (Greiner Bio-One 655-101). Après homogénéisation, la plaque a été incubée pendant 20 minutes, à température ambiante et à l'abri de la lumière. La

lecture de la densité optique (DO) a été effectuée à 544 nm à l'aide d'un spectrophotomètre *Versa max microplate reader*.

Le blanc est composé de 50µL de MeOH et 100 µL de solution de DPPH.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé suivant l'équation :

$$I\% = \frac{(\text{Absorbance DPPH}^{\cdot} \text{ blanc} - \text{Absorbance DPPH}^{\cdot} + \text{extrait}) \times 100}{\text{Absorbance DPPH}^{\cdot} \text{ blanc}}$$

Puis la droite d'étalonnage % I = f (concentration échantillon testée) a été tracée afin de déterminer les CI₅₀ des extraits ou molécule. L'expérience a été réalisée en triplicat et une moyenne a été faite sur les absorbances mesurées.

Les conditions expérimentales ont été validées en utilisant le quercétol (FLUKA) comme témoin positif pour lequel la CI₅₀ obtenue est similaire aux données de la bibliographie (Ngom, 2008).

2. Test de capacité d'absorption des radicaux oxygénés (ORAC)

Tests réalisés par la société Phytodia (Illkirch, France)

Principe :

Le test ORAC est un test permettant de déterminer le pouvoir antioxydant d'un extrait ou d'une molécule. Il repose sur la capacité de l'échantillon testé à limiter la dégradation du signal fluorescent de la fluorescéine induite par un générateur de radicaux libres, l'AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride). Le trolox, un dérivé hydrosoluble de la vitamine E, a été utilisé comme composé de référence. Les valeurs obtenues sont exprimées en « équivalent µmole de trolox » par litre ou par gramme de matière.

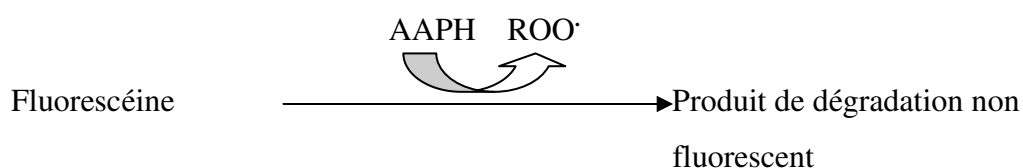


Figure 4.5 : Schéma de dégradation de la fluorescéine.

Protocole :

Les différentes dilutions des échantillons et du standard de trolox ont été pré-incubées avec la solution de fluorescéine. Ensuite, la solution d'AAPH a été ajoutée au milieu. Une mesure de la fluorescence à 485 nm en excitation et à 528 nm en émission est réalisée sur une cinétique d'une heure.

Les courbes RFU = f (temps) ont été tracées et les intégrales de la fluorescence sur un intervalle de temps défini ont été déterminées à l'aide d'un logiciel. Ensuite les courbes suivantes ont été tracées : $AUC = f(C^{\circ}_{\text{échantillon}})$. Les paramètres (a et b) de la droite de régression $y = ax + b$ de la partie linéaire de la courbe $AUC = f(C^{\circ}_{\text{trolox}})$ ont été déterminés. La moyenne des différents points mesurés dans la partie linéaire des AUC des échantillons a été reportée sur le graphe du trolox. Ensuite les résultats ont pu être exprimés en équivalent μ mole de trolox par gramme de matière, ce qui correspond à l'indice ORAC.

Les tests ont été réalisés en triplicat.

B. Activité anti-métalloprotéinases matricielles (MMP)

Tests réalisés au sein de l'unité sciences de vivant de Seppic (Castres).

1. Test anti-élastase

Principe :

L'élastase utilisée a été purifiée à partir du pancréas de porc, et l'élastine à partir de ligaments du cou de bovins. L'élastine est couplée à un fluorochrome (BODIPY®FL). La fluorescence est révélée du fait de la digestion de l'élastine par l'élastase. Elle est mesurée avec le Fluoroskan Ascent FI (Labsystem) à 495 nm en excitation et à 545 nm en émission. L'augmentation de la fluorescence est proportionnelle à l'activité de l'élastase. Une diminution de la fluorescence est attendue en présence d'un actif présentant un effet anti-élastase.

Le test est validé par l'utilisation d'un inhibiteur anti-élastase de référence fourni dans le kit : le N-méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Prop-Val-chlorométhyl kétone (NMAAPVCK).

Les mesures ont pour but de déterminer, après le tracé d'une courbe dose-effet, la concentration de l'actif qui inhibe 50% de l'activité de l'élastase (CI_{50}).

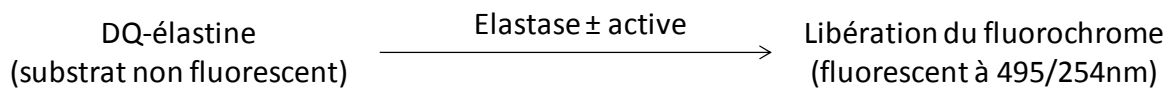


Figure 4.6 : Schéma de dégradation de l'élastine

Protocole :

L'activité anti-élastase a été évaluée à l'aide d'un kit commercial (Enzcheck Elastase Assay Kit, Molecular Probes, référence E-12056). La réaction a été faite à température ambiante, en microplaque de 96 puits, à l'abri de la lumière.

Pour chaque échantillon, les valeurs du blanc, composé du mélange de réactif sans extrait, correspondant ont été soustraites.

Calcul du pourcentage d'inhibition de l'activité de l'élastase:

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - \frac{\text{Activité élastase du groupe Produit}}{\text{Activité élastase du groupe Témoin}} \times 100$$

Le test a été réalisé en triplicat.

2. Test anti-collagénase

Principe :

La collagénase utilisée a été purifiée à partir d'un champignon (*Clostridium histolyticum* ; MMP-n°3), la gélatine à partir de peau de porc, le collagène de type I à partir de peau de bœuf, et le collagène de type IV à partir de placenta humain. Les substrats (gélatine, collagène I ou collagène IV) sont conjugués à la fluorescéine. La fluorescence est révélée par la digestion du substrat par la MMP, et mesurée avec le Fluoroskan Ascent FL (Labsystem) à 495 nm pour l'excitation et 545 nm pour l'émission. L'augmentation de la fluorescence est

proportionnelle à l'activité de la MMP. Une diminution de cette fluorescence est attendue en présence d'un actif présentant un effet anti-MMP.

Le test est validé par l'utilisation d'un inhibiteur anti-MMP de référence fourni dans le kit : la 1,10-phénanthroline. Le test fonctionne également avec les inhibiteurs naturellement présents dans la peau, les TIMPs (Tissue Inhibitors of MMPs).

Les mesures permettent de déterminer, après le tracé d'une courbe effet-dose, la concentration de l'actif qui inhibe de 50% l'activité de la collagénase (CI₅₀).

Protocole :

L'activité anti-collagénase a été évaluée à l'aide d'un kit commercial (EnzCheck™ gélatinase/collagénase Assay Kit, Molecular Probes, référence E-12055).

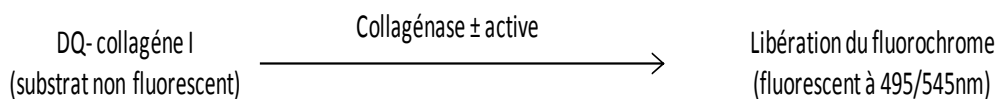


Figure 4.7 : Schéma de dégradation de la collagénase

La réaction a été faite à température ambiante, en microplaque de 96 puits, à l'abri de la lumière.

Pour chaque échantillon, les valeurs du blanc, composé du mélange de réactif sans extrait, correspondant ont été soustraites.

Calcul du pourcentage d'inhibition de l'activité de la collagénase :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - \frac{\text{Activité collagénase du groupe Produit}}{\text{Activité collagénase du groupe Témoin}} \times 100$$

Le test a été réalisé en triplicat.

C. Activité anti-inflammatoire

Tests réalisés au sein de la plateforme PCBIS (Illkirch, France).

1. Dosage de la sécrétion de monoxyde d'azote par des macrophages murins

Principe :

La quantification du NO est délicate du fait de son caractère labile et de sa présence en faible quantité dans les milieux biologiques. Pour ces raisons, la formation du NO est classiquement évaluée de manière indirecte, par la détermination des concentrations de nitrites (NO_2^-) qui constituent un des produits de dégradation oxydative du NO.

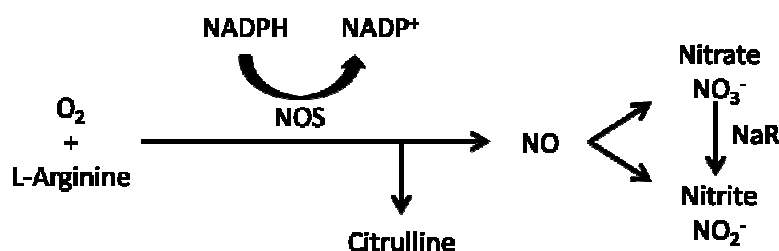


Figure 4.8 : Schéma de formation et de dégradation du monoxyde d'azote (NOS : oxyde nitrique synthase, NaR : nitrite réductase)

La technique la plus couramment utilisée pour doser les nitrites est la réaction de Griess : les nitrites forment un sel de diazonium avec l'acide sulfanillique qui est ensuite couplé avec une amine (N-naphtyléthylène diamine) pour donner un colorant azoïque qui absorbe à 540 nm.

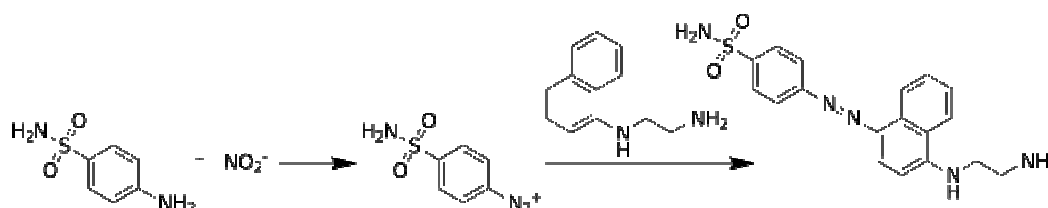


Figure 4.9 : Réaction de Griess

Protocole :

Des macrophages murins RAW 264,7 (ATCC TIB-71) ont été utilisés pour réaliser les tests anti-inflammatoires. Le milieu de culture contenait du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 4,5 g/L de glucose sans rouge de phénol (Invitrogen 31053028), 10% FBS (sérum foetal bovin) non dé-complémenté (Invitrogen 10270-106), 100 U/mL de pénicilline, 100

$\mu\text{g/mL}$ de streptomycine (Invitrogen 15140122), 4 mM de glutamine (Invitrogen 25030024) et 1 mM de pyruvate de sodium (Lonza BE13-115E). Les cellules ont été traitées avec 5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS (lipopolysaccharide) de *Salmonella enterica* sérotype *abortus equi* (Sigma L-6636), puis incubées : 24 H à 37 °C sous 5% CO_2 . Le dosage des nitrites est ensuite effectué par réaction de Griess (Invitrogen G-7921) à 544 nm (Victor Wallac 1420 lutilabel counter). Le quercétol a été utilisé comme référence (Sigma M7033).

2. Dosage de la sécrétion de cytokines par des cellules mononuclées humaines

Principe:

Le dosage de cytokines sécrétées par des PBMC peut être réalisé avec la technologie HTRF (Homogenous Time Resolved Fluorescence) (CisBio international). Deux fluorophores partenaires donneur (cryptate d'euporium) / accepteur (XL665) sont fusionnés respectivement à un anticorps spécifique de la protéine à doser. Le transfert d'énergie en temps retardé (TR-FRET) entre le couple de fluorophores est proportionnel à la concentration en cytokine présente dans l'échantillon.

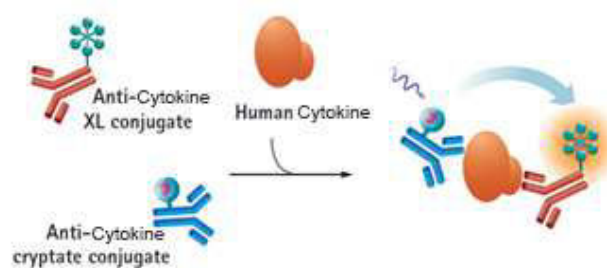


Figure 4.10 : Technologie HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence)

En parallèle, la cytotoxicité des extraits/molécules a été déterminée par le test WST-1 (Water Soluble Tetrazolium Salts) (Berridge et al., 2005). Ce test est basé sur le clivage par la succinate deshydrogénase mitochondriale, d'un sel de tétrazolium de couleur rouge en cristaux de formazan de couleur jaune. La réaction est quantifiée par mesure de l'absorbance à 450 nm des cristaux solubles dans le milieu de culture qui est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. A la différence du MTT, le WST-1 est un sel de tétrazolium capable d'être clivé par les cellules vivantes en formazan soluble, il n'y a donc pas d'étape de solubilisation ultérieure dans un solvant organique.

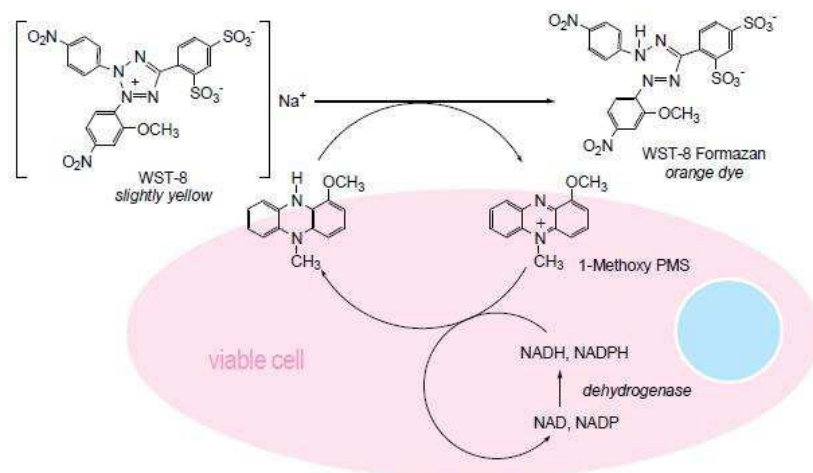


Figure 4.11 : Principe du test de viabilité cellulaire WST-1

Protocole:

Les cellules mononuclées humaines ont été isolées sur gradient de densité FICOLL à partir de sang humain (HISTOPAQUE SIGMA H8889).

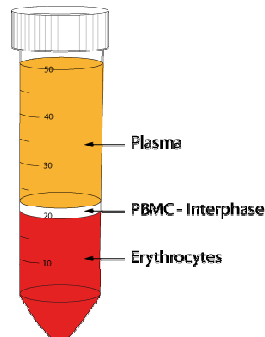


Figure 4.12 : Répartition du sang sur gradient de FICOLL

80 000 cellules par puits ont été déposées dans une plaque 96 puits GREINER 675161. Ensuite les cellules ont été traitées avec les extraits ou les molécules de façon à avoir 5, 10 et 50 $\mu\text{g/mL}$ (DMSO 0,1%) final sur les cellules. La dexaméthasone a été utilisée comme témoin positif. Puis les cellules ont été stimulées avec 5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS (Sigma L6636) avant d'être incubées 24H à 37 °C sous 5% CO_2 .

Ensuite les surnageants cellulaires ont été récupérés et un test de viabilité cellulaire (WST-1 OZYME 630118) a été effectué. Enfin, les cytokines sécrétées ont été dosées par HTRF (CISBIO) avec 615 nm comme longueur d'onde d'émission 1 (émission du fluorophore

donneur) et 665 nm comme longueur d'onde d'émission 2 (émission du fluorophore accepteur). La sécrétion des cytokines suivantes a été étudiée : TNF- α (facteur de nécrose tumorale) ; IL-6 (interleukine); IL-10; IFN- γ (interféron).

D. Activité cicatrisante

Tests réalisés au sein de la plateforme PCBIS (Illkirch, France).

Principe :

L'activité cicatrisante a été déterminée avec un IncuCyte (Essen Bioscience) sur des kératinocytes. Cet appareil permet de réaliser des cinétiques de la prolifération cellulaire dans des conditions de culture classiques en quantifiant la confluence des cellules.

Protocole:

Les tests de prolifération cellulaire ont été réalisés avec des kératinocytes (NHEK adult single donor, PROMOCELL C-12003). 60 000 cellules par puits recouvert au collagène ont été déposées (plaque 24 puits ImageLock), puis incubées 65h à 37 °C. Ensuite les cellules ont été traitées avec du milieu sans sérum et de l'EGF (Facteur de Croissance Epidermique) pendant 30h afin de stopper la prolifération cellulaire. Une blessure du tapis cellulaire a été réalisée avec le système ESSEN BIOSCIENCE et les cellules ont été traitées avec 10 et 50 μg d'extraits ou de molécules / mL (3 points par concentration ; DMSO 0,1%). L'EGF à 20 ng/mL a été utilisé comme témoin positif. La fermeture de la blessure est suivie avec l'IncuCyte.

E. Evaluation de la photo-toxicité

Tests réalisés au sein de l'unité sciences de vivant de Seppic (Castres).

Principe :

La photo-toxicité est déterminée en mesurant la viabilité cellulaire de fibroblastes avec ou sans irradiation aux UV-A. La viabilité cellulaire est mesurée à l'aide du test MTT (van Meerloo et al., 2011). Le principe de ce test repose sur la réduction du MTT par les déshydrogénases cellulaires fonctionnelles et la formation de bleu de formazan quantifiable par spectrophotométrie à 540 nm.

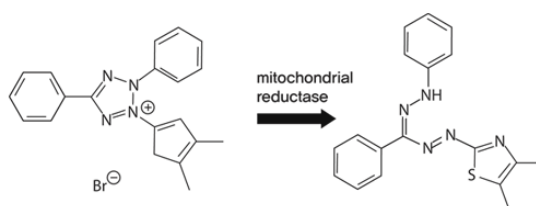


Figure 4.13: Test de viabilité cellulaire MTT

Protocole :

Ce test a été réalisé en plaque 96 puits. Le témoin positif utilisé est le chlorhydrate de chlorpromazine.

Les fibroblastes PFHN11001 (30 ans en moyenne) ont été utilisés pour la mesure de la photo-toxicité. Ces derniers, après un traitement de 1h avec différents extraits, ont été mis en présence d'UVA à 1 J/cm². 24h après l'irradiation, les tapis et surnageants ont été récupérés et la viabilité des cellules a été évaluée. Un test de réduction du MTT est effectué pour mesurer la toxicité.

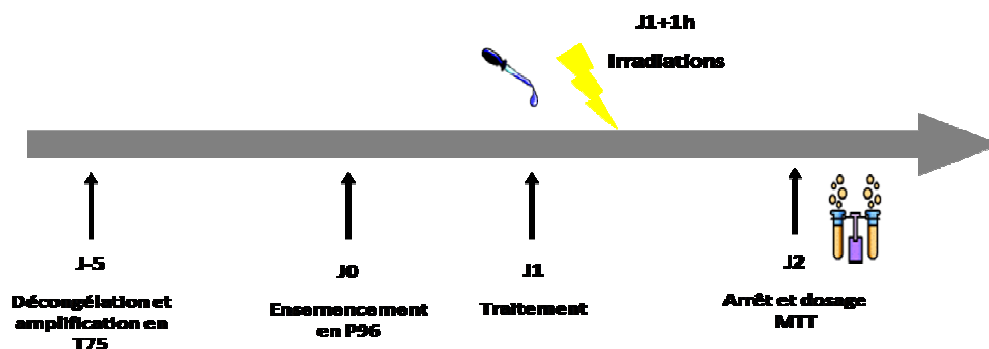


Figure 4.14 : Chronologie de l'évaluation de la photo-toxicité d'extraits sur des fibroblastes.

Le pourcentage de viabilité cellulaire a été déterminé de la manière suivante :

$$\%viabilité = \frac{\text{moyenne } DO \text{ condition à l'essai} \times 100}{\text{moyenne } DO \text{ témoin}}$$

Les mesures permettent de déterminer, après le tracé d'une courbe effet-dose, la concentration à laquelle la viabilité cellulaire est réduite de moitié (CI₅₀). Ensuite, le facteur de photo-irritation (PIF) a été calculé:

$$PIF = \frac{CI50 (-irradiation)}{CI50 (+irradiation)}$$

Si :

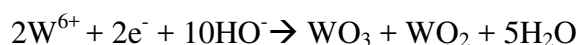
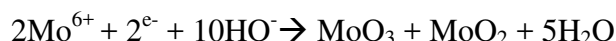
- PIF < 2 → aucune phototoxicité
 2 < PIF < 5 → phototoxicité probable
 PIF > 5 → Phototoxicité

VI. Dosages de métabolites secondaires

A. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols a été déterminée par la méthode adaptée et miniaturisée (plaque 96 puits) de Folin-Ciocalteu (Popova et al., 2004). Ce test repose sur l'oxydation des composés phénoliques par le réactif de Folin-Ciocalteu qui est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (W) et d'acide phosphomolybdique (Mo). La réaction d'oxydation provoque une coloration bleue due à la présence de molybdotungstophosphate.

L'oxydation se fait suivant la réaction suivante :



Dans chaque puits ont été placés 2 µL d'extrait, 10 µL du réactif de Folin, 30 µL d'une solution de carbonate de sodium à 20% et 158 µL d'eau. Une gamme étalon de 7 points a été

réalisée avec de l'acide gallique (0 à 2 mg/mL). La plaque est incubée à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante avant de lire les absorbances à 760 nm grâce à un spectrophotomètre VersaMax. Les dosages ont été faits en triplicate. Les résultats sont exprimés en mg GAE / g ES (milligrammes d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec).

B. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été déterminée par le test au chlorure d'aluminium miniaturisé (plaque 96 puits) (Popova et al., 2004). Le chlorure d'aluminium a la capacité de former des complexes stables avec les flavonoïdes ce qui entraîne une coloration jaune. Dans chaque puits ont été placés 100 µL d'extrait, 20 µL d'une solution d'AlCl₃ à 2%, 4 µL d'une solution d'acétate de sodium 1M et 76 µL d'eau. Une gamme étalon de 7 points a été réalisée avec de la quercétine (0 à 40 µg/mL). La plaque est incubée à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante avant de lire les absorbances à 420 nm grâce à un lecteur VersaMax. Les dosages ont été faits en triplicat. Les résultats sont exprimés en mg quercétine / g ES (milligrammes de quercétine par gramme d'extrait sec).

C. Dosage des acides dicaféoylquiniques

1. Conditions chromatographiques

La teneur en acides dicaféoylquiniques dans les cellules élicitées d'*H. stoechas* (§ VI.B.4) a été déterminée par un dosage HPLC-DAD sur l'HPLC Agilent décrite précédemment (II. C. 2) avec le gradient 6. Pour chacun des trois isomères, des droites d'étalonnage ont été tracées en se basant sur les aires de pics des chromatogrammes obtenus à 320 nm. Une gamme de 3,5-diCQA allant de 10 à 300 µg/mL, une de 3,4-diCQA allant de 5 à 50 µg/mL et une de 4,5-diCQA allant de 5 à 50 µg/mL, sont préparées. Les standards utilisés pour le dosage ont été achetés chez Biopurify (Chengdu, China) (pureté > 95%).

2. Validation de la méthode pour chaque isomère

- Sélectivité

La sélectivité a été vérifiée en utilisant un extrait de cellules d'*H. stoechas* et un mélange des isomères de di-CQA. La résolution maximale a été observée à 320 nm.

- Linéarité

La linéarité a été vérifiée en injectant en triplicat 7 ou 8 concentrations, puis en traçant une droite de calibration (régression linéaire) avec l'aire des pics en fonction de la concentration, puis le coefficient de détermination R^2 a été calculé.

- Sensibilité

La sensibilité a été définie par les LOD et LOQ qui ont été déterminées par le calcul (Gouveia and Castilho, 2012):

$$\text{LOD} = \frac{3.3\sigma}{S} \quad \text{LOQ} = \frac{10\sigma}{S}$$

Avec σ : l'écart type

S: la pente de la droite de régression

- Répétabilité

Les points de gamme extrêmes ont été choisis pour tester la répétabilité. Ainsi, la répétabilité a été déterminée en calculant sur 5 réplicats de chaque concentration injectés le même jour (répétabilité intra-day) et sur 5 réplicats de chaque concentration injectés 5 jours successifs (répétabilité inter-day).

$$(\% \text{ RSD}) = \frac{\sigma}{\Sigma} \times 100$$

Avec σ : l'écart type

Σ : la moyenne

- Justesse

La justesse a été évaluée en calculant le pourcentage de recouvrement d'extraits dopés préalablement avec des standards. Les extraits ont été analysés en triplicate.

$$\% \text{ recouvrement} = \frac{\text{Aire obtenue}}{\text{Aire attendue}} \times 100$$

VII. Culture végétale *in vitro*

Toutes les étapes de CVIV ont été réalisées dans une enceinte climatique Panasonic MLR 352 qui permet de régler la température, la photopériode et l'intensité lumineuse.

A. *Armeria maritima*

1. Conditions de culture

La germination des graines d'*A. maritima* a été réalisée à 25 °C et une intensité lumineuse constante de 5000 lux soit 50 $\mu\text{moles photons /m}^2/\text{s}$.

La callogénèse et la mise en suspension ont été réalisées à 20 °C et à l'obscurité.

La callogenèse et la germination ont été réalisées dans des boîtes de Petri standards de diamètre 96 mm.

Tableau 4.7 : Récapitulatif des conditions de culture d'*A. maritima*

Expérience	Température	Luminosité
Germination	25 °C	50 $\mu\text{moles photons /m}^2/\text{s}$ (24H/24)
Callogénèse	20 °C	obscurité
Mise en suspension	20 °C	obscurité

2. Préparation des explants

Les graines ont été stérilisées pendant 5h sous agitation dans une solution de PPMTM (plant preservative mixture) (Plant cell technology, Washington, USA) à 0,05%. Elles ont ensuite été rincées trois fois cinq min dans de l'eau stérile sous agitation avant d'être conservées 24h à 4°C. Les graines ainsi stérilisées ont ensuite été utilisées soit directement comme explant, soit pour l'obtention de plantules axéniques en les faisant germer sur milieu sans hormone.

Les feuilles de plante ont été nettoyées 30 s dans l'EtOH 70%, puis 7 min dans de l'eau de javel 3,2% additionnée de 0,1% de tween 20 (détergent). Ensuite les feuilles ont été rincées trois fois trois min dans de l'eau stérile.

Les explants foliaires déposés faisaient en moyenne 3 x 6 mm.

3. Composition des milieux de culture

Le milieu de base suivant a été utilisé (Aly et al., 2002) :

Tableau 4.8 : Composition du milieu de culture A

Constituants		Référence	Concentration
Milieu minéral + Vit	MS + Vit	Sigma (M5519)	4,4 g/L
Sucre	Saccharose	Sigma (S7903)	30 g/L
Auxine	2,4-D	Duchefa Biochemie (D0911.0110)	4,5 μ M
Cytokinine	KIN	Duchefa Biochemie (K0905.0001)	0,93 μ M
Agent gélifiant	Agar	Sigma (A4550)	8 g/L

Le pH a toujours été ajusté à 5,8 à l'aide de solutions de NaOH 1N et HCl 1N.

Les milieux ont été stérilisés à l'autoclave pendant 20 min à 120°C à 1 bar.

Ce milieu M1 a également été utilisé sans agar pour les suspensions cellulaires.

A partir de ce milieu, différentes modifications qualitatives ont été réalisées, en faisant varier la nature des composants du milieu de culture. Celles-ci sont présentées dans les tableaux ci-contre. Des combinaisons ont également été faites, elles sont présentées dans la partie résultats.

Tableau 4.9 : Synthèse des différents constituants du milieu de culture testés lors de l'optimisation de la callogénèse d'*A. maritima*

Milieux minéraux		
Nature	Fournisseurs	Concentration
MS + Vit	Sigma (M5519)	4,4 g/L
MS 1/2	Sigma	
Macro-éléments	(M0654)	50 mL/L
Micro-éléments	(M0529)	100 mL/L
Vitamines MS	(M3900)	1 mL/L
Gamborg's B5	Sigma (G5768)	3,1 g/L
Vitamines B5	Sigma (G1019)	1 mL/L
McCown's WPM	Sigma	
Media	(M6774)	2,3 g/L
+ Vitamines MS	(M3900)	1 mL/L
Sucres (30 g/L)		
Nature	Fournisseurs	
Saccharose	Sigma (S7903)	
Glucose	Sigma (G7021)	
Maltose	Sigma (M5895)	
Auxines (4,5 µM)		
Molécule	Solvant de solubilisation	Fournisseur
2,4 -D	EtOH	Duchefa Biochemie (D0911.0110)
AIA	EtOH	Duchefa Biochemie (I0901.0005)
ANA	EtOH	Duchefa Biochemie (n0903.0025)
AIB	EtOH	Duchefa Biochemie (DI0902.0005)
Cytokinines (0,93 µM)		
Molécule	Solvant de solubilisation	Fournisseur
KIN	NaOH 0.1N	Duchefa Biochemie

		(K0905.0001)
BAP	NaOH 0.1N	Duchefa Biochemie (B0904.0001)
TDZ*	DMSO	Sigma (P6186)
TOPO	Eau déminéralisée	Duchefa Biochemie (T0941.0100)
ZEA*	NaOH 0.1N	Sigma(Z0164)

*hormones thermolabiles filtrées à 0,2 µm et ajoutées après l'autoclave

4. Initiation de suspensions cellulaires

5 g de cals friables obtenus à partir de graines (T₀ 23.07.15, repiqués toutes les 4 semaines sur du milieu M1) ont été ajoutés à 50 mL de milieu M1 liquide dans un erlenmeyer de 250 mL. Ce ratio d'1g d'inoculum pour 10 mL de milieu a déjà été décrit dans des travaux antérieurs d'initiation de suspensions cellulaires végétales (Pacheco et al., 2012). Les suspensions ont été placées sous agitation à 130 rpm avec une amplitude de 20 mm, à 20°C, à l'obscurité. Les repiquages initiaux sont présentés sur la figure ci-contre. Ensuite, les suspensions ont été entretenues en effectuant des repiquages tous les 14 jours, avec 100 mL de milieu de culture par erlenmeyer de 250 mL.

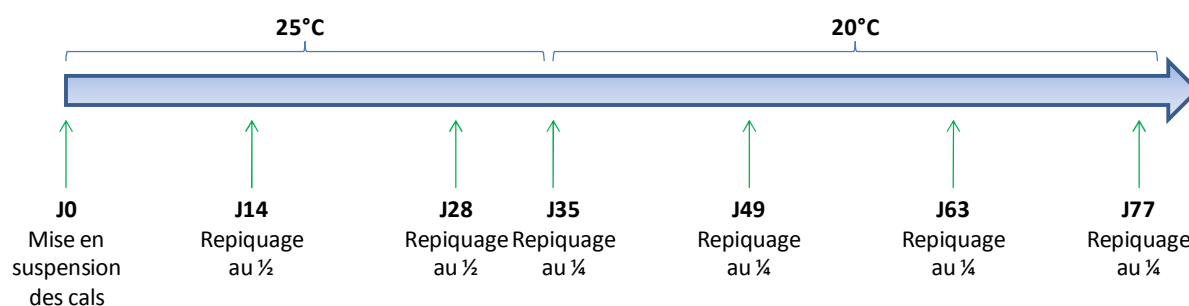


Figure 4.15 : Chronologie de l'initiation d'une suspension d'*A. maritima*

Une fois le processus de repiquage régulier (dilution au quart toutes les 2 semaines) instauré, trois cinétiques de croissances ont été réalisées, en erlenmeyers de 100 mL (40 mL de milieu), une sur 17 jours, et deux sur 24 jours. Des index de croissance ont également été calculés :

$$\text{Index de croissance} = \frac{\text{poids final} - \text{poids initial}}{\text{poids initial}}$$

B. *Helichrysum stoechas*

1. Conditions de culture

L'entretien des cals et des suspensions cellulaires a été réalisé à 25°C et avec une intensité lumineuse de 5000 lux soit 50 μ moles photons /m²/s et sans photopériode.

Les suspensions ont été maintenues dans des erlenmeyers de 250 mL, à raison de 100 mL de suspension par erlenmeyer, agités à 130 rpm avec une amplitude de 20 mm.

2. Composition du milieu de culture

Le pH a toujours été ajusté à 5,8 à l'aide de solutions de NaOH 1N et HCl 1N.

Les milieux ont été stérilisés à l'autoclave pendant 20 min à 120 °C à 1 bar.

Tableau 4.10 : Composition du milieu de culture d'*H. stoechas*

Produit	Concentrations
Base minérale	160 mL/L
Glucose*	45 g/L
ANA*	5,4 μ M
BAP*	4,4 μ M
2,4-D*	4,5 μ M
Agar*	8 g/L

* Les références de ces produits sont les mêmes que pour la partie *A. maritima*

Tableau 4.11 : Composition de la base minérale utilisée pour le milieu de culture d'*H. stoechas*

Macroéléments		
KNO ₃	SIGMA Ref P8291	25 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	BDH Laboratory Supplies Ref 100334C	1,34 g/L
CaCl ₂ , 2H ₂ O	MERCK Ref 2382	1,5 g/L
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	MERCK Ref A344546	1,32 g/L
MgSO ₄ , 7H ₂ O	MERCK Ref 5886	2,5 g/L
Microéléments		

MnSO ₄ , H ₂ O	PROLABO(RP) Ref 25.301	169 mg/L
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	MERCK Ref 8883	86 mg/L
H ₃ BO ₃	Carlo Erba Ref 402767	62 mg/L
KI	SIGMA Ref 30315	8,3 mg/L
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	SIGMA Ref 331058	2,5 mg/L
CuSO ₄ , 5H ₂ O	SIGMA Ref 209198	0,25 mg/L
FeSO ₄ , 7H ₂ O	PROLABO(RP) Ref 24244.232	278 mg/L
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	Euromedex Ref EU0007	373 mg/L
Vitamines		
Biotine	SIGMA Ref B4639	0,1 mg/L
Myo-Inositol	MERCK	1 g/L
Acide nicotinique	SIGMA Ref N0761	10 mg/L
Acide D-pantothenique hemicalcium sel	SIGMA Ref 21210	10 mg/L
Pyridoxine Hydrochloride	SIGMA Ref P9755	10 mg/L
Thiamine Hydrochloride	SIGMA Ref T3902	10 mg/L

3. Repiquage des suspensions

Les suspensions ont été repiquées tous les 14 jours en réalisant une dilution au 1/4. (Le jour de repiquage est appelé j0).

Une fois le processus de repiquage régulier instauré, trois cinétiques de croissances ont été réalisées, en erlenmeyers de 250 mL (100 mL de milieu), sur 14 jours.

4. Elicitation

Au vue du matériel disponible, 24 erlenmeyers de suspensions peuvent être cultivés en parallèle. Ainsi pour un cycle, 9 erlenmeyers ont été conservés pour le repiquage (et donc redonner des suspensions filles qui à leur tour pouvaient être élicitées) et 15 ont été utilisés pour des tests d'élicitation (y compris les témoins).

Des essais préliminaires ont conclu à l'ajout de l'éliciteur dans la culture à j3 et une récolte à j14.

Après récolte, les suspensions ont été centrifugées, le surnageant jeté et les cellules pesées pour déterminer le poids frais. Ensuite les cellules ont été congelées dans l'azote liquide puis lyophilisées. Après lyophilisation, elles ont été pesées pour déterminer le poids sec.

a. Méthyl jasmonate

Le méthyl jasmonate (Sigma 392707) préparé dans de l'éthanol, ajouté à j3, a été testé à 50, 100, 150, 200 et 400 μM . La solution stock a été stérilisée par filtration à 0,22 μm .

b. Acide salicylique

L'acide salicylique (Duchefa Biochemie S1367.0100) préparé dans de l'éthanol (400 mM), ajouté à j3, a été testé à 50, 100, 150 et 200 μM . La solution stock a été stérilisée par filtration à 0,22 μm .

c. Chlorure de sodium

Le NaCl (Sigma 746398) a été préparé dans de l'eau déminéralisée (4 M) et a été filtré à 0,22 μm . Il a été ajouté dans les suspensions à j3 et a été testé à 50, 100, 150 et 200 mM. Il a aussi été testé à j10 à 25 et 50 mM.

d. Chitosan

Le chitosan (Sigma 448869) a été préparé dans de l'acide acétique 1% (10 mg/mL), puis le pH a été réajusté avec du NaOH 1M à 5,8. Il a été ajouté dans les suspensions à j3, a été testé à 10,50 et 100 mg/L. La solution stock a été stérilisée par autoclavage.

e. Coronatine

La coronatine (Sigma C8115) préparée dans l'eau (313 μM), ajoutée à j3, a été testé à 0,5 ; 1 ; 2 et 4 μM . La solution stock a été stérilisée par filtration à 0,22 μm .

C. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées par le Dr Camille Rustenholz (INRA de Colmar).

Les données ont été soumises à une analyse de variance par les tests ANOVA ou Kruskal-Wallis (selon les résultats du test de normalité de Shapiro et de Bartlett pour l'égalité des variances). Les moyennes sont comparées avec les tests de Tukey ou de Dunn.

Pour les tests d'élicitations sur *H. stoechas*, les essais ont été réalisés en triplicat.

Pour les tests de callogénèse sur *A. maritima*, pour une expérience n=40 et chaque expérience a été réalisée en triplicat.

Bibliographie

- Abohatem, M., Zouine, J., and El Hadrami, I. (2011). Low concentrations of BAP and high rate of subcultures improve the establishment and multiplication of somatic embryos in date palm suspension cultures by limiting oxidative browning associated with high levels of total phenols and peroxidase activities. *Scientia Horticulturae* *130*, 344–348.
- Afolayan, A.J., and Adebola, P.O. (2010). Biotechnology of medicinal plants: Regeneration of *Arctotis arctotoides* from a seed-derived callus. *Journal of Biotechnology* *150, Supplement*, 490.
- Afoulous, S., Ferhout, H., Raelison, E.G., Valentin, A., Moukarzel, B., Couderc, F., and Bouajila, J. (2011). *Helichrysum gymnocephalum* Essential Oil: Chemical Composition and Cytotoxic, Antimalarial and Antioxidant Activities, Attribution of the Activity Origin by Correlations. *Molecules* *16*, 8273–8291.
- Agila, A.Y.C., Guachizaca, I., and Cella, R. (2015). Combination of 2,4-D and stress improves indirect somatic embryogenesis in *Cattleya maxima* Lindl. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology* *149*, 235–241.
- Agrawal, P.K. (1992). NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* *31*, 3307–3330.
- Ahlawat, S., Saxena, P., Ali, A., Khan, S., and Abdin, M.Z. (2017). Comparative study of withanolide production and the related transcriptional responses of biosynthetic genes in fungi elicited cell suspension culture of *Withania somnifera* in shake flask and bioreactor. *Plant Physiol. Biochem.* *114*, 19–28.
- Ahmad, I., Hussain, T., Ashraf, I., Nafees, M., Rafay, M., and Iqbal, M. (2013). Lethal Effects of Secondary Metabolites on Plant Tissue Culture. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci* *13*, 539–547.
- Ahmed, S.A., and Baig, M.M.V. (2014). Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L. *Saudi Journal of Biological Sciences* *21*, 499–504.
- Ahmed, K., Kandil, F., and Mabry, T. (1999). An anticancer tannin and other phenolics from *Limonium axillare* (Fam. Plumbaginaceae). *Asian Journal of Chemistry* *11*, 261–263.
- Aizpurua-Olaizola, O., Ormazabal, M., Vallejo, A., Olivares, M., Navarro, P., Etxebarria, N., and Usobiaga, A. (2015). Optimization of Supercritical Fluid Consecutive Extractions of Fatty Acids and Polyphenols from *Vitis Vinifera* Grape Wastes. *Journal of Food Science* *80*, E101–E107.
- Akashi, R., Hashimoto, A., and Adachi, T. (1993). Plant regeneration from seed-derived embryogenic callus and cell suspension cultures of bahiagrass (*Paspalum notatum*). *Plant Science* *90*, 73–80.
- Akhgari, A., Yrjönen, T., Laakso, I., Vuorela, H., Oksman-Caldentey, K.-M., and Rischer, H. (2015). Establishment of transgenic *Rhazya stricta* hairy roots to modulate terpenoid indole alkaloid production. *Plant Cell Rep* *34*, 1939–1952.

Albayrak, S., Aksoy-Aksel, A., Sagdic, O., and Hamzaoglu, E. (2010). Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food chemistry* 119 (1), 114-122.

Alhdad, G.M., Seal, C.E., Al-Azzawi, M.J., and Flowers, T.J. (2013). The effect of combined salinity and waterlogging on the halophyte *Suaeda maritima*: The role of antioxidants. *Environmental and Experimental Botany* 87, 120–125.

Ali, M.B., Yu, K.-W., Hahn, E.-J., and Paek, K.-Y. (2006). Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Rep* 25, 613–620.

Aljančić, I.S., Vučković, I., Jadranin, M., Pešić, M., Đorđević, I., Podolski-Renić, A., Stojković, S., Menković, N., Vajs, V.E., and Milosavljević, S.M. (2014). Two structurally distinct chalcone dimers from *Helichrysum zivojinii* and their activities in cancer cell lines. *Phytochemistry* 98, 190–196.

Allard, P.-M., Péresse, T., Bisson, J., Gindro, K., Marcourt, L., Pham, V.C., Roussi, F., Litaudon, M., and Wolfender, J.-L. (2016). Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. *Anal. Chem.* 88, 3317–3323.

Almagro, L., Belchí-Navarro, S., Martínez-Márquez, A., Bru, R., and Pedreño, M.A. (2015). Enhanced extracellular production of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and coronatine. *Plant Physiology and Biochemistry* 97, 361–367.

Al-Rehaily, A.J., Albishi, O.A., El-Olemy, M.M., and Mossa, J.S. (2008). Flavonoids and terpenoids from *Helichrysum forskahlii*. *Phytochemistry* 69, 1910–1914.

Alvarez, M.E., Rotelli, A.E., Pelzer, L.E., Saad, J.R., and Giordano, O. (2000). Phytochemical study and anti-inflammatory properties of *Lampaya hieronymi* Schum. ex Moldenke. *II Farmaco* 55, 502–505.

Alves, M.G., Neuhaus-Oliveira, A., Moreira, P.I., Socorro, S., and Oliveira, P.F. (2013). Exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid alters glucose metabolism in immature rat Sertoli cells. *Reproductive Toxicology* 38, 81–88.

Aly, M.A.M., Rathinasabapathi, B., and Bhalsod, S. (2002a). Somatic Embryogenesis in Members of the Plumbaginaceae Ornamental *Statice Limonium* and Sea Thrift *Armeria maritima*. *HortScience* 37, 1122–1123.

Aly, M.A.M., Rathinasabapathi, B., and Kelley, K. (2002b). Somatic embryogenesis in perennial statice *Limonium bellidifolium*, Plumbaginaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68, 127–135.

Amano, S. (2017). Possible Involvement of Basement Membrane Damage by Matrix Metalloproteinases, Serine Proteinases, and Heparanase in Skin Aging Process. In *Textbook of Aging Skin*, M.A. Farage, K.W. Miller, and H.I. Maibach, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 149–160. ISBN 9783642278143.

- Ambiga, S., Narayanan, R., Gowri, D., Sukumar, D., and Madhavan, S. (2007). Evaluation of wound healing activity of flavonoids from *Ipomoera carnea* Jacq. *Anc Sci Life* 26, 45–51.
- Amor, N.B., Jiménez, A., Megdiche, W., Lundqvist, M., Sevilla, F., and Abdelly, C. (2006). Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakile maritima*. *Physiologia Plantarum* 126, 446–457.
- Angioni, A., Barra, A., Arlorio, M., Coisson, J.D., Russo, M.T., Pirisi, F.M., Satta, M., and Cabras, P. (2003). Chemical Composition, Plant Genetic Differences, and Antifungal Activity of the Essential Oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd) Nym. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1030–1034.
- Antunes Viegas, D., Palmeira-de-Oliveira, A., Salgueiro, L., Martinez-de-Oliveira, J., and Palmeira-de-Oliveira, R. (2014). *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data. *Journal of Ethnopharmacology* 151, 54–65.
- Anuf, A.R., Ramachandran, R., Krishnasamy, R., Gandhi, P.S.S., and Periyasamy, S. (2014). Antiproliferative effects of *Plumbago rosea* and its purified constituent plumbagin on SK-MEL 28 melanoma cell lines. *Pharmacognosy Res* 6, 312–319.
- Appendino, G., Ottino, M., Marquez, N., Bianchi, F., Giana, A., Ballero, M., Sterner, O., Fiebich, B.L., and Munoz, E. (2007). Arzanol, an Anti-inflammatory and Anti-HIV-1 Phloroglucinol α -Pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. *J. Nat. Prod.* 70, 608–612.
- Aremu, A.O., Gruz, J., Šubrtová, M., Szüčová, L., Doležal, K., Bairu, M.W., Finnie, J.F., and Van Staden, J. (2013). Antioxidant and phenolic acid profiles of tissue cultured and acclimatized *Merwillia plumbea* plantlets in relation to the applied cytokinins. *Journal of Plant Physiology* 170, 1303–1308.
- Arigoni, D., Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W., Bacher, A., and Zenk, M.H. (1997). Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-d-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *PNAS* 94, 10600–10605.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., and Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 117, 426–436.
- Babova, O., Occhipinti, A., Capuzzo, A., and Maffei, M.E. (2016). Extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) antioxidants using supercritical/subcritical CO₂ and ethanol as co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids* 107, 358–363.
- Bae, K.-H., Choi, Y.-E., Shin, C.-G., Kim, Y.-Y., and Kim, Y.-S. (2006). Enhanced Ginsenoside Productivity by Combination of Ethephon and Methyl Jasmonate in Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) Adventitious Root Cultures. *Biotechnol Lett* 28, 1163–1166.
- Bae, J.-I., Choi, J.-S., Choi Y.-J., Shin S.-Y., Kang S.-W., Han S.-J., Kang Y.-H. (2008). (–)Epigallocatechin gallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: Involvement of mitogen-activated protein kinase. *Food and chemical toxicology* 46 (4), 1298 - 1307.

- Bae, M.-J., Karadeniz, F., Lee, S.-G., Seo, Y., and Kong, C.-S. (2016). Inhibition of MMP-2 and MMP-9 Activities by *Limonium tetragonum* Extract. *Prev Nutr Food Sci* 21, 38–43.
- Baenas, N., García-Viguera, C., and Moreno, D.A. (2014). Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. *Molecules* 19, 13541–13563.
- Bahabadi, S.E., Sharifi, M., Safaie, N., Murata, J., Yamagaki, T., and Satake, H. (2011). Increased lignan biosynthesis in the suspension cultures of *Linum album* by fungal extracts. *Plant Biotechnology Reports* 5, 367.
- Bais, H.P., Walker, T.S., Schweizer, H.P., and Vivanco, J.M. (2002). Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 983–995.
- Bajoub, A., Pacchiarotta, T., Hurtado-Fernández, E., Olmo-García, L., García-Villalba, R., Fernández-Gutiérrez, A., Mayboroda, O.A., and Carrasco-Pancorbo, A. (2016). Comparing two metabolic profiling approaches (liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry) for extra-virgin olive oil phenolic compounds analysis: A botanical classification perspective. *Journal of Chromatography A* 1428, 267–279.
- Baldwin, H.E., Bhatia, N.D., Friedman, A., Eng, R.M., and Seite, S. (2017). The Role of Cutaneous Microbiota Harmony in Maintaining a Functional Skin Barrier. *J Drugs Dermatol* 16, 12–18.
- Bankova, V., De Castro, S., and Marcucci, M. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31, 3–15.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 16, 585–601.
- Barros, L., Oliveira, S., Carvalho, A.M., and Ferreira, I.C.F.R. (2010). *In vitro* antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine. *Industrial Crops and Products* 32, 572–579.
- Barroso, M.R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I.P., Barreiro, M.F., and Ferreira, I.C.F.R. (2014). Exploring the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications: Chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer. *Industrial Crops and Products* 53, 330–336.
- Baskaran, P., and Staden, J.V. (2014). Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Drimys robusta*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 119, 281–288.
- Baskaran, P., Kumari, A., and Staden, J.V. (2015a). Embryogenesis and synthetic seed production in *Mondia whitei*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 121, 205–214.
- Baskaran, P., Kumari, A., Naidoo, D., and Staden, J.V. (2015b). *In vitro* propagation and biochemical changes in *Aloe pruinosa*. *Industrial Crops and Products* 77, 51–58.

Baumes, R., Wirth, J., Bureau, S., Gunata, Y., and Razungles, A. (2002). Biogenesis of C13-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. *Analytica Chimica Acta* 458, 3–14.

Belboukhari, N., and Cheriti, A. (2009). Analysis and isolation of saponins from *Limoniastrum feei* by LC-UV. *Chemistry of Natural Compounds* 45, 756.

Belchi-Navarro, S., Pedreño, M.A., and Corchete, P. (2011). Methyl jasmonate increases silymarin production in *Silybum marianum* (L.) Gaertn cell cultures treated with β -cyclodextrins. *Biotechnol Lett* 33, 179–184.

Ben Hamed-Laouti, I., Arbelet-Bonnin, D., De Bont, L., Biligui, B., Gakière, B., Abdelly, C., Ben Hamed, K., and Bouteau, F. (2016). Comparison of NaCl-induced programmed cell death in the obligate halophyte *Cakile maritima* and the glycophyte *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 247, 49–59.

Ben Mansour, R., Ksouri, W.M., Cluzet, S., phanie, Krisa, S., phanie, Richard, T., and Ksouri, R. (2016). Assessment of Antioxidant Activity and Neuroprotective Capacity on PC12 Cell Line of *Frankenia thymifolia* and Related Phenolic LC-MS/MS Identification. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, ID 2843463.

Benabdelaziz, I., Marcourt, L., Benkhaled, M., Wolfender, J.-L., and Haba, H. (2017). Antioxidant and antibacterial activities and polyphenolic constituents of *Helianthemum sessiliflorum* Pers. *Natural Product Research* 31, 686–690.

Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., and Köberl, M. (2016). The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *J. Exp. Bot.* 67, 995–1002.

Bernabé-Antonio, A., Álvarez, L., Salcedo-Pérez, E., Toral, F.A.L.-D., Anzaldo-Hernández, J., and Cruz-Sosa, F. (2015). Fatty acid profile of intact plants of two different sites and callus cultures derived from seed and leaf explants of *Calophyllum brasiliense* Cambess: A new resource of non-edible oil. *Industrial Crops and Products* 77, 1014–1019.

Berridge, M.V., Herst, P.M., and Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127–152.

Binoy, J., Dhanya, B.P., Silja, P.K., Krishnan, P.N., and Satheeshkumar, K. (2014). *Plumbago rosea* L. - A review on tissue culture and pharmacological research. *International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research* 25, 246–256.

Biologie de la peau < www.biologiedelapeau.fr >. Consulté le 03-04-17.

Blainski, A., Lopes, G.C., and de Mello, J.C.P. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* 18, 6852–6865.

Bojnanský, V., and Fargašová, A. (2007). Atlas of Seeds and Fruits of Central and East-European Flora: The Carpathian Mountains Region (Springer Science & Business Media). ISBN 9781402053627.

Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., and Shabala, S. (2014). ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *J Exp Bot* 65, 1241–1257.

- Botineau, M. (2010). Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Tec & Doc (Lavoisier). ISBN 9782743011123.
- Boubakeur, H., Rebbas, K., and Belhattab, R. (2017). Activités antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Helichrysum stoechas* (L.) Moench. *Phytothérapie* 1–11.
- Bouchenak, F., Henri, P., Benrebiha, F.-Z., and Rey, P. (2012). Differential responses to salinity of two *Atriplex halimus* populations in relation to organic solutes and antioxidant systems involving thiol reductases. *Journal of Plant Physiology* 169, 1445–1453.
- Boufis, N., Khelifi-Slaoui, M., Djillali, Z., Zaoui, D., Morsli, A., Bernardis, M.A., Makhzum, A., and Khelifi, L. (2014). Effects of growth regulators and types of culture media on somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. Degla Beida). *Scientia Horticulturae* 172, 135–142.
- Boukhris, M.A., Destandau, É., El Hakmaoui, A., El Rhaffari, L., and Elfakir, C. (2016). A dereplication strategy for the identification of new phenolic compounds from *Anvillea radiata* (Coss. & Durieu). *Comptes Rendus Chimie* 19, 1124–1132.
- Bountagkidou, O.G., Ordoudi, S.A., and Tsimidou, M.Z. (2010). Structure–antioxidant activity relationship study of natural hydroxybenzaldehydes using *in vitro* assays. *Food Research International* 43, 2014–2019.
- Braca, A., Bilia, A.R., Mendez, J., and Morelli, I. (2001). Myricetin glycosides from *Licania densiflora*. *Fitoterapia* 72, 182–185.
- Bréant, L. (2012). Etude et valorisation industrielle d'halophytes du littoral breton : biodiversité chimique et biologique. Thèse de pharmacognosie, Université de Strasbourg.
- Bremner, P., Rivera, D., Calzado, M.A., Obón, C., Inocencio, C., Beckwith, C., Fiebich, B.L., Muñoz, E., and Heinrich, M. (2009). Assessing medicinal plants from South-Eastern Spain for potential anti-inflammatory effects targeting nuclear factor-Kappa B and other pro-inflammatory mediators. *J Ethnopharmacol* 124, 295–305.
- Brenes, M., Hidalgo, F.J., García, A., Rios, J.J., García, P., Zamora, R., and Garrido, A. (2000). Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *J Amer Oil Chem Soc* 77, 715–720.
- Bretagne Environnement < www.bretagne-environnement.org >. Consulté le 14-03-17.
- Brewin, L.E., Mehra, A., Lynch, P.T., and Farago, M.E. (2003). Mechanisms of Copper Tolerance By *Armeria maritima* in Dolfrwynog Bog, North Wales – Initial Studies. *Environmental Geochemistry and Health* 25, 147–156.
- Brighenti, V., Groothuis, S.F., Prencipe, F.P., Amir, R., Benvenuti, S., and Pellati, F. (2017). Metabolite fingerprinting of *Punica granatum* L. (pomegranate) polyphenols by means of high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 1480, 20–31.
- Bromham, L. (2015). Macroevolutionary patterns of salt tolerance in angiosperms. *Ann. Bot.* 115, 333–341.

- Brüggemann, H. (2016). The skin microbiota: composition and function in health and disease. *Semin. Immunol.* 25 (5), 370-377
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e ed.), Tec & Doc (Lavoisier). ISBN 2743011882.
- Buddhachat, K., Chomdej, S., Pradit, W., Nganvongpanit, K., and Ongchai, S. (2017). *In vitro* Chondroprotective Potential of Extracts Obtained from Various *Phyllanthus* Species. *Planta Medica* 83, 87–96.
- Budzianowski, J., and Skrzypczak, L. (1995). Phenylpropanoid esters from *Lamium album* flowers. *Phytochemistry* 38, 997–1001.
- Buhmann, A., and Papenbrock, J. (2013). An economic point of view of secondary compounds in halophytes. *Functional Plant Biol.* 40, 952–967.
- Burda, S., and Oleszek, W. (2001). Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2774–2779.
- Burkard, M., Leischner, C., Lauer, U.M., Busch, C., Venturelli, S., and Frank, J. (2017). Dietary flavonoids and modulation of natural killer cells: implications in malignant and viral diseases. *J. Nutr. Biochem.* 46, 1–12.
- Byrne, F.P., Jin, S., Paggiola, G., Petchey, T.H.M., Clark, J.H., Farmer, T.J., Hunt, A.J., McElroy, C.R., and Sherwood, J. (2016). Tools and techniques for solvent selection: green solvent selection guides. *Sustainable Chemical Processes* 4, 7-31.
- von Caemmerer, S., and Furbank, R.T. (2016). Strategies for improving C4 photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 31, 125–134.
- Cai, Z., Kastell, A., and Smetanska, I. (2014). Chitosan or yeast extract enhance the accumulation of eight phenolic acids in cell suspension cultures of *Malus × domestica* Borkh. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 89, 93–99.
- Cals-Grierson, M.-M., and Ormerod, A.D. (2004). Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide* 10, 179–193.
- Camero, C.M., Temraz, A., Braca, A., and De Leo, M. (2017). Phytochemical study of *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) leaves. *Biochemical Systematics and Ecology* 70, 69–72.
- Cao, H., Wu, D., Wang, H., and Xu, M. (2009). Effect of the glycosylation of flavonoids on interaction with protein. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 73, 972–975.
- Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A., and Scognamiglio, F. (1992). Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters. *Phytochemistry* 31, 4125–4128.
- Capello, C., Fischer, U., and Hungerbühler, K. (2007). What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chem.* 9, 927–934.

Carini, M., Aldini, G., Furlanetto, S., Stefani, R., and Facino, R.M. (2001). LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24, 517–526.

Carocho, M., and C.F.R. Ferreira, I. (2013). The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer – A Review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents* 13, 1236–1258.

Carotenuto, A., Fattorusso, E., Lanzotti, V., Magno, S., De Feo, V., and Cicala, C. (1997). The flavonoids of *Allium neapolitanum*. *Phytochemistry* 44, 949–957.

Cavaillon, J.-M. (1995). L'inflammation: un équilibre précaire entre cytokines pro- et anti-inflammatoires. *Revue Française Des Laboratoires* 1995, 27–35.

Cen, Y., Xiao, A., Chen, X., and Liu, L. (2016). Isolation of α -Amylase Inhibitors from *Kadsura longipedunculata* Using a High-Speed Counter-Current Chromatography Target Guided by Centrifugal Ultrafiltration with LC-MS. *Molecules* 21(9), 1190–1120.

CEVA Centre d'Etude et de Valorisation des Algues < www.ceva.fr > consulté le 21-03-17.

Chaabi, M. (2008). Étude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). Thèse de pharmacognosie. Université de Strasbourg.

Chang, J.H., Shin, J.H., Chung, I.S., and Lee, H.J. (1998). Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. *Biotechnology Letters* 20, 1097–1099.

Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, J.D., and Rakariyatham, N. (2007). Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chemistry* 100, 1044–1048.

Chao, P., Hsu, C., and Yin, M. (2009). Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutrition & Metabolism* 6, 33–41.

Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A.K., and Bisaria, V.S. (2002). Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7, 138–149.

Checker, R., Sharma, D., Sandur, S.K., Khanam, S., and Poduval, T.B. (2009). Anti-inflammatory effects of plumbagin are mediated by inhibition of NF-kappaB activation in lymphocytes. *International Immunopharmacology* 9, 949–958.

Chen, J.H., and Ho, C.-T. (1997). Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2374–2378.

Chen, L., Liang, Y., Song, T., Anjum, K., Wang, W., Yu, S., Huang, H., Lian, X.-Y., and Zhang, Z. (2015). Synthesis and bioactivity of tripolinolate A from *Tripolium vulgare* and its analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25, 2629–2633.

- Chen, Y., Lin, F., Yang, H., Yue, L., Hu, F., Wang, J., Luo, Y., and Cao, F. (2014). Effect of varying NaCl doses on flavonoid production in suspension cells of *Ginkgo biloba*: relationship to chlorophyll fluorescence, ion homeostasis, antioxidant system and ultrastructure. *Acta Physiol Plant* 36, 3173–3187.
- Chen, Y.-L., Hwang, T.-L., Yu, H.-P., Fang, J.-Y., Chong, K.Y., Chang, Y.-W., Chen, C.-Y., Yang, H.-W., Chang, W.-Y., and Hsieh, P.-W. (2016). *Ilex kaushue* and its bioactive Component 3,5-Dicaffeoylquinic Acid Protected Mice from Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury. *Sci Rep* 6, 34243.
- Cheng, X.-Y., Zhou, H.-Y., Cui, X., Ni, W., and Liu, C.-Z. (2006). Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. *Journal of Biotechnology* 121, 253–260.
- Ching-Wen, C., Yun-Chieh, C., Yu-Chin, L., and Wen-Huang, P. (2017). p-Hydroxyacetophenone suppresses nuclear factor- κ B-related inflammation in nociceptive and inflammatory animal models. *J Nat Med* 71, 422–432.
- Cho, J.Y., Park, J., Yoo, E.S., Yoshikawa, K., Baik, K.U., Lee, J., and Park, M.H. (1998). Inhibitory effect of lignans from the rhizomes of *Coptis japonica* var. *dissecta* on tumor necrosis factor- α production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Arch. Pharm. Res.* 21, 12–16.
- Chodisetti, B., Rao, K., Gandi, S., and Giri, A. (2015). Gymnemic acid enhancement in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre* by using the signaling molecules—methyl jasmonate and salicylic acid. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 51, 88–92.
- Choe, K.I., Kwon, J.H., Park, K.H., Oh, M.H., Kim, M.H., Kim, H.H., Cho, S.H., Chung, E.K., Ha, S.Y., and Lee, M.W. (2012). The Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Phenolic Compounds Isolated from the Root of *Rhodiola sachalinensis* A. BOR. *Molecules* 17, 11484–11494.
- Choi, H.J., Song, J.H., Park, K.S., and Kwon, D.H. (2009). Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 37, 329–333.
- Choi, J., Cho, J.Y., Choi, S.J., Jeon, H., Kim, Y.D., Htwe, K.M., Chin, Y.W., Lee, W.S., Kim, J., and Yoon, K.D. (2015). Two new phenolic glucosides from *Lagerstroemia speciosa*. *Molecules* 20, 4483–4491.
- Ciccarelli, D., and Bacaro, G. (2016). Quantifying plant species diversity in coastal dunes: a piece of help from spatially constrained rarefaction. *Folia Geobot* 51, 129–141.
- Claudy, A., Viac, J., and Schmitt, D. (1996). Cytokines et peau. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 36, 305–309.
- Claustres, G., and Lemoine, C. (1977). *Les fleurs du bord de mer*. ISBN 2858820627.
- Coady, K.K., Lynn Kan, H., Schisler, M.R., Bhaskar Gollapudi, B., Neal, B., Williams, A., and LeBaron, M.J. (2014). Evaluation of potential endocrine activity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using in vitro assays. *Toxicology in Vitro* 28, 1018–1025.

- Cohen, S., and Flescher, E. (2009). Methyl jasmonate: A plant stress hormone as an anti-cancer drug. *Phytochemistry* 70, 1600–1609.
- Cong, H.-J., Zhang, S.-W., Shen, Y., Zheng, Y., Huang, Y.-J., Wang, W.-Q., Leng, Y., and Xuan, L.-J. (2013). Guanidine Alkaloids from *Plumbago zeylanica*. *J. Nat. Prod.* 76, 1351–1357.
- Ćosić, T., Vinterhalter, B., Vinterhalter, D., Mitić, N., Cingel, A., Savić, J., Bohanec, B., and Ninković, S. (2013). *In vitro* plant regeneration from immature zygotic embryos and repetitive somatic embryogenesis in kohlrabi (*Brassica oleracea* var. gongylodes). *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 49, 294–303.
- Costa, D.A. da, Silva, D.A. e, Cavalcanti, A.C., Medeiros, M.A.A. de, Lima, J.T. de, Cavalcante, J.M.S., Silva, B.A. da, Agra, M. de F., and Souza, M. de F.V. de (2007). Chemical constituents from *Bakeridesia pickelii* Monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3-O-beta-D-(6"-E-p -coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. *Química Nova* 30, 901–903.
- Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P.B., Coelho, N., and Romano, A. (2012). *Thymus lotocephalus* wild plants and *in vitro* cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry* 135, 1253–1260.
- Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P.B., and Romano, A. (2013). Accumulation of phenolic compounds *in vitro* cultures and wild plants of *Lavandula viridis* L'Hér and their antioxidant and anti-cholinesterase potential. *Food and Chemical Toxicology* 57, 69–74.
- Courtin, O. (2009). Combination of a tiliroside and a peptide. Demande de brevet US20110144565 A1
- Curtin, C., Zhang, W., and Franco, C. (2003). Manipulating anthocyanin composition in *Vitis vinifera* suspension cultures by elicitation with jasmonic acid and light irradiation. *Biotechnology Letters* 25, 1131–1135.
- Da Porto, C., and Natolino, A. (2017). Supercritical fluid extraction of polyphenols from grape seed (*Vitis vinifera*): Study on process variables and kinetics. *The Journal of Supercritical Fluids*. *In press*
- Da Porto, C., Natolino, A., and Decorti, D. (2014). Extraction of proanthocyanidins from grape marc by supercritical fluid extraction using CO₂ as solvent and ethanol–water mixture as co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids* 87, 59–64.
- Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A., and Madani, K. (2014). *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Industrial Crops and Products* 61, 31–40.
- Daniela, B.-G., Thomas, R., and Kolb-Bachofen, V. (1998). Nitric Oxide in Human Skin: Current Status and Future Prospects. *Journal of Investigative Dermatology* 110, 1–7.
- D'Antuono, I., Garbetta, A., Linsalata, V., Minervini, F., and Cardinali, A. (2015). Polyphenols from artichoke heads (*Cynara cardunculus* (L.) subsp . *scolymus* Hayek): *in vitro* bio-accessibility, intestinal uptake and bioavailability. *Food & Function* 6, 1268–1277.

Dassanayake, M., Oh, D.-H., Haas, J.S., Hernandez, A., Hong, H., Ali, S., Yun, D.-J., Bressan, R.A., Zhu, J.-K., Bohnert, H.J., et al. (2011). The genome of the extremophile crucifer *Thellungiella parvula*. *Nat Genet* 43, 913–918.

Davies, P. (2013). *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (Springer Science & Business Media). ISBN 978-94-011-0473-9.

Dekio, I., Hayashi, H., Sakamoto, M., Kitahara, M., Nishikawa, T., Suematsu, M., and Benno, Y. (2005). Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling. *Journal of Medical Microbiology* 54, 1231–1238.

Delker, C., Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Feussner, I., and Wasternack, C. (2006). Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*-enzymes, products, regulation. *Plant Biol* 8, 297–306.

Dewick, P.M. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* (Wiley). ISBN 978-0-470-74168-9.

Dhar, U., and Joshi, M. (2005). Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. *Plant Cell Rep* 24, 195–200.

Dias, M.I., Sousa, M.J., Alves, R.C., and Ferreira, I.C.F.R. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products* 82, 9–22.

Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H., and Parajó, J.C. (2006). Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2441–2469.

DiCosmo, F., and Misawa, M. (1995). Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances* 13, 425–453.

Dictionary of Natural products < dnp.chemnetbase.com >. Consulté le 17-01-17.

Dinda, B., Chel, G., and Achari, B. (1994). A dihydroflavonol from *Plumbago indica*. *Phytochemistry* 35, 1083–1084.

Dobrąnszki, J., and Teixeira da Silva, J.A. (2010). Micropropagation of apple — A review. *Biotechnology Advances* 28, 462–488.

Dodeman, V.L., Ducreux, G., and Kreis, M. (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J Exp Bot* 48, 1493–1509.

Domitrović, R., Rashed, K., Cvijanović, O., Vladimir-Knežević, S., Škoda, M., and Višnić, A. (2015). Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Chemico-Biological Interactions* 230, 21–29.

Dong, F., Yang, Z., Baldermann, S., Kajitani, Y., Ota, S., Kasuga, H., Imazeki, Y., Ohnishi, T., and Watanabe, N. (2012). Characterization of L-phenylalanine metabolism to

- acetophenone and 1-phenylethanol in the flowers of *Camellia sinensis* using stable isotope labeling. *J. Plant Physiol.* *169*, 217–225.
- Dougall, D.K., Johnson, J.M., and Whitten, G.H. (1980). A clonal analysis of anthocyanin accumulation by cell cultures of wild carrot. *Planta* *149*, 292–297.
- Dowom, S.A., Abrishamchi, P., Radjabian, T., and Salami, S.A. (2017). Enhanced phenolic acids production in regenerated shoot cultures of *Salvia virgata* Jacq. after elicitation with Ag⁺ ions, methyl jasmonate and yeast extract. *Industrial Crops and Products* *103*, 81–88.
- Drewes, S.E., Mudau, K.E., van Vuuren, S.F., and Viljoen, A.M. (2006). Antimicrobial monomeric and dimeric diterpenes from the leaves of *Helichrysum tenax* var *tenax*. *Phytochemistry* *67*, 716–722.
- Duan, H., Takaishi, Y., Momota, H., Ohmoto, Y., and Taki, T. (2002). Immunosuppressive constituents from *Saussurea medusa*. *Phytochemistry* *59*, 85–90.
- Durrant, W.E., and Dong, X. (2004). Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology* *42*, 185–209.
- Ecocert France - Organisme de contrôle et de certification < www.ecocert.fr >. Consulté le 01.04.17.
- Edahiro, J.-I., Nakamura, M., Seki, M., and Furusaki, S. (2005). Enhanced accumulation of anthocyanin in cultured strawberry cells by repetitive feeding of l-Phenylalanine into the medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering* *99*, 43–47.
- Egbert, M., Ruetze, M., Sattler, M., Wenck, H., Gallinat, S., Lucius, R., and Weise, J.M. (2014). The matricellular protein periostin contributes to proper collagen function and is downregulated during skin aging. *J. Dermatol. Sci.* *73*, 40–48.
- El Hadrami, A., Adam, L.R., El Hadrami, I., and Daayf, F. (2010). Chitosan in Plant Protection. *Mar Drugs* *8*, 968–987.
- Erdemoglu, N., Akkol, E.K., Yesilada, E., and Calış, I. (2008). Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive principles from a folk remedy, *Rhododendron ponticum* L. leaves. *Journal of Ethnopharmacology* *119*, 172–178.
- Eroğlu, H.E., Aksoy, A., Hamzaoglu, E., Budak, Ü., and Albayrak, S. (2009). Cytogenetic effects of nine *Helichrysum* taxa in human lymphocytes culture. *Cytotechnology* *59*, 65–72.
- European Chemicals Agency REACH - < <https://echa.europa.eu/fr/regulations/reach> >, consulté le 17-02-17.
- Fahn, A. (2000). Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* *31*, 37–75.
- Farhadi, N., Panahandeh, J., Azar, A.M., and Salte, S.A. (2017). Effects of explant type, growth regulators and light intensity on callus induction and plant regeneration in four ecotypes of Persian shallot (*Allium hirtifolium*). *Scientia Horticulturae* *218*, 80–86.

- Farmer, E.E., Alméras, E., and Krishnamurthy, V. (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 372–378.
- Feher, A., Pasternak, T., Otvos, K., Miskolczi, P., and Dudits, D. (2002). Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. *Biology - Section Botany* 51 (1), 5–12.
- Fernando, S.C., Goodger, J.Q.D., Gutierrez, S.S., Johnson, A.A.T., and Woodrow, I.E. (2016). Plant regeneration through indirect organogenesis and genetic transformation of *Eucalyptus polybractea* R.T. Baker. *Industrial Crops and Products* 86, 73–78.
- Figas, A., Tomaszewska-Sowa, M., Sawilska, A., and Keutgen, A. (2016). Improvement of *in vitro* propagation and acclimation of *Helichrysum arenarium* L. Moench. *Actia Scientiarum Polonorum Hororum Cultus* 15, 17–26.
- Filip, R., López, P., Giberti, G., Coussio, J., and Ferraro, G. (2001). Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia* 72, 774–778.
- Fliegmann, J., Schüler, G., Boland, W., Ebel, J., and Mithöfer, A. (2005). The Role of Octadecanoids and Functional Mimics in Soybean Defense Responses. *Biological Chemistry* 384, 437–446.
- Flowers, T.J. (1985). Physiology of halophytes. In *Biosalinity in Action: Bioproduction with Saline Water*, D. Pasternak, and A.S. Pietro, eds. (Springer Netherlands), pp. 41–56. ISBN 978950187599.
- Flowers, T.J., and Colmer, T.D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* 179, 945–963.
- Fonseca S.F, Nielsen L.T., and Ruveda E.A. (1979) Lignans of *Araucaria augustifolia* and ¹³C NMR analysis of some phenyltetralin lignans. *Phytochemistry* 18, 1703-1708.
- Fossen, T., Larsen, Å., Kiremire, B.T., and Andersen, Ø.M. (1999). Flavonoids from blue flowers of *Nymphaea caerulea*. *Phytochemistry* 51, 1133–1137.
- Fujita, Y., Takahashi, S., and Yamada, Y. (1985). Selection of Cell Lines with High Productivity of Shikonin Derivatives by Protoplast Culture of *Lithospermum erythrorhizon* Cells. *Agricultural and Biological Chemistry* 49, 1755–1759.
- Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Hagège, D., Courtois, D., and Joseph, C. (2013). The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphthodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 113, 25–39.
- Galbany-Casals, M., Unwin, M., Garcia-Jacas, N., Smissen, R.D., Susanna, A., and Bayer, R.J. (2014). Phylogenetic relationships in *Helichrysum* (Compositae: Gnaphalieae) and related genera: Incongruence between nuclear and plastid phylogenies, biogeographic and morphological patterns, and implications for generic delimitation. *Taxon* 63, 608–624.
- Ganzler, K., Szinai, I., and Salgó, A. (1990). Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique. *Journal of Chromatography A* 520, 257–262.

- Garcia, R., Pacheco, G., Falcão, E., Borges, G., and Mansur, E. (2011). Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 106, 47–54.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M., and Thorpe, T.A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 32, 272–289.
- Geng, D., Chi, X., Dong, Q., and Hu, F. (2015). Antioxidants screening in *Limonium aureum* by optimized on-line HPLC–DPPH assay. *Industrial Crops and Products* 67, 492–497.
- George, V.C., Dellaire, G., and Rupasinghe, H.P.V. (2017). Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 45, 1–14.
- Germplasm Resources Information Network < www.npgsweb.ars-grin.gov >. Consulté le 12.04.17.
- Gerothanassis, I.P., Exarchou, V., Lagouri, V., Troganis, A., Tsimidou, M., and Boskou, D. (1998). Methodology for Identification of Phenolic Acids in Complex Phenolic Mixtures by High-Resolution Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance. Application to Methanolic Extracts of Two *Oregano* Species. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4185–4192.
- Ghorbanpour, M., and Hadian, J. (2015). Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown *in vitro*. *Carbon* 94, 749–759.
- Giovannini, A., Amoretti, M., Savona, M., Di Guardo, A., and Ruffoni, B. (2003). Tissue culture in *Helichrysum* spp. *Acta Horticulturae* 339–342.
- Giovannini, A., Mascarello, C., Pipino, L., and Nostro, A. (2008). *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation in Mediterranean *Helichrysum*. *Transgenic Plant Journal* 2, 54–61.
- Giuliani, C., Lazzaro, L., Calamassi, R., Calamai, L., Romoli, R., Fico, G., Foggi, B., and Mariotti Lippi, M. (2016). A volatilomic approach for studying plant variability: the case of selected *Helichrysum* species (Asteraceae). *Phytochemistry* 130, 128–143.
- Glenn, E.P., Brown, J.J., and Blumwald, E. (1999). Salt Tolerance and Crop Potential of Halophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18, 227–255.
- Goldhaber-Pasillas, G.D., Mustafa, N.R., and Verpoorte, R. (2014). Jasmonic Acid Effect on the Fatty Acid and Terpenoid Indole Alkaloid Accumulation in Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. *Molecules* 19, 10242–10260.
- Gontier, E., Clement, A., Bourgaud, F., and Guckert, A. (2001). Procédé de production de métabolites à partir de végétaux en culture hors sol. Demande de brevet (EP1227714 A1).
- Gouveia, S.C., and Castilho, P.C. (2009). Analysis of phenolic compounds from different morphological parts of *Helichrysum devium* by liquid chromatography with on-line UV and electrospray ionization mass spectrometric detection. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 3939–3953.

Gouveia, S., and Castilho, P.C. (2011). Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD(–)–ESI-MSn method. *Food Chemistry* 129, 333–344.

Gouveia, S., and Castilho, P.C. (2012a). *Helichrysum monizii* Lowe: phenolic composition and antioxidant potential. *Phytochem Anal* 23, 72–83.

Gouveia, S.C., and Castilho, P.C. (2012b). Validation of a HPLC-DAD–ESI/MSn method for caffeoylquinic acids separation, quantification and identification in medicinal *Helichrysum* species from Macaronesia. *Food Research International* 45, 362–368.

Gow, W.-P., Chen, J.-T., and Chang, W.-C. (2009). Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiol Plant* 31, 363.

Grigore, M.-N., Ivanescu, L., and Toma, C. (2014). *Halophytes: An Integrative Anatomical Study* (Springer). ISBN 978-3-319-05729-3.

Guardia, T., Rotelli, A.E., Juarez, A.O., and Pelzer, L.E. (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. II *Farmaco* 56, 683–687.

Guignard, J.-L., and Dupont, F. (2004). *Botanique - systématique moléculaire* (Masson). ISBN 9782294741173.

Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calhella, R.C., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Queiroz, M.J.R.P., and Ferreira, I.C.F.R. (2013). Infusion and decoction of wild German chamomile: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. *Food Chemistry* 136, 947–954.

Gunaherath, G.M.K.B., Gunatilaka, A.A.L., Sultanbawa, M.U.S., and Balasubramaniam, S. (1983). 1,2(3)-Tetrahydro-3,3'-biplumbagin: A naphthalenone and other constituents from *Plumbago zeylanica*. *Phytochemistry* 22, 1245–1247.

Guo, J., Yu, D.-L., Xu, L., Zhu, M., and Yang, S.-L. (1998). Flavonol glycosides from *Lysimachia congestiflora*. *Phytochemistry* 48, 1445–1447.

Guo, R., Guo, X., Li, T., Fu, X., and Liu, R.H. (2017). Comparative assessment of phytochemical profiles, antioxidant and antiproliferative activities of Sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries. *Food Chemistry* 221, 997–1003.

Gupta, P., Sharma, S., and Saxena, S. (2014). Effect of Salts (NaCl and Na₂CO₃) on Callus and Suspension Culture of *Stevia rebaudiana* for Steviol glycoside Production. *Appl Biochem Biotechnol* 172, 2894–2906.

Gutzeit, D., Wray, V., Winterhalter, P., and Jerz, G. (2007). Preparative Isolation and Purification of Flavonoids and Protocatechuic Acid from Sea Buckthorn Juice Concentrate (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Chroma* 65, 1–7.

- Ha, J.-H., Lee, D.-U., Lee, J.-T., Kim, J.-S., Yong, C.-S., Kim, J.-A., Ha, J.-S., and Huh, K.- (2000). 4-Hydroxybenzaldehyde from *Gastrodia elata* B1. is active in the antioxidation and GABAergic neuromodulation of the rat brain. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 329–333.
- Haberlandt, G. (1902). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber K Preuss Akad Wiss Wien, Math- Naturwiss* 111, 69–92.
- Haider, G., Schrader, T. von, Füßlein, M., Blechert, S., and Kutchan, T.M. (2005). Structure-Activity Relationships of Synthetic Analogs of Jasmonic Acid and Coronatine on Induction of Benzophenanthridine Alkaloid Accumulation in *Eschscholzia californica* Cell Cultures. *Biological Chemistry* 381, 741–748.
- Hamed, K.B., Castagna, A., Salem, E., Ranieri, A., and Abdelly, C. (2007). Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Regul* 53, 185–194.
- Hammami, S., Nguir, A., Saidana, D., Jihegrave, Cheriaa, N., and Mighri, Z. (2011). Chemical analysis and antimicrobial effects of essential oil from *Limoniastrum guyonianum* growing in Tunisia. *Joint Meet. Pest. Res.* 5, 2540–2545.
- Hampel, D., Swatski, A., Mosandl, A., and Wüst, M. (2007). Biosynthesis of Monoterpenes and Norisoprenoids in Raspberry Fruits (*Rubus idaeus* L.): The Role of Cytosolic Mevalonate and Plastidial Methylerythritol Phosphate Pathway. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9296–9304.
- Hanson, A.D., Rathinasabapathi, B., Rivoal, J., Burnet, M., Dillon, M.O., and Gage, D.A. (1994). Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae: a natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. *PNAS* 91, 306–310.
- Harada, Y., Tanaka, N., Ichikawa, M., Kamijo, Y., Sugiyama, E., Gonzalez, F.J., and Aoyama, T. (2016). PPAR α -dependent cholesterol/testosterone disruption in Leydig cells mediates 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced testicular toxicity in mice. *Arch Toxicol* 90, 3061–3071.
- Harborne, J.B., and Mabry, T.J. (2013). *The Flavonoids: Advances in Research* (Springer). ISBN 978-1-4899-2915-0.
- Häusler, M., and Montag, A. (1989). Isolation, identification and quantitative determination of the norisoprenoid (S)-(+)-dehydrovomifoliol in honey. *Z Lebensm Unters Forch* 189, 113–115.
- Hayat, S., Ali, B., and Ahmad, A. (2007). Salicylic Acid: Biosynthesis, Metabolism and Physiological Role in Plants. In *Salicylic Acid: A Plant Hormone*, S. Hayat, and A. Ahmad, eds. (Springer Netherlands), pp. 1–14. ISBN 978-1-4020-5184-5.
- Hayatsu, M., Suzuki, S., Hasegawa, A., Tsuchiya, S., and Sasamoto, H. (2014). Effect of NaCl on ionic content and distribution in suspension-cultured cells of the halophyte *Sonneratia alba* versus the glycophyte *Oryza sativa*. *Journal of Plant Physiology* 171, 1385–1391.
- von Hedenström, H., and Breckle, S.-W. (1974). Obligate halophytes? A test with tissue culture methods. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie* 74, 183–185.

- Heyman, H.M., Senejoux, F., Seibert, I., Klimkait, T., Maharaj, V.J., and Meyer, J.J.M. (2015). Identification of anti-HIV active dicaffeoylquinic- and tricaffeoylquinic acids in *Helichrysum populifolium* by NMR-based metabolomic guided fractionation. *Fitoterapia* 103, 155–164.
- Hidalgo, D., Martínez-Márquez, A., Cusidó, R., Bru-Martínez, R., Palazón, J., and Corchete, P. (2017). *Silybum marianum* cell cultures stably transformed with *Vitis vinifera* stilbene synthase accumulate t-resveratrol in the extracellular medium after elicitation with methyl jasmonate or methylated β -cyclodextrins. *Eng. Life Sci. In press*.
- Hirata, H., Ohnishi, T., Ishida, H., Tomida, K., Sakai, M., Hara, M., and Watanabe, N. (2012). Functional characterization of aromatic amino acid aminotransferase involved in 2-phenylethanol biosynthesis in isolated rose petal protoplasts. *J. Plant Physiol.* 169, 444–451.
- Holser, R.A. (2012). Principal Component Analysis of Phenolic Acid Spectra. *International Scholarly Research Notices* 2012, 493203.
- Hong, S., Joo, T., and Jhoo, J.-W. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activities of 3,5-dicaffeoylquinic acid isolated from *Ligularia fischeri* leaves. *Food Sci Biotechnol* 24, 257–263.
- Hopkins, W.G. (2003). *Physiologie végétale (De Boeck Supérieur)*. ISBN 2744500895.
- Hoque, E. (1984). Spruce die-back: Isolation of p-hydroxyacetophenone from diseased shoots of *Picea abies*. *Phytochemistry* 23, 923–925.
- Hubert, J., Nuzillard, J.-M., Purson, S., Hamzaoui, M., Borie, N., Reynaud, R., and Renault, J.-H. (2014). Identification of Natural Metabolites in Mixture: A Pattern Recognition Strategy Based on ¹³C NMR. *Anal. Chem.* 86, 2955–2962.
- IECIC 2014 - Inventory of Existing Cosmetic Ingredients in China < http://www.cirs-reach.com/Cosmetic_Inventory/China_IECIC_Inventory_of_Existing_Cosmetic_Ingredients_in_China.html >. Consulté le 20-01-17.
- Inoue, K., Takano, H., Hiyoshi, K., Ichinose, T., Sadakane, K., Yanagisawa, R., Tomura, S., and Kumagai, Y. (2007). Naphthoquinone enhances antigen-related airway inflammation in mice. *European Respiratory Journal* 29, 259–267.
- Inouye, S., Uchida, K., and Abe, S. (2006). Volatile composition and vapour activity against Trichophyton mentagrophytes of 36 aromatic herbs cultivated in Chichibu district in Japan. *International Journal of Aromatherapy* 16, 159–168.
- Ivan, M., and Oprica, L. (2013). Study of polyphenols and flavonoids contents of some halophytes species collected from dobrogea region. *Agricultural Food Engineering* 6 (55).
- Jagan Mohan Rao, L., Yada, H., Ono, H., and Yoshida, M. (2002). Acylated and Non-Acylated Flavonol Monoglycosides from the Indian Minor Spice Nagkesar (*Mammea longifolia*). *J. Agric. Food Chem.* 50, 3143–3146.
- Jain, S.M., Brar, D.S., and Ahloowalia, B.S. (2013). *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement (Springer Science & Business Media)*. ISBN 978-94-015-9125-6.

- Jaisi, A., and Panichayupakaranant, P. (2017). Chitosan elicitation and sequential Diaion® HP-20 addition a powerful approach for enhanced plumbagin production in *Plumbago indica* root cultures. *Process Biochemistry* 53, 210–215.
- Jakupovic, J., Kuhnke, J., Schuster, A., Metwally, M.A., and Bohlmann, F. (1986). Phloroglucinol derivatives and other constituents from South African *Helichrysum* species. *Phytochemistry* 25, 1133–1142.
- Jakupovic, J., Pathak, V.P., Bohlmann, F., King, R.M., and Robinson, H. (1987). Obliquin derivatives and other constituents from Australian *Helichrysum* species. *Phytochemistry* 26, 803–807.
- Jao, C.-W., Hung, T.-H., Chang, C.-F., Chuang, T.-H. (2016). Chemical Constituents of *Phaius mishmensis*. *Molecules* 21, 1605.
- Jayaprakasha, G.K., Ohnishi-Kameyama, M., Ono, H., Yoshida, M., and Jaganmohan Rao, L. (2006). Phenolic Constituents in the Fruits of *Cinnamomum zeylanicum* and Their Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1672–1679.
- Jeandet, P., Clément, C., and Courot, E. (2014). Resveratrol production at large scale using plant cell suspensions. *Eng. Life Sci.* 14, 622–632.
- Jeevan Kumar, S.P., Vijay Kumar, G., Dash, A., Scholz, P., and Banerjee, R. (2017). Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review. *Algal Research* 21, 138–147.
- Jia, L., Bi, Y.-F., Jing, L.-L., Zhou, S.-A., and Kong, D.-Y. (2010). Two new compounds from *Urena lobata* L. *Journal of Asian Natural Products Research* 12, 962–967.
- Jiang, W.-J., Daikonya, A., Ohkawara, M., Nemoto, T., Noritake, R., Takamiya, T., Kitanaka, S., and Iijima, H. (2017). Structure-activity relationship of the inhibitory effects of flavonoids on nitric oxide production in RAW264.7 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 25, 779–788.
- Jiang, X.-W., Bai, J.-P., Zhang, Q., Hu, X.-L., Tian, X., Zhu, J., Liu, J., Meng, W.-H., and Zhao, Q.-C. (2016). Caffeoylquinic acid derivatives from the roots of *Arctium lappa* L. (burdock) and their structure–activity relationships (SARs) of free radical scavenging activities. *Phytochemistry Letters* 15, 159–163.
- Jiménez, V.M. (2001). Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13, 196–223.
- Jiménez, V.M. (2005). Involvement of Plant Hormones and Plant Growth Regulators on *in vitro* Somatic Embryogenesis. *Plant Growth Regul* 47, 91–110.
- Johnson, T.S., Ravishankar, G.A., and Venkataraman, L.V. (1991). Elicitation of capsaicin production in freely suspended cells and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens* mill. *Food Biotechnology* 5, 197–205.
- Jones, A.M.P., and Saxena, P.K. (2013). Inhibition of Phenylpropanoid Biosynthesis in *Artemisia annua* L.: A Novel Approach to Reduce Oxidative Browning in Plant Tissue Culture. *PLOS ONE* 8 (10), e76802.

Joshi, M., Mishra, A., and Jha, B. (2012). NaCl plays a key role for *in vitro* micropropagation of *Salicornia brachiata*, an extreme halophyte. *Industrial Crops and Products* 35, 313–316.

Jun, N.-J., Jang, K.-C., Kim, S.-C., Moon, D.-Y., Seong, K.-C., Kang, K.-H., Tandang, L., Kim, P.-H., Cho, S.-M.K., and Park, K.-H. (2007). Radical Scavenging Activity and Content of Cynarin (1,3-dicaffeoylquinic acid) in Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Applied Biological Chemistry* 50, 244–248.

Jung, H.W., Mahesh, R., Lee, J.G., Lee, S.H., Kim, Y.S., and Park, Y.-K. (2010). Pinoresinol from the fruits of *Forsythia koreana* inhibits inflammatory responses in LPS-activated microglia. *Neuroscience Letters* 480, 215–220.

Kaliamurthi, S., and Selvaraj, G. (2016). Insight on *Excoecaria agallocha*: An Overview. *Natural Products Chemistry and Research* 4 (2).

Kamalipourazad, M., Sharifi, M., Maivan, H.Z., Behmanesh, M., and Chashmi, N.A. (2016). Induction of aromatic amino acids and phenylpropanoid compounds in *Scrophularia striata* Boiss. cell culture in response to chitosan-induced oxidative stress. *Plant Physiol. Biochem.* 107, 374–384.

Kammeyer, A., and Luiten, R.M. (2015). Oxidation events and skin aging. *Ageing Research Reviews* 21, 16–29.

Kang, J., Li, Z., Wu, T., Jensen, G.S., Schauss, A.G., and Wu, X. (2010). Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chemistry* 122, 610–617.

Kang, S.-M., Min, J.-Y., Kim, Y.-D., Karigar, C.S., Kim, S.-W., Goo, G.-H., and Choi, M.-S. (2009). Effect of biotic elicitors on the accumulation of bilobalide and ginkgolides in *Ginkgo biloba* cell cultures. *Journal of Biotechnology* 139, 84–88.

Kanski, J., Aksenova, M., Stoyanova, A., and Butterfield, D.A. (2002). Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 273–281.

Katsir, L., Schillmiller, A.L., Staswick, P.E., He, S.Y., and Howe, G.A. (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *PNAS* 105, 7100–7105.

Kazuma, K., Noda, N., and Suzuki, M. (2003). Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry* 62, 229–237.

Kefeli, V., and Kalevitch, M.V. (2013). *System of Growth and Development Regulation in the Plant dans Natural Growth Inhibitors and Phytohormones in Plants and Environment* (Springer Science & Business Media). ISBN 978-94-017-0315-4.

Ketchum, R.E.B., Gibson, D.M., Croteau, R.B., and Shuler, M.L. (1999). The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotechnol. Bioeng.* 62, 97–105.

- Khan, M.A., and Duke, N.C. (2001). Halophytes – A resource for the future. *Wetlands Ecology and Management* 9, 455–456.
- Khan, N.A., Nazar, R., Iqbal, N., and Anjum, N.A. (2012). *Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants* (Springer Science & Business Media). ISBN 978-3-642-25829-9.
- Khan, T., Abbasi, B.H., Khan, M.A., and Shinwari, Z.K. (2016). Differential Effects of Thidiazuron on Production of Anticancer Phenolic Compounds in Callus Cultures of *Fagonia indica*. *Appl Biochem Biotechnol* 179, 46–58.
- Khojasteh, A., Mirjalili, M.H., Palazon, J., Eibl, R., and Cusido, R.M. (2016). Methyl jasmonate enhanced production of rosmarinic acid in cell cultures of *Satureja khuzistanica* in a bioreactor. *Eng. Life Sci.* 16, 740–749.
- Khosroushahi, A.Y., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M.R., and Omid, Y. (2006). Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology International* 30, 262–269.
- Kieran, P.M., MacLoughlin, P.F., and Malone, D.M. (1997). Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology* 59, 39–52.
- Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S. (2004a). Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences* 96, 229–245.
- Kim, H.Y., Moon, B.H., Lee, H.J., Choi, D.H. (2004b). Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 227–230.
- Kim, K.H., Chang, S.W., and Ryu, S.Y. (2009). Phytochemical constituents of *Nelumbo nucifera*. 15, 90–95.
- Kim, K.H., Moon, E., Lee, S.R., Park, K.J., Kim, S.Y., Choi, S.U., Lee, K.R., Kim, K.H., Moon, E., Lee, S.R., (2015). Chemical Constituents of the Seeds of *Raphanus sativus* and their Biological Activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 26, 2307–2312.
- Kim, S.-H., Jun, C.-D., Suk, K., Choi, B.-J., Lim, H., Park, S., Lee, S.H., Shin, H.-Y., Kim, D.-K., and Shin, T.-Y. (2006). Gallic Acid Inhibits Histamine Release and Pro-inflammatory Cytokine Production in Mast Cells. *Toxicol Sci* 91, 123–131.
- Kimura, Y., and Tamura, S. (1973). Isolation of 1- β -Phenyllactic Acid and Tyrosol as Plant Growth Regulators from *Gloeosporium laeticolor*. *Agricultural and Biological Chemistry* 37, 2925–2925.
- Kiritsakis, A.K. (1998). Flavor components of olive oil—A review. *J Amer Oil Chem Soc* 75, 673–681.
- Kisiel, W. (1980). Lignans from *Helichrysum bracteatum*. *Planta Medica* 38, 285–287.
- Kisiel, W., Michalska, K., and Szneler, E. (2004). Norisoprenoids from aerial parts of *Cichorium pumilum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 32, 343–346

- Kodati, D.R., Goud P, K., Shashidher, B., and Galipelly, S.K. (2011). Evaluation of wound healing activity of methanolic root extract of *Plumabgo zeylanica* L. in wistar albino rats. *Pelagia Research Library* 2, 239–248.
- Köhl, K.I. (1997a). The effect of NaCl on growth, dry matter allocation and ion uptake in salt marsh and inland populations of *Armeria maritima*. *New Phytologist* 135, 213–225.
- Köhl, K.I. (1997b). NaCl homoeostasis as a factor for the survival of the evergreen halophyte *Armeria maritima* (Mill.) Willd. under salt stress in winter. *Plant, Cell & Environment* 20, 1253–1263.
- Kolbe, A., Schneider, B., Porzel, A., Schmidt, J., and Adam, G. (1995). Acyl-conjugated metabolites of brassinosteroids in cell suspension cultures of *Ornithopus sativus*. *Phytochemistry* 38, 633–636.
- Korul'kina, L.M., Shul'ts, E.E., Zhusupova, G.E., Abilov, Z.A., Erzhanov, K.B., and Chaudri, M.I. (2004). Biologically active compounds from *Limonium Gmelinii* and *L. Popovii* I. *Chem Nat Compd* 40, 465–471.
- Kotseridis, Y., Baumes, R.L., Bertrand, A., and Skouroumounis, G.K. (1999). Quantitative determination of β -ionone in red wines and grapes of Bordeaux using a stable isotope dilution assay. *Journal of Chromatography A* 848, 317–325.
- Krifa, M., Bouhlel, I., Ghedira-Chekir, L., and Ghedira, K. (2013). Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of an aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall. *Journal of Ethnopharmacology* 146, 243–249.
- Krifa, M., Mustapha, N., Ghedira, Z., Ghedira, K., Pizzi, A., and Chekir-Ghedira, L. (2015). *Limoniastrum guyonianum* methanol extract induces immunomodulatory and anti-inflammatory effects by activating cellular anti-oxidant activity. *Drug and Chemical Toxicology* 38, 84–91.
- Krikorian, A.D., and Berquam, D.L. (1969). Plant cell and tissue cultures: The role of Haberlandt. *Bot. Rev* 35, 59–67.
- Kroes, B.H., Berg, A.J.J. van den, Ufford, H.C.Q. van, Dijk, H. van, and Labadie, R.P. (1992). Anti-Inflammatory Activity of Gallic Acid. *Planta Medica* 58, 499–504.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., and Abdelly, C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 244–249.
- Ksouri, W.M., Medini, F., Mkadmini, K., Legault, J., Magné, C., Abdelly, C., and Ksouri, R. (2013). LC–ESI–TOF–MS identification of bioactive secondary metabolites involved in the antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Zygophyllum album* Desf. *Food Chemistry* 139, 1073–1080.
- Kumar, S., and Pandey, A.K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* 2013, e162750.
- Kumarasamy, Y., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., and Sarker, S.D. (2002). Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 83, 73–77.

Kurokawa, M., Hirose, T., Sugata, Y., Tokumasu, M., Hiraga, Y., and Suga, T. (1998). 3-Hydroxy-5,6-Epoxy- β -Ionone As Germination Inhibitory Active Constituent In *Athyrium Yokoscense*. *Natural Product Letters* 12, 35–40.

Kwon, H.C., and Lee, K.R. (2001). Phytochemical constituents of *Artemisia japonica* ssp. *littoricola*. *Arch Pharm Res* 24, 194–197.

Ladeiro, B. (2012). Saline Agriculture in the 21st Century: Using Salt Contaminated Resources to Cope Food Requirements. *Journal of Botany* 2012, e310705.

Lage, D. de A., Tirado, M. da S., Vanicore, S.R., Sabino, K.C. de C., and Albarello, N. (2015). Production of betalains from callus and cell suspension cultures of *Pereskia aculeata* Miller, an unconventional leafy vegetable. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 122, 341–350.

Laloeuf, A. (2012). *Armeria Maritima* plant extracts for use in the treatment or prevention of conditions arising from an impaired skin barrier function. Demande de brevet EP2722075 A1.

Lauchli, R., and Boland, W. (2003). Indanoyl amino acid conjugates: Tunable elicitors of plant secondary metabolism. *Chem Record* 3, 12–21.

Lauranson, J., Vekemans, X., Lefebvre, C., and Jay, M. (1995). Flavonoid profiles variation in *Armeria maritima* (Mill.) Willd. *Biochemical Systematics and Ecology* 23, 319–329.

Lavault, M., and Richomme, P. (2004). Constituents of *Helichrysum stoechas* variety olonnense. *Chemistry of Natural Compounds* 40, 118–121.

de Lazzari Almeida, C., Xavier, R.M., Borghi, A.A., dos Santos, V.F., and Sawaya, A.C.H.F. (2016). Effect of seasonality and growth conditions on the content of coumarin, chlorogenic acid and dicaffeoylquinic acids in *Mikania laevigata* Schultz and *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) by UHPLC–MS/MS. *International Journal of Mass Spectrometry. In press*.

La Roche Posay < www.laroche-posay.fr >. Consulté le 20-04-17.

Lee, J.I., Kong, C.-S., Jung, M.E., Hong, J.W., Lim, S.Y., and Seo, Y. (2011). Antioxidant activity of the halophyte *Limonium tetragonum* and its major active components. *Biotechnol Bioproc E* 16, 992-999.

Lee, J.Y., Jang, Y.W., Kang, H.S., Moon, H., Sim, S.S., and Kim, C.J. (2006). Anti-inflammatory action of phenolic compounds from *Gastrodia elata* root. *Arch Pharm Res* 29, 849–858.

Lee, K.-K., Kim, J.-H., Cho, J.-J., and Choi, J.-D. (1999). Inhibitory Effects of 150 Plant Extracts on Elastase Activity, and Their Anti-inflammatory Effects. *International Journal of Cosmetic Science* 21, 71–82.

Lee-Parsons, C.W.T., Ertürk, S., and Tengtrakool, J. (2004). Enhancement of ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures with methyl jasmonate is dependent on timing and dosage of elicitation. *Biotechnology Letters* 26, 1595–1599.

Le Marchand, L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56, 296–301.

- Letellier, M., and Budzinski, H. (1999). Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analysis* 27, 259–270.
- Leung, D.Y.M., Boguniewicz, M., Howell, M.D., Nomura, I., and Hamid, Q.A. (2004). New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 113, 651–657.
- Li, R., Guo, M., Zhang, G., Xu, X., and Li, Q. (2006). Nicotiflorin reduces cerebral ischemic damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in primarily cultured rat cerebral blood vessel endothelial cells. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 143–150.
- Li, Y., Wang, P., Xiao, W., Zhao, L., Wang, Z., and Yu, L. (2013). Screening and Analyzing the Potential Bioactive Components from Reduning Injection, Using Macrophage Cell Extraction and Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Am. J. Chin. Med.* 41, 221–229.
- Liang, S., Ying, S.-S., Wu, H.-H., Liu, Y.-T., Dong, P.-Z., Zhu, Y., and Xu, Y.-T. (2015). A novel sesquiterpene and three new phenolic compounds from the rhizomes of *Acorus tatarinowii* Schott. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 4214–4218.
- Lieth, H., and Mochtchenko, M. (2013). *Cash Crop Halophytes: Recent Studies: 10 Years after Al Ain Meeting* (Springer Science & Business Media). ISBN 978-94-017-0211-9.
- Lim, H., and Kim, H.P. (2007). Inhibition of Mammalian Collagenase, Matrix Metalloproteinase-1, by Naturally-Occurring Flavonoids. *Planta Medica* 73, 1267–1274.
- Lim, F.L., Yam, M.F., Asmawi, M.Z., and Chan, L.-K. (2013). Elicitation of *Orthosiphon stamineus* cell suspension culture for enhancement of phenolic compounds biosynthesis and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products* 50, 436–442.
- Lin, L.C., and Chou, C.J. (2000). Flavonoids and phenolics from *Limonium sinense*. *Planta Med.* 66, 382–383.
- Lin, L.-C., Yang, L.-L., and Chou, C.-J. (2003). Cytotoxic naphthoquinones and plumbagic acid glucosides from *Plumbago zeylanica*. *Phytochemistry* 62, 619–622.
- Liu, D., Shi, X., Wang, D., He, F., Ma, Q., and Fan, B. (2011). Two new myricetin glycosides from pine needles of *Cedrus deodara*. *Chem Nat Compd* 47, 704–707.
- Liu, J., Zhu, J., Tang, L., Wen, W., Lv, S., and Yu, R. (2014). Enhancement of vindoline and vinblastine production in suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* by artemisinin acid elicitation. *World J Microbiol Biotechnol* 30, 175–180.
- Lohézic-Le Dévéhat, F., Tomasi, S., Fontanel, D., and Boustie, J. (2002). Flavonols from *Scurrula ferruginea* Danser (Loranthaceae). *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* 57, 1092–1095.
- Lokhande, V.H., Nikam, T.D., Patade, V.Y., Ahire, M.L., and Suprasanna, P. (2011). Effects of optimal and supra-optimal salinity stress on antioxidative defence, osmolytes and *in vitro* growth responses in *Sesuvium portulacastrum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104, 41–49.
- Lopes, A., Rodrigues, M.J., Pereira, C., Oliveira, M., Barreira, L., Varela, J., Trampetti, F., and Custódio, L. (2016). Natural products from extreme marine environments: Searching for

potential industrial uses within extremophile plants. *Industrial Crops and Products* 94, 299–307.

Lourens, A.C.U., Reddy, D., Başer, K.H.C., Viljoen, A.M., and Van Vuuren, S.F. (2004). *In vitro* biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species. *Journal of Ethnopharmacology* 95, 253–258.

Lourens, A.C.U., Viljoen, A.M., and van Heerden, F.R. (2008). South African *Helichrysum* species: A review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 630–652.

Lucchesi, M.E., Chemat, F., and Smadja, J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A* 1043, 323–327.

Luo, J., and He, G.-Y. (2004). Optimization of elicitors and precursors for paclitaxel production in cell suspension culture of *Taxus chinensis* in the presence of nutrient feeding. *Process Biochemistry* 39, 1073–1079.

L'Observatoire des Cosmétiques < www.observatoiredescosmetiques.com >. Consulté le 16-04.17.

Lüttge, U. (1993). The role of crassulacean acid metabolism (CAM) in the adaptation of plants to salinity. *New Phytologist* 125, 59–71.

Ma, G., Wu, H., Yuan, J., Wu, L., Zheng, Q., Sun, Z., Fan, X., Wei, H., Yang, J., and Xu, X. (2013). Phenylpropanoid constituents from the seeds of *Lithocarpus pachylepis*. *Phytochemistry Letters* 6, 152–155.

Machácková, I., and Romanov, G.A. (2013). *Phytohormones in Plant Biotechnology and Agriculture: Proceedings of the NATO-Russia Workshop held in Moscow, 12–16 May 2002* (Springer Science & Business Media).

Machida, K., and Kikuchi, M. (1996). Norisoprenoids from *Viburnum dilatatum*. *Phytochemistry* 41, 1333–1336.

MacRae, W.D., and Towers, G.H.N. (1984). Biological activities of lignans. *Phytochemistry* 23, 1207–1220.

Mäkilä, L., Laaksonen, O., Alanne, A.-L., Kortensniemi, M., Kallio, H., and Yang, B. (2016). Stability of Hydroxycinnamic Acid Derivatives, Flavonol Glycosides, and Anthocyanins in Black Currant Juice. *J. Agric. Food Chem.* 64, 4584–4598.

Makola, M.M., Dubery, I.A., Koorsen, G., Steenkamp, P.A., Kabanda, M.M., du Preez, L.L., and Madala, N.E. (2016). The Effect of Geometrical Isomerism of 3,5-Dicaffeoylquinic Acid on Its Binding Affinity to HIV-Integrase Enzyme: A Molecular Docking Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, e4138263.

Maksimovic, S., Tadic, V., Skala, D., and Zizovic, I. (2017). Separation of phytochemicals from *Helichrysum italicum* : An analysis of different isolation techniques and biological activity of prepared extracts. *Phytochemistry* 138, 9-28.

Malayaman, V., Sisubalan, N., Senthilkumar., R.P., Sheik Mohamed, S., Ranjithkumar, R., and Ghouse Basha, M. (2017). Chitosan mediated enhancement of hydrolysable tannin in *Phyllanthus debilis* Klein ex Willd via plant cell suspension culture. International Journal of Biological Macromolecules. *In press*.

Malerba, M., and Cerana, R. (2016). Chitosan Effects on Plant Systems. *Int J Mol Sci* 17 (7), 996-1011.

Manaf, H.H., Rabie, K.A.E., and Abd El-Aal, M.S. (2016). Impact of UV-B radiation on some biochemical changes and growth parameters in *Echinacea purpurea* callus and suspension culture. *Annals of Agricultural Sciences* 61, 207–216.

Marchesi, J.R., and Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3, 31.

Markham, K.R. (1982). Techniques of flavonoid identification (Academic Press). ISBN 9780124726802.

Markham, K.R., and Chari, V.M. (1982). Carbon-13 NMR Spectroscopy of Flavonoids. In *The Flavonoids*, J.B. Harborne, and T.J. Mabry, eds. (Springer US), pp. 19–134. ISBN 9780412224805.

Martin, C.M., Veale, A., Heyman, H.M., and Crampton, B.G. (2013). Micropropagation of *Helichrysum populifolium*, which produces medicinally active dicaffeoylquinic acid derivatives. *South African Journal of Botany* 86, 176–177.

Martinelli, L., Gribaudo, I., Bertoldi, D., Candioli, E., and Poletti, V. (2015). High efficiency somatic embryogenesis and plant germination in grapevine cultivars Chardonnay and Brachetto a grappolo lungo. *VITIS - Journal of Grapevine Research* 40 (3), 111-115.

Martinez-Correa, H.A., Bitencourt, R.G., Kayano, A.C.A.V., Magalhães, P.M., Costa, F.T.M., and Cabral, F.A. (2017). Integrated extraction process to obtain bioactive extracts of *Artemisia annua* L. leaves using supercritical CO₂, ethanol and water. *Industrial Crops and Products* 95, 535–542.

Martini, M.-C. (2016). Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie (3e ed.). Tec & Doc (Lavoisier). ISBN 9782743012700.

Masuda, T., Jitoe, A., Kato, S., and Nakatani, N. (1991). Acetylated flavonol glycosides from *Zingiber zerumbet*. *Phytochemistry* 30, 2391–2392.

Mathekga A.D.M., Meyer J.J.M, Horn M.M., Drews S.E. (2000). An acylated phloroglucinol with antimicrobial properties from *Helichrysum caespititium*. *Phytochemistry* 53 (1), 93-96.

Matić, I., Aljancić, I., Vajs, V., Jadranin, M., Gligorijević, N., Milosavljević, S., and Juranić, Z. (2013). Cancer-suppressive potential of extracts of endemic plant *Helichrysum zivojinii*: effects on cell migration, invasion and angiogenesis. *Nat Prod Commun* 8, 1291–1296.

Matsuda, H., Ninomiya, K., Shimoda, H., and Yoshikawa, M. (2002). Hepatoprotective principles from the flowers of *Tilia argentea* (Linden): structure requirements of tiliroside and mechanisms of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10, 707–712.

Medini, F., Fellah, H., Ksouri, R., and Abdelly, C. (2014). Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. *Journal of Taibah University for Science* 8, 216–224.

Medini, F., Bourgou, S., Lalancette, K., Snoussi, M., Mkadmini, K., Coté, I., Abdelly, C., Legault, J., and Ksouri, R. (2015). Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte *Limonium densiflorum* extracts on human cell lines and murine macrophages. *South African Journal of Botany* 99, 158–164.

Medini, F., Megdiche, W., Mshvildadze, V., Pichette, A., Legault, J., St-Gelais, A., and Ksouri, R. (2016). Antiviral-guided fractionation and isolation of phenolic compounds from *Limonium densiflorum* hydroalcoholic extract. *Comptes Rendus Chimie* 19, 726–732.

van Meerloo, J., Kaspers, G.L., and Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In *Cancer Cell Culture*, I.A. Cree, ed. (Humana Press), pp. 237–245. ISBN 9781617373435.

Mehrotra, S., Goel, M.K., Srivastava, V., and Rahman, L.U. (2015). Hairy root biotechnology of *Rauwolfia serpentina*: a potent approach for the production of pharmaceutically important terpenoid indole alkaloids. *Biotechnol Lett* 37, 253–263.

Méllissopoulos, A., and Levacher, C. (2012). *La peau - Structure et Physiologie* (2e ed.) (Lavoisier). ISBN 9782743013691.

Menin, B., Comino, C., Moglia, A., Dolzhenko, Y., Portis, E., and Lanteri, S. (2010). Identification and mapping of genes related to caffeoylquinic acid synthesis in *Cynara cardunculus* L. *Plant Science* 179, 338–347.

Meot-Duros, L., Le Floch, G., and Magné, C. (2008). Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology* 116, 258–262.

Meotti, F.C., Missau, F.C., Ferreira, J., Pizzolatti, M.G., Mizuzaki, C., Nogueira, C.W., and Santos, A.R.S. (2006). Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. *Biochemical Pharmacology* 72, 1707–1713.

Mhlongo, M.I., Piater, L.A., Steenkamp, P.A., Madala, N.E., and Dubery, I.A. (2014). Priming agents of plant defence stimulate the accumulation of mono- and di-acylated quinic acids in cultured tobacco cells. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 88, 61–66.

Michel, T., Destandau, E., and Elfakir, C. (2011). Evaluation of a simple and promising method for extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries: Pressurised solvent-free microwave assisted extraction. *Food Chemistry* 126, 1380–1386.

Min, S.-W., Ryu, S.-N., and Kim, D.-H. (2010). Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O- β -D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid. *International Immunopharmacology* 10, 959–966.

Missouri Botanical Garden, Angiosperm phylogeny website
<<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Consulté le 2/02/17.

- Moglia, A., Lanteri, S., Comino, C., Acquadro, A., de Vos, R., and Beekwilder, J. (2008). Stress-Induced Biosynthesis of DicaFFEoylquinic Acids in Globe Artichoke. *J. Agric. Food Chem.* *56*, 8641–8649.
- Mohr, H., and Schopfer, P. (1995). *Plant Physiology* (Springer Science & Business Media). ISBN 978-3-642-97570-7.
- Moraes, M.L.L., da Silva, H.D.T., Blanes, L., Doble, P., and Tavares, M.F.M. (2016). Optimization of chemometric approaches for the extraction of isorhamnetin-3-O-rutinoside from *Calendula officinalis* L. *J Pharm Biomed Anal* *125*, 408–414.
- Morais, M.C.C., Luqman, S., Kondratyuk, T.P., Petronio, M.S., Regasini, L.O., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S., Soares, C.P., and Pezzuto, J.M. (2010). Suppression of TNF- α induced NF κ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. *Natural Product Research* *24*, 1758–1765.
- Mora-Ruiz, M. del R., Font-Verdera, F., Díaz-Gil, C., Urdiain, M., Rodríguez-Valdecantos, G., González, B., Orfila, A., and Rosselló-Móra, R. (2015). Moderate halophilic bacteria colonizing the phylloplane of halophytes of the subfamily *Salicornioideae* (Amaranthaceae). *Syst. Appl. Microbiol.* *38*, 406–416.
- Morel, G. (1965). Clonal propagation of orchids by meristem culture. *Cymbidium Soc. News* *20*, 3–11.
- Motaal, A.A., Ezzat, S.M., Tadros, M.G., and El-Askary, H.I. (2016). *In vivo* anti-inflammatory activity of caffeoylquinic acid derivatives from *Solidago virgaurea* in rats. *Pharmaceutical Biology* *54*, 2864–2870.
- Movsumov, I.S., Garaev, E.A., and Isaev, M.I. (2006). Flavonoids from *Cephalaria gigantea* flowers. *Chem Nat Compd* *42*, 677–680.
- Mueller, M., Hobiger, S., and Jungbauer, A. (2010). Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chemistry* *122*, 987–996.
- Mukherjee, P.K., Maity, N., Nema, N.K., and Sarkar, B.K. (2013). In studies in Natural Products Chemistry: Chapter 3. Natural Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Leads from Herbal Resources (Elsevier Inc. Chapters). ISBN 978-0-444-62615-8.
- Müller, C.A., Obermeier, M.M., and Berg, G. (2016). Bioprospecting plant-associated microbiomes. *J. Biotechnol.* *235*, 171–180.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* *15*, 473–497.
- Murga, R., Ruiz, R., Beltrán, S., and Cabezas, J.L. (2000). Extraction of Natural Complex Phenols and Tannins from Grape Seeds by Using Supercritical Mixtures of Carbon Dioxide and Alcohol. *J. Agric. Food Chem.* *48*, 3408–3412.
- Murthy, H.N., Lee, E.-J., and Paek, K.-Y. (2014a). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* *118*, 1–16.

- Murthy, H.N., Kim, Y.-S., Park, S.-Y., and Paek, K.-Y. (2014b). Biotechnological production of caffeic acid derivatives from cell and organ cultures of *Echinacea* species. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 7707–7717.
- Murthy, H.N., Georgiev, M.I., Park, S.-Y., Dandin, V.S., and Paek, K.-Y. (2015). The safety assessment of food ingredients derived from plant cell, tissue and organ cultures: A review. *Food Chemistry* 176, 426–432.
- Murthy, H.N., Dandin, V.S., and Paek, K.-Y. (2016). Tools for biotechnological production of useful phytochemicals from adventitious root cultures. *Phytochem Rev* 15, 129–145.
- Nabet, N., Boudries, H., Chougui, N., Loupassaki, S., Souagui, S., Burló, F., Hernández, F., Carbonell-Barrachina, Á.A., Madani, K., and Labat, R. (2017). Biological activities and secondary compound composition from *Crithmum maritimum* aerial parts. *International Journal of Food Properties* 20 (8), 1843–1855.
- Nair, M.P., Mahajan, S., Reynolds, J.L., Aalinkeel, R., Nair, H., Schwartz, S.A., and Kandaswami, C. (2006). The Flavonoid Quercetin Inhibits Proinflammatory Cytokine (Tumor Necrosis Factor Alpha) Gene Expression in Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells via Modulation of the NF- κ B System. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 319–328.
- Nair, V.D., Panneerselvam, R., Gopi, R., and Hong-bo, S. (2013). Elicitation of pharmacologically active phenolic compounds from *Rauvolfia serpentina* Benth. Ex. Kurtz. *Industrial Crops and Products* 45, 406–415.
- Nakbi, A., Dabbou, S., Champion, S., Fouchier, F., Mehri, S., Attia, N., Leger, C., and Hammami, M. (2011). Modulation of the superoxide anion production and MMP-9 expression in PMA stimulated THP-1 cells by olive oil minor components: Tyrosol and hydroxytyrosol. *Food Research International* 44, 575–581.
- Namdeo, A.G. (2007). Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites : A Review. *Pharmacognosy Reviews* 1, 69–79.
- Namdeo, A., Patil, S., and Fulzele, D.P. (2002). Influence of Fungal Elicitors on Production of Ajmalicine by Cell Cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol Progress* 18, 159–162.
- Neumann, D., Nieden, U.Z., Lichtenberger, O., and Leopold, I. (1995). How Does *Armeria maritima* Tolerate High Heavy Metal Concentrations? *Journal of Plant Physiology* 146, 704–717.
- Ngom, S. (2008). Etude pharmaco-chimique de ressources végétales et algales : Recherche de métabolites anti-inflammatoires et/ou anti-radicalaires. Thèse en pharmacochimie, Université Louis Pasteur (Strasbourg).
- Nguyen, T.T.H., Moon, Y.-H., Ryu, Y.-B., Kim, Y.-M., Nam, S.-H., Kim, M.-S., Kimura, A., and Kim, D. (2013). The influence of flavonoid compounds on the in vitro inhibition study of a human fibroblast collagenase catalytic domain expressed in *E. coli*. *Enzyme and Microbial Technology* 52, 26–31.
- Nijveldt, R.J., Nood, E. van, Hoorn, D.E. van, Boelens, P.G., Norren, K. van, and Leeuwen, P.A. van (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74, 418–425.

- Nobécourt, P. (1939). Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. C.R. Seances Soc. Biol. Ses Fil 130, 1270–1271.
- Nostro, A., Filocamo, A., Giovannini, A., Catania, S., Costa, C., Marino, A., and Bisignano, G. (2012). Antimicrobial activity and phenolic content of natural site and micropropagated *Limonium avei* (De Not.) Brullo & Erben plant extracts. Natural Product Research 26, 2132–2136.
- Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Jang, M.O., Kim, I.S., Jin, Y.-W., Lee, E.-K., and Loake, G.J. (2015). Cambial meristematic cells: a platform for the production of plant natural products. New Biotechnology 32, 581–587.
- Ogino, T., Hiraoka, N., and Tabata, M. (1978). Selection of high nicotine-producing cell lines of tobacco callus by single-cell cloning. Phytochemistry 17, 1907–1910.
- Oleszek, W., Amiot, M.J., and Aubert, S.Y. (1994). Identification of some phenolics in pear fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry 42, 1261–1265.
- Oliveira, C. da C., Veloso, C. de C., Ferreira, R.C.M., Lage, G.A., Pimenta, L.P.S., Duarte, I.D.G., Romero, T.R.L., and Perez, A. de C. (2017). Peltatoside isolated from *Annona crassiflora* induces peripheral antinociception by activation of the cannabinoid system. Planta Med. 83, 261–267.
- Omar, A., Dutt, M., Gmitter, F., and Grosser, J. (2016). Somatic embryogenesis: still a relevant technique in *Citrus* improvement. In *in vitro* embryogenesis in higher plants, M.A. Germana, and M. Lambardi, eds. (Springer New York), pp. 289–327. ISBN 9781493930609.
- Onrubia, M., Moyano, E., Bonfill, M., Cusidó, R.M., Goossens, A., and Palazón, J. (2013). Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate. Journal of Plant Physiology 170, 211–219.
- Orhan, I.E., Albarello, N., Aly, M. a. M., Andreazza, N.L., Aprotosoie, A.C., Ata, A., Barar, J., Basarir, A., Bermúdez-Torres, K., Carvalho de Castro, T., (2012). Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites (Bentham science). ISBN 9781608054107.
- Orhan, N., Onaran, M., Şen, İ., Işık Gönül, İ., and Aslan, M. (2015). Preventive treatment of calcium oxalate crystal deposition with immortal flowers. J Ethnopharmacol 163, 60–67.
- Osuna, L., Tapia, N., Cusidó, R., Palazón, J., Bonfill, M., Zamilpa, A., López-Upton, J., and Cruz-Sosa, F. (2015). Taxane production induced by methyl jasmonate in free and immobilized cell cultures of Mexican yew (*Taxus globosa* Schltld). Acta Physiol Plant 37, 199.
- Otsuka, H., Takeuchi, M., Inoshiri, S., Sato, T., and Yamasaki, K. (1989). Phenolic compounds from *Coix lachryma-jobi* var. Ma-yuen. Phytochemistry 28, 883–886.
- Ou, S., and Kwok, K.-C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. J. Sci. Food Agric. 84, 1261–1269.
- Oueslati, S., Ksouri, R., Falleh, H., Pichette, A., Abdelly, C., and Legault, J. (2012). Phenolic content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Suaeda fruticosa* Forssk. Food Chemistry 132, 943–947.

- Ouyang, J., Wang, X., Zhao, B., and Wang, Y. (2005). Enhanced production of phenylethanoid glycosides by precursor feeding to cell culture of *Cistanche deserticola*. *Process Biochemistry* 40, 3480–3484.
- Pacheco, G., Garcia, R., Lugato, D., Vianna, M., and Mansur, E. (2012). Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. *Scientia Horticulturae* 144, 42–47.
- de Paiva, S.R., Figueiredo, M.R., and Kaplan, M.A.C. (2005). Isolation of secondary metabolites from roots of *Plumbago auriculata* Lam. by countercurrent chromatography. *Phytochem. Anal.* 16, 278–281.
- Palma, M., and Taylor, L.T. (1999). Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A* 849, 117–124.
- Pandino, G., Meneghini, M., Tavazza, R., Lombardo, S., and Mauromicale, G. (2017). Phytochemicals accumulation and antioxidant activity in callus and suspension cultures of *Cynara scolymus* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 128, 223–230.
- Panta, S., Flowers, T., Lane, P., Doyle, R., Haros, G., and Shabala, S. (2014). Halophyte agriculture: Success stories. *Environmental and Experimental Botany* 107, 71–83.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Saavedra, G., Murcia, M.A., Jiménez, A.M., and Codina, C. (2003). Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sciences* 73, 1667–1681.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Schmeda-Hirschmann, G., Burillo, J., and Codina, C. (2004). Bioguided isolation and identification of the nonvolatile antioxidant compounds from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) waste. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1890–1897.
- Park, H.-H., Lee, S., Son, H.-Y., Park, S.-B., Kim, M.-S., Choi, E.-J., Singh, T.S.K., Ha, J.-H., Lee, M.-G., Kim, J.-E., et al. (2008). Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch. Pharm. Res.* 31, 1303–1311.
- Park, K.H., Park, M., Choi, S.E., Jeong, M.S., Kwon, J.H., Oh, M.H., Choi, H.K., Seo, S.J., and Lee, M.W. (2009). The anti-oxidative and anti-inflammatory effects of caffeoyl derivatives from the roots of *Aconitum koreanum* R. Raymond. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 2029–2033.
- Park, S.H., Park, K.H., Oh, M.H., Kim, H.H., Choe, K.I., Kim, S.R., Park, K.J., and Lee, M.W. (2013). Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of caffeoyl hemiterpene glycosides from *Spiraea prunifolia*. *Phytochemistry* 96, 430–436.
- Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N.C., Ramirez, H., Nusbaum, A.G., Sawaya, A., Patel, S.B., Khalid, L., Isseroff, R.R., and Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in Wound Care* 3, 445–464.
- Patel, S. (2016). *Salicornia*: evaluating the halophytic extremophile as a food and a pharmaceutical candidate. *3 Biotech* 6 (1), 104–114.

Pauli, G.F., Chen, S.-N., Lankin, D.C., Bisson, J., Case, R.J., Chadwick, L.R., Gödecke, T., Inui, T., Kronic, A., Jaki, B.U., et al. (2014). Essential Parameters for Structural Analysis and Dereplication by ¹H NMR Spectroscopy. *J. Nat. Prod.* *77*, 1473–1487.

Peak, K.-Y., Hosakatte, N.M., and Zhong, J.-J. (2014). Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology (Springer). ISBN 9789401792226.

Peebles, C.A.M., Hughes, E.H., Shanks, J.V., and San, K.-Y. (2009). Transcriptional response of the terpenoid indole alkaloid pathway to the overexpression of ORCA3 along with jasmonic acid elicitation of *Catharanthus roseus* hairy roots over time. *Metabolic Engineering* *11*, 76–86.

Peinado, R. (2012). *Enological Chemistry* (Academic Press). ISBN 9780123884398.

Pensé-Lhéritier, A.-M. (2016). *Evaluation des produits cosmétiques - L'objectivation*, Tec & Doc (Lavoisier). ISBN 9782743021535.

Perassolo, M., Smith, M.E., Giulietti, A.M., and Talou, J.R. (2016). Synergistic effect of methyl jasmonate and cyclodextrins on anthraquinone accumulation in cell suspension cultures of *Morinda citrifolia* and *Rubia tinctorum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* *124*, 319–330.

Peres, R.G., Tonin, F.G., Tavares, M.F.M., and Rodriguez-Amaya, D.B. (2013). HPLC-DAD-ESI/MS Identification and Quantification of Phenolic Compounds in *Ilex paraguariensis* Beverages and On-Line Evaluation of Individual Antioxidant Activity. *Molecules* *18*, 3859–3871.

Phan, T.-T., Wang, L., See, P., Grayer, R.J., Chan, S.-Y., and Lee, S.T. (2001). Phenolic Compounds of *Chromolaena odorata* Protect Cultured Skin Cells from Oxidative Damage: Implication for Cutaneous Wound Healing. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* *24*, 1373–1379.

Philippon, D., Prelli, R., and Poux, L. (2006). *Atlas floristique de Bretagne - La flore des côtes d'Armor* (Siloë). ISBN 9782842313838

Pieterse, C.M.J., and van Loon, L.C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* *4*, 52–58.

Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* *63*, 1035–1042.

Pineau, B., Barbe, J.-C., Van Leeuwen, C., and Dubourdieu, D. (2007). Which Impact for β -Damascenone on Red Wines Aroma? *J. Agric. Food Chem.* *55*, 4103–4108.

PAT SA < www.plantadvanced.com >. Consulté le 28-03-17.

Popoola, O.K., Marnewick, J.L., Rautenbach, F., Iwuoha, E.I., and Hussein, A.A. (2015). Acylphloroglucinol Derivatives from the South African *Helichrysum niveum* and Their Biological Activities. *Molecules* *20*, 17309–17324.

Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L., and Bogdanov, S. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem Anal* *15*, 235–240.

Poulev, A., O'Neal, J.M., Logendra, S., Pouleva, R.B., Timeva, V., Garvey, A.S., Gleba, D., Jenkins, I.S., Halpern, B.T., Kneer, R., (2003). Elicitation, a New Window into Plant Chemodiversity and Phytochemical Drug Discovery. *J. Med. Chem.* *46*, 2542–2547.

Prinsloo, G., and Meyer, J.J.M. (2006). *In vitro* production of phytoalexins by *Helichrysum kraussii*. *South African Journal of Botany* *72*, 482–483.

Ratification du Protocole de Nagoya <<http://www.diplomatie.gouv.fr/fr/politique-etrange-re-de-la-france/environnement-et-developpement-durable/actualites-et-evenements/2016/article/la-france-ratifie-le-protocole-de-nagoya-31-08-16> > consulté le 06-03-07.

Qiu-Fang, Z., Yuan-Yuan, L., Cai-Hong, P., Cong-Ming, L., and Bao-Shan, W. (2005). NaCl enhances thylakoid-bound SOD activity in the leaves of C3 halophyte *Suaeda salsa* L. *Plant Science* *168*, 423–430.

de Quesada, T.G., Rodríguez, B., and Valverde, S. (1972). The constituents of *Helichrysum stoechas*. *Phytochemistry* *11*, 446–449.

Rahman, M.M.A., Dewick, P.M., Jackson, D.E., and Lucas, J.A. (1990). *Lignans of Forsythia intermedia*. *Phytochemistry* *29*, 1971–1980.

Rahmani, S., Belboukhari, N., and Cheriti, A. (2014). Phytochemical Investigation of Bioactive Extract from Endemic Medicinal Plant *Limoniastrum feei* (Girard) Batt (Plumbaginaceae). *Asian Journal of Chemistry* *26*, 365–368.

Ramachandra Rao, S., and Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* *20*, 101–153.

Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R.M., and Palazon, J. (2016). Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules* *21*, 182-206.

Rathinasabapathi, B., Fouad, W.M., and Sigua, C.A. (2001). β -Alanine Betaine Synthesis in the Plumbaginaceae. Purification and Characterization of a Trifunctional, S-Adenosyl-l-Methionine-Dependent N-Methyltransferase from *Limonium latifolium* Leaves. *Plant Physiol.* *126*, 1241–1249.

Reddy, J.S., Rao, P.R., and Reddy, M.S. (2002). Wound healing effects of *Heliotropium indicum*, *Plumbago zeylanicum* and *Acalypha indica* in rats. *Journal of Ethnopharmacology* *79*, 249–251.

Rhind, J.P. (2012). *Essential Oils: A Handbook for Aromatherapy Practice Second Edition* (Singing Dragon). ISBN 9780857010728.

Rho, H.S., Ghimeray, A.K., Yoo, D.S., Ahn, S.M., Kwon, S.S., Lee, K.H., Cho, D.H., and Cho, J.Y. (2011). Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides with Depigmenting and Anti-Inflammatory Properties. *Molecules* *16*, 3338–3344.

- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 933–956.
- Rios, J.L., Recio, M.C., and Villar, A. (1991). Isolation and identification of the antibacterial compounds from *Helichrysum stoechas*. *Journal of Ethnopharmacology* 33, 51–55.
- Robles-Martínez, M., Rosa, A.P.B. la, Guéraud, F., Negre-Salvayre, A., Rossignol, M., and Santos-Díaz, M. del S. (2016). Establishment of callus and cell suspensions of wild and domesticated *Opuntia* species: study on their potential as a source of metabolite production. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 124, 181–189.
- Rodrigues, M.J., Gangadhar, K.N., Vizetto-Duarte, C., Wubshet, S.G., Nyberg, N.T., Barreira, L., Varela, J., and Custódio, L. (2014). Maritime Halophyte Species from Southern Portugal as Sources of Bioactive Molecules. *Marine Drugs* 12, 2228–2244.
- Rodrigues, M.J., Soszynski, A., Martins, A., Rauter, A.P., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Varela, J., Barreira, L., and Custódio, L. (2015). Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. *Industrial Crops and Products* 77, 315–322.
- Rout, G.R., Saxena, C., Samantaray, S., and Das, P. (1999). Rapid plant regeneration from callus cultures of *Plumbago zeylanica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56, 47–51.
- Rozema, J., and Schat, H. (2013). Salt tolerance of halophytes, research questions reviewed in the perspective of saline agriculture. *Environmental and Experimental Botany* 92, 83–95.
- Ruan, C.-J., Zheng, X., da Silva, J.A.T., and Qin, P. (2009). Callus induction and plant regeneration from embryonic axes of *Kosteletzkya virginica*. *Scientia Horticulturae* 120, 150–155.
- Ruberto, G., Biondi, D.M., Barbagallo, C., Meli, R., and Savoca, F. (2002). Constituents of stem and flower oils of *Helichrysum litoreum* Guss. *Flavour Fragr. J.* 17, 46–48.
- Ruppel, S., Franken, P., and Witzel, K. (2013). Properties of the halophyte microbiome and their implications for plant salt tolerance. *Functional Plant Biol.* 40, 940–951.
- Sakunphueak, A., and Panichayupakaranant, P. (2010). Increased production of naphthoquinones in *Impatiens balsamina* root cultures by elicitation with methyl jasmonate. *Bioresour. Technol.* 101, 8777–8783.
- Sala, A., Recio, M.C., Schinella, G.R., Máñez, S., Giner, R.M., Cerdá-Nicolás, M., and Ríos, J.-L. (2003). Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology* 461, 53–61.
- Sárdy, M. (2009). Role of Matrix Metalloproteinases in Skin Ageing. *Connective Tissue Research* 50, 132–138.
- Sarkaki, A., Farbood, Y., Gharib-Naseri, M.K., Badavi, M., Mansouri, M.T., Haghparast, A., and Mirshekar, M.A. (2015). Gallic acid improved behavior, brain electrophysiology, and inflammation in a rat model of traumatic brain injury. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 93, 687–694.

Scharbert, S., Holzmann, N., and Hofmann, T. (2004). Identification of the Astringent Taste Compounds in Black Tea Infusions by Combining Instrumental Analysis and Human Bioresponse. *J. Agric. Food Chem.* *52*, 3498–3508.

Schieber, M., and Chandel, N.S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* *24*, 453-462.

Schinella, G.R., Tournier, H.A., Mánuez, S., de Buschiazzo, P.M., del Carmen Recio, M., and Ríos, J.L. (2007). Tiliroside and gnaphaliin inhibit human low density lipoprotein oxidation. *Fitoterapia* *78*, 1–6.

Seabra, I.J., Braga, M.E.M., Batista, M.T., and de Sousa, H.C. (2010). Effect of solvent (CO₂/ethanol/H₂O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace. *The Journal of Supercritical Fluids* *54*, 145–152.

Sefton, M.A., Skouroumounis, G.K., Elsey, G.M., and Taylor, D.K. (2011). Occurrence, Sensory Impact, Formation, and Fate of Damascenone in Grapes, Wines, and Other Foods and Beverages. *J. Agric. Food Chem.* *59*, 9717–9746.

Seité, S., Zelenkova, H., and Martin, R. (2017). Clinical efficacy of emollients in atopic dermatitis patients – relationship with the skin microbiota modification. *Clin Cosmet Investig Dermatol* *10*, 25–33.

Sekine, T., Arai, Y., Ikegami, F., Fujii, Y., Shindo, S., Yanagisawa, T., Ishida, Y., Okonogi, S., and Murakoshi, I. (1993). Isolation of Camelliaside C from “Tea Seed Cake” and Inhibitory Effects of Its Derivatives on Arachidonate 5-Lipoxygenase. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* *41*, 1185–1187.

Seleem, D., Pardi, V., and Murata, R.M. (2017). Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity *in vitro*. *Arch. Oral Biol.* *76*, 76–83.

Serina, J.C., Castilho, P.C., Fernandes, M.X., and Desk, S. (2016). Caffeoylquinic acids as inhibitors for HIV-I protease and HIV-I Integrase. A Molecular docking study. *SDRP Journal of computational chemistry & molecular modelling* *1* (2), 1-4.

Serra, S., Barakat, A., and Fuganti, C. (2007). Chemoenzymatic resolution of cis- and trans-3,6-dihydroxy- α -ionone. Synthesis of the enantiomeric forms of dehydrovomifoliol and 8,9-dehydrotheaspirone. *Tetrahedron: Asymmetry* *18*, 2573–2580.

Serrilli, A.M., Sanfilippo, V., Ballero, M., Sanna, C., Poli, F., Scartezzini, P., Serafini, M., and Bianco, A. (2010). Polar and antioxidant fraction of *Plumbago europaea* L., a spontaneous plant of Sardinia. *Natural Product Research* *24*, 633–639.

Sheeja, E., Joshi, S.B., and Jain, D.C. (2010). Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive compound from *Plumbago zeylanica* leaf. *Pharmaceutical Biology* *48*, 381–387.

Shen, Q., Lu, Y., Dai, Z., and Cheung, H.-Y. (2015). Precursor ion scan driven fast untargeted screening and semi-determination of caffeoylquinic acid derivatives in *Cynara scolymus* L. *Food Chemistry* *166*, 442–447.

Shirley, B.W. (1996). Flavonoid biosynthesis: “new” functions for an “old” pathway. *Trends in Plant Science* 1, 377–382.

Silja, P.K., and Satheeshkumar, K. (2015). Establishment of adventitious root cultures from leaf explants of *Plumbago rosea* and enhanced plumbagin production through elicitation. *Industrial Crops and Products* 76, 479–486.

Silja, P.K., Gisha, G.P., and Satheeshkumar, K. (2014). Enhanced plumbagin accumulation in embryogenic cell suspension cultures of *Plumbago rosea* L. following elicitation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 119, 469–477.

da Silva, C.M.G., Contesini, F.J., Sawaya, A.C.H.F., Cabral, E.C., da Silva Cunha, I.B., Eberlin, M.N., and de Oliveira Carvalho, P. (2013). Enhancement of the antioxidant activity of orange and lime juices by flavonoid enzymatic de-glycosylation. *Food Research International* 52, 308–314.

Sin, B.Y., and Kim, H.P. (2005). Inhibition of collagenase by naturally-occurring flavonoids. *Arch Pharm Res* 28, 1152–1155.

Sivanandhan, G., Selvaraj, N., Ganapathi, A., and Manickavasagam, M. (2014). Enhanced Biosynthesis of Withanolides by Elicitation and Precursor Feeding in Cell Suspension Culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal in Shake-Flask Culture and Bioreactor. *PLOS ONE* 9, e104005.

Skala, E., Grąbkowska, R., Sitarek, P., Kuźma, Ł., Błaż, A., and Wysokińska, H. (2015). *Rhaponticum carthamoides* regeneration through direct and indirect organogenesis, molecular profiles and secondary metabolite production. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 123, 83–98.

Skin science < www.skin-science.fr >. Consulté le 26-04-17.

Skorupa, M., Gołębiowski, M., Domagalski, K., Kurnik, K., Abu Nahia, K., Złoch, M., Tretyn, A., and Tyburski, J. (2016). Transcriptomic profiling of the salt stress response in excised leaves of the halophyte *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *Plant Sci.* 243, 56–70.

Skrzypczak-Pietraszek, E., Kwiecień, I., Gołdyn, A., and Pietraszek, J. (2017). HPLC-DAD analysis of arbutin produced from hydroquinone in a biotransformation process in *Origanum majorana* L. shoot culture. *Phytochemistry Letters* 20, 443–448

Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T., and Savouré, A. (2015). Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Ann Bot* 115, 433–447.

Smetanska, I. (2008). Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures. In *Food Biotechnology*, U. Stahl, U.E.B. Donalies, and E. Nevoigt, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 187–228. ISBN 9783642089466.

Sobhy, E.A., and El-Feky, S.S. (2007). Chemical Constituents and Antimicrobial Activity of *Helichrysum stoechas*. *Asian Journal of Plant Sciences* 6 (4), 692–695.

Soh, L., and Eckelman, M.J. (2016). Green Solvents in Biomass Processing. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 4, 5821–5837.

- Souda, S.S.E.D.E., Matloub, A.A., Nepveu, F., Valentin, A., and Roques, C. (2015). Phenolic composition and prospective anti-infectious properties of *Atriplex lindleyi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 5, 786–791.
- Soud, A., Gabriele, M., Longo, V., Pucci, L., Bellani, L., Smaoui, A., Abdelly, C., and Hamed, K.B. (2016). Salt tolerance of the halophyte *Limonium delicatulum* is more associated with antioxidant enzyme activities than phenolic compounds. *Functional Plant Biol.* 43, 607–619.
- Spach, É. (1841). *Histoire naturelle des végétaux: Phanérogames* (Librairie encyclopédique de Roret). ISBN 9782016181874.
- Srivastava, S., and Srivastava, A.K. (2007). Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.* 27, 29–43.
- Sruthi, P., Shackira, A.M., and Puthur, J.T. (2016). Heavy metal detoxification mechanisms in halophytes: an overview. *Wetlands Ecol Manage* 25 (2), 129-148.
- Stojakowska, A., and Malarz, J. (2017). Bioactive phenolics from *in vitro* cultures of *Lactuca aculeata* Boiss. et Kotschy. *Phytochemistry Letters* 19, 7–11.
- Straub, P.F., Decker, D.M., and Gallagher, J.L. (1988). Tissue culture and long-term regeneration of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 15, 73–78.
- Subhashini P., Raja S., Thangaradjou T. (2014). Establishment of cell suspension culture protocol for a seagrass (*Halodule pinifolia*): Growth kinetics and histomorphological characterization. *Aquatic botany* 117, 33-40.
- Süntar, I.P., Akkol, E.K., Yalçın, F.N., Koca, U., Keleş, H., and Yesilada, E. (2010). Wound healing potential of *Sambucus ebulus* L. leaves and isolation of an active component, quercetin 3-O-glucoside. *Journal of Ethnopharmacology* 129, 106–114.
- Süntar I., Akkol E.K., Yesilada E., Sarker D.S. (2013). Exploration of the wound healing potential of *Helichrysum graveolens* (Bieb.) Sweet: Isolation of apigenin as an active component. *Journal of Ethnopharmacology* 149 (1), 103-110.
- Suprasanna, P., Nikalje, G.C., and Rai, A.N. (2016). Osmolyte Accumulation and Implications in Plant Abiotic Stress Tolerance. In *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies*, N. Iqbal, R. Nazar, and N.A. Khan, eds. (Springer India), pp. 1–12. ISBN 978-81-322-2616-1.
- Syranidou, E., Christofilopoulos, S., Politi, M., Weyens, N., Venieri, D., Vangronsveld, J., and Kalogerakis, N. (2017). Bisphenol-A removal by the halophyte *Juncus acutus* in a phytoremediation pilot: Characterization and potential role of the endophytic community. *Journal of Hazardous Materials* 323, Part A, 350–358.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., and Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry* 113, 1226–1233.

- Tabassum, N., Lee, J.-H., Yim, S.-H., Batkhuu, G.J., Jung, D.-W., and Williams, D.R. (2016). Isolation of 4,5-O-Dicaffeoylquinic Acid as a Pigmentation Inhibitor Occurring in *Artemisia capillaris* Thunberg and Its Validation *In Vivo*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2016, e7823541.
- Tabuchi, T., Kumon, T., Azuma, T., Nanmori, T., and Yasuda, T. (2003). The expression of a germin-like protein with superoxide dismutase activity in the halophyte *Atriplex lentiformis* is differentially regulated by wounding and abscisic acid. *Physiologia Plantarum* 118, 523–531.
- Taieb, M., Gay, C., Sebban, S., and Secnazi, P. (2012). Hyaluronic acid plus mannitol treatment for improved skin hydration and elasticity. *Journal of Cosmetic Dermatology* 11, 87–92.
- Takei, K., Denda, S., Kumamoto, J., and Denda, M. (2013). Low environmental humidity induces synthesis and release of cortisol in an epidermal organotypic culture system. *Exp Dermatol* 22, 662–664.
- Talano, M.A., Oller, A.L.W., González, P.S., and Agostini, E. (2012). Hairy roots, their multiple applications and recent patents. *Recent Pat Biotechnol* 6, 115–133.
- Tela Botanica - Le réseau des botanistes francophones < <http://www.tela-botanica.org/>>. Consulté le 23-01-17.
- Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., Sokmen A. (2005). *In vitro* antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. *Food chemistry* 90 (4), 685-689.
- Thakore, D., Srivastava, A.K., and Sinha, A.K. (2017). Mass production of Ajmalicine by bioreactor cultivation of hairy roots of *Catharanthus roseus*. *Biochemical Engineering Journal* 119, 84–91.
- The Angiosperm Phylogeny Group (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* 181, 1–20.
- The Plant List - A working list of all plant species < www.theplantlist.org >. Consulté le 24-01-17
- Thellungiella - an extremophile for post-modern molecular genetics < www.thellungiella.org >. Consulté le 04-04-17.
- Thiruvengadam, M., Praveen, N., John, K.M.M., Yang, Y.-S., Kim, S.-H., and Chung, I.-M. (2014). Establishment of *Momordica charantia* hairy root cultures for the production of phenolic compounds and determination of their biological activities. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 118, 545–557.
- Thomas, T.D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26, 618–631.
- Thomas, J.C., Armond, R.L.D., and Bohnert, H.J. (1992). Influence of NaCl on Growth, Proline, and Phosphoenolpyruvate Carboxylase Levels in *Mesembryanthemum crystallinum* Suspension Cultures. *Plant Physiol.* 98, 626–631.

- Thorpe, T. (2006). History of Plant Tissue Culture. In *Plant Cell Culture Protocols*, V. Loyola-Vargas, and F. Vázquez-Flota, eds. (Humana Press), pp. 9–32. ISBN 9786610358809.
- Thring, T.S., Hili, P., and Naughton, D.P. (2009). Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 9, 27-38.
- Thring, T.S., Hili, P., and Naughton, D.P. (2011). Antioxidant and potential anti-inflammatory activity of extracts and formulations of white tea, rose, and witch hazel on primary human dermal fibroblast cells. *Journal of Inflammation* 8, 27.
- Tian, Y., Liimatainen, J., Alanne, A.-L., Lindstedt, A., Liu, P., Sinkkonen, J., Kallio, H., and Yang, B. (2017). Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. *Food Chem* 220, 266–281.
- Tilak, J.C., Adhikari, S., and Devasagayam, T.P.A. (2004). Antioxidant properties of *Plumbago zeylanica*, an Indian medicinal plant and its active ingredient, plumbagin. *Redox Report* 9, 219–227.
- Timbola, A.K., Szpoganicz, B., Branco, A., Monache, F.D., and Pizzolatti, M.G. (2002). A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. *Fitoterapia* 73, 174–176.
- Tison, J.-M., and Foucault, B. de (2014). *Flora Gallica: flore de France* (Biotope Editions). ISBN 9782366620122.
- Tisserat, B., Esan, E.B., and Murashige, T. (1979). Somatic Embryogenesis in Angiosperms. In *Horticultural Reviews*, J. Janick, ed. (John Wiley & Sons, Inc.), pp. 1–78. ISBN 9780870553141.
- Tomás-Barberán, F., Iniesta-Sanmartín, E., Tomás-Lorente, F., and Rumbero, A. (1990). Antimicrobial phenolic compounds from three Spanish *Helichrysum* species. *Phytochemistry* 29, 1093–1095.
- Tomiczak, K., Mikuła, A., Sliwinska, E., and Rybczyński, J.J. (2015). Autotetraploid plant regeneration by indirect somatic embryogenesis from leaf mesophyll protoplasts of diploid *Gentiana decumbens* L.f. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 51, 350–359.
- Toubane, A., Rezzoug, S.A., Besombes, C., and Daoud, K. (2017). Optimization of Accelerated Solvent Extraction of *Carthamus Caeruleus* L. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of extracts. *Industrial Crops and Products* 97, 620–631.
- Trabelsi, N., Oueslati, S., Ksouri, R., Nassra, M., Marchal, A., Krisa, S., Abdelly, C., Mérillon, J.-M., and Waffo-Tégou, P. (2014). The antioxidant properties of new dimer and two monomers of phenolic acid amides isolated from *Limoniastrum guyonianum*. *Food Chemistry* 146, 466–471.
- Tsang, M.S.M., Jiao, D., Chan, B.C.L., Hon, K.-L., Leung, P.C., Lau, C.B.S., Wong, E.C.W., Cheng, L., Chan, C.K.M., Lam, C.W.K., (2016). Anti-Inflammatory Activities of Pentaherbs Formula, Berberine, Gallic Acid and Chlorogenic Acid in Atopic Dermatitis-Like Skin Inflammation. *Molecules* 21, 519.

Tsukamoto, H., Hisada, S., and Nishibe, S. (1984). Lignans from Bark of *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* and *F. japonica*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 32, 4482–4489.

Universalis < www.universalis.fr >. Consulté le 11-04.17.

Uno, Y., Kanechi, M., Inagaki, N., Taki, N., and Maekawa, S. (1996). Growth and protein profile responses in the halophyte sea aster (*Aster tripolium* L.) suspension-cultured cells to salinity. *J. Plant Res.* 109, 409–414.

Van Oosten, M.J., and Maggio, A. (2015). Functional biology of halophytes in the phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Environmental and Experimental Botany* 111, 135–146.

Vasil, V., and Hildebrandt, A.C. (1965). Differentiation of Tobacco Plants from Single, Isolated Cells in Microcultures. *Science* 150, 889–892.

Veraplakorn, V. (2016). Micropropagation and callus induction of *Lantana camara* L. – A medicinal plant. *Agriculture and Natural Resources* 50, 338–344.

Verpoorte, R., Contin, A., and Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 1, 13–25.

Verpoorte, R., Choi, Y.H., and Kim, H.K. (2007). NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochem Rev* 6, 3–14.

Viguera, M., Marti, A., Masca, F., Prieto, C., and Calvo, L. (2016). The process parameters and solid conditions that affect the supercritical CO₂ extraction of the lipids produced by microalgae. *The Journal of Supercritical Fluids* 113, 16–22.

Vlachogianni, I.C., Fragopoulou, E., Kostakis, I.K., and Antonopoulou, S. (2015). *In vitro* assessment of antioxidant activity of tyrosol, resveratrol and their acetylated derivatives. *Food Chem* 177, 165–173.

van Vuuren, S.F., Viljoen, A.M., van Zyl, R.L., van Heerden, F.R., and Başer, K.H.C. (2006). The antimicrobial, antimalarial and toxicity profiles of helihumulone, leaf essential oil and extracts of *Helichrysum cymosum* (L.) D. Don subsp. *cymosum*. *South African Journal of Botany* 72, 287–290.

Wagner, F., and Vogelmann, H. (1977). Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. In *Plant Tissue Culture and Its Bio-Technological Application*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 245–252. ISBN 9783642666469.

Wagner, H., and Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* (Springer Science & Business Media). ISBN 9783662023983.

Wang, C.H., Zheng, L.P., Tian, H., and Wang, J.W. (2016a). Synergistic effects of ultraviolet-B and methyl jasmonate on tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 159, 93–100.

- Wang, J., Qian, J., Yao, L., and Lu, Y. (2015). Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing* 2, 5-14.
- Wang, L., and Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* 17, 300–312.
- Wang, L., Li, W., Ma, L., Chen, J., Lü, H., and Jian, T. (2016b). Salt stress changes chemical composition in *Limonium bicolor* (Bag.) Kuntze, a medicinal halophytic plant. *Industrial Crops and Products* 84, 248–253.
- Wang, S.Y., Bowman, L., and Ding, M. (2008). Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. *Food Chemistry* 107, 1261–1269.
- Wang, Y.-D., Wu, J.-C., and Yuan, Y.-J. (2007). Salicylic acid-induced taxol production and isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. mairei. *Cell Biology International* 31, 1179–1183.
- Warren, R.S., and Gould, A.R. (1982). Salt Tolerance Expressed as a Cellular Trait in Suspension Cultures Developed from the Halophytic Grass *Distichlis spicata*. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie* 107, 347–356.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Ann Bot* 100, 681–697.
- Wei, Y.-X., and Wang, J.-X. (2006). Studies on the chemical constituents of hypogeeal part from *Limonium bicolor*. *Zhong Yao Cai* 29, 1182–1184.
- Weiler, E.W., Kutchan, T.M., Gorba, T., Brodschelm, W., Niesel, U., and Bublitz, F. (1994). The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. *FEBS Letters* 345, 9–13.
- White, P.R. (1934). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol* 9, 585–600.
- Wickens, G.E. (1998). *Ecophysiology of Economic Plants in Arid and Semi-Arid Lands* (Springer Science & Business Media). ISBN 978-3-662-03700-3.
- Wiegand, C., Raschke, C., and Elsner, P. (2017). Skin Aging: A Brief Summary of Characteristic Changes. In *Textbook of Aging Skin*, M.A. Farage, K.W. Miller, and H.I. Maibach, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 55–65. ISBN 9783540896562
- Wilgus, T.A., and Wulff, B.C. (2013). The Importance of Mast Cells in Dermal Scarring. *Advances in Wound Care* 3, 356–365.
- Wilgus, T.A., Roy, S., and McDaniel, J.C. (2013). Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Advances in Wound Care* 2, 379–388.
- Wittenauer, J., Mäckle, S., Sußmann, D., Schweiggert-Weisz, U., and Carle, R. (2015). Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia* 101, 179–187.

- Wojdyło, A., Nowicka, P., Oszmiański, J., and Golis, T. (2017). Phytochemical compounds and biological effects of *Actinidia* fruits. *Journal of Functional Foods* 30, 194–202.
- Wolfender, J.-L., Marti, G., and Ferreira Queiroz, E. (2010). Advances in Techniques for Profiling Crude Extracts and for the Rapid Identification of Natural Products: Dereplication, Quality Control and Metabolomics. *Current Organic Chemistry* 14, 1808–1832.
- Wollenweber, E., Christ, M., Dunstan, R.H., Roitman, J.N., and Stevens, J.F. (2005). Exudate flavonoids in some *Gnaphalieae* and *Inuleae* (Asteraceae). *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* 60, 671–678.
- Xiao, J., Muzashvili, T.S., and Georgiev, M.I. (2014). Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids. *Biotechnology Advances* 32, 1145–1156.
- Xie, C., Veitch, N.C., Houghton, P.J., and Simmonds, M.S.J. (2004). Flavonoid glycosides and isoquinoline alkaloids from *Corydalis bungeana*. *Phytochemistry* 65, 3041–3047.
- Xie, L.-H., Akao, T., Hamasaki, K., Deyama, T., and Hattori, M. (2003). Biotransformation of pinoresinol diglucoside to mammalian lignans by human intestinal microflora, and isolation of *Enterococcus faecalis* strain PDG-1 responsible for the transformation of (+)-pinoresinol to (+)-lariciresinol. *Chem. Pharm. Bull.* 51, 508–515.
- Xie, Q.W., Kashiwabara, Y., and Nathan, C. (1994). Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 269, 4705–4708.
- Xu, A., Zhan, J.-C., and Huang, W.-D. (2015). Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 122, 197–211.
- Xu, A., Zhan, J.-C., and Huang, W.-D. (2016). Combined elicitation of chitosan and ultraviolet C enhanced stilbene production and expression of chitinase and β -1,3-glucanase in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 124, 105–117.
- Xue, M., Shi, H., Zhang, J., Liu, Q.-Q., Guan, J., Zhang, J.-Y., and Ma, Q. (2016). Stability and Degradation of Caffeoylquinic Acids under Different Storage Conditions Studied by High-Performance Liquid Chromatography with Photo Diode Array Detection and High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Collision-Induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry. *Molecules* 21, 948–961.
- Yamamoto, Y., Mizuguchi, R., and Yamada, Y. (1982). Selection of a high and stable pigment-producing strain in cultured *Euphorbia millii* cells. *Theoret. Appl. Genetics* 61, 113–116.
- Yan, M.-M., Xu, C., Kim, C.-H., Um, Y.-C., Bah, A.A., and Guo, D.-P. (2009). Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of *Chinese jiaotou* (*Allium chinense*). *Scientia Horticulturae* 123, 124–128.
- Yan, X., Murphy, B.T., Hammond, G.B., Vinson, J.A., and Neto, C.C. (2002). Antioxidant Activities and Antitumor Screening of Extracts from Cranberry Fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *J. Agric. Food Chem.* 50, 5844–5849.

- Yang, C., Shi, J.-G., Mo, S.-Y., and Yang, Y.-C. (2003). Chemical constituents of *Pyrrosia petiolosa*. *Journal of Asian Natural Products Research* 5, 143–150.
- Yang, D., Huang, Z., Xing, B., Jin, W., Yan, X., Guo, Z., and Liang, Z. (2016). Regulation of folic acid on phenolic acids production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 127, 175–185.
- Ye, G., and Huang, C. (2006). Flavonoids of *Limonium aureum*. *Chem Nat Compd* 42, 232–234.
- Yuan, X., Wang, Z., Liu, J., and She, J. (2009). Development of a plant regeneration system from seed-derived calluses of centipedegrass *Eremochloa ophiuroides* (Munro.) Hack. *Scientia Horticulturae* 120, 96–100.
- Yuan, Z., Druzhinina, I.S., Labbé, J., Redman, R., Qin, Y., Rodriguez, R., Zhang, C., Tuskan, G.A., and Lin, F. (2016). Specialized Microbiome of a Halophyte and its Role in Helping Non-Host Plants to Withstand Salinity. *Sci Rep* 6.
- Yue, J., Lin, Z., Wang, D., Feng, Y., and Sun, H. (1994). Plumbasides A—C three naphthoquinone derivatives from *Ceratostigma minus*. *Phytochemistry* 35, 1023–1025.
- Yue, J.-M., Xu, J., Zhao, Y., Sun, H.-D., and Lin, Z.-W. (1997). Chemical Components from *Ceratostigma willmottianum*. *J. Nat. Prod.* 60, 1031–1033.
- Yue, W., Ming, Q.-L., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C.-J., Han, T., and Qin, L.-P. (2016). Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36, 215–232.
- Yuliana, N.D., Jahangir, M., Verpoorte, R., and Choi, Y.H. (2013). Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. *Phytochem Rev* 12, 293–304.
- Zaragoza-Martínez, F., Lucho-Constantino, G.G., Ponce-Noyola, T., Esparza-García, F., Poggi-Varaldo, H., Cerda-García-Rojas, C.M., Trejo-Tapia, G., and Ramos-Valdivia, A.C. (2016). Jasmonic acid stimulates the oxidative responses and triterpene production in *Jatropha curcas* cell suspension cultures through mevalonate as biosynthetic precursor. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 127, 47–56.
- Zhang, M., Zhou, J., Wang, L., Li, B., Guo, J., Guan, X., Han, Q., and Zhang, H. (2014). Caffeic acid reduces cutaneous tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-6 and IL-1 β levels and ameliorates skin edema in acute and chronic model of cutaneous inflammation in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 37, 347–354.
- Zhang, Z., Lu, L., Liu, Y., Zeng, R., Xie, J., Huang, Y., Shen, Q., and Cheung, H. (2016). Determination of Antioxidants in *Smilacis Glabrae* Rhizoma by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet and Mass Spectrometry Detection. *Analytical Letters* 49, 1975–1985.
- Zhao, H., Bai, H., Li, W., Wang, Y., and Liu, A. (2011). Chemical constituents from *Polygonum capitatum*. *Natural Product Research and Development* 23, 262–266.

- Zhao, J., Davis, L.C., and Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23, 283–333.
- Zhou, D., Zhang, Y., Jiang, Z., Hou, Y., Jiao, K., Yan, C., and Li, N. (2017). Biotransformation of isofraxetin-6-O- β -d-glucopyranoside by *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels callus. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 27, 248–253.
- Zhou, L., Zheng, G., Wang, S., and Gan, F. (1992). Effects of oligosaccharins on callus growth and saponin content of *Panax notoginseng*. *Cell Res* 2, 83–87.
- Zhu, J.-K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6, 66–71.
- Zhu, J.-K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 441–445.
- Zhu, J.-H., Yu, R.-M., Yang, L., Hu, Y.-S., Song, L.-Y., Huang, Y.-J., Li, W.-M., and Guan, S.-X. (2010). Novel biotransformation processes of dihydroartemisinic acid and artemisinic acid to their hydroxylated derivatives by two plant cell culture systems. *Process Biochemistry* 45, 1652–1656.
- Ziaratnia, S.M., Ohyama, K., Hussein, A.A.-F., Muranaka, T., Lall, N., Kunert, K.J., and Meyer, J.J.M. (2009). Isolation and Identification of a Novel Chlorophenol from a Cell Suspension Culture of *Helichrysum aureonitens*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 57, 1282–1283.
- Zillich, O.V., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., and Kerscher, M. (2015). Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int J Cosmet Sci* 37, 455–464.



Lorène GOURGUILLON

Etude de deux halophytes, *Armeria maritima* (Mill.) Willd. et *Helichrysum stoechas* (L.) Moench : Exploration phytochimique, approche biotechnologique et valorisation dermo-cosmétique.

EDSC
École Doctorale des
Sciences Chimiques

Résumé : L'étude phytochimique d'*Armeria maritima* et d'*Helichrysum stoechas* a permis d'isoler pour la première fois 31 molécules dans le genre *Armeria* dont 4 nouveaux flavonols diglycosylés, ainsi que le développement d'une stratégie de déréplication pour l'étude d'*H. stoechas*. Dans les deux espèces, nous avons relevé une richesse en polyphénols, qui pourraient être extraits par des techniques respectueuses de l'environnement comme la SFE. En parallèle, ces deux halophytes ont montré un fort potentiel biologique avec des extraits et des molécules dotés d'activités anti-oxydante, anti-collagénase, anti-inflammatoire ou encore cicatrisante. De plus, nous avons initié pour la première fois des suspensions cellulaires d'*A. maritima* et identifié des éliciteurs comme le méthyl jasmonate permettant d'augmenter dans les cellules d'*H. stoechas* la teneur en acide 3,5-dicaféoylquinique, un bio-marqueur de l'activité anti-inflammatoire. La production de molécules bioactives dans des cultures végétales *in vitro* pourrait par la suite être transposée à plus grande échelle, afin d'amplifier le potentiel de valorisation de ces deux halophytes en dermo-cosmétique.

Mots clefs : Halophytes, *Armeria maritima*, *Helichrysum stoechas*, flavonoïdes glycosylés, phénols, lignanes, mégastigmanes, cicatrisation, cytokines pro-inflammatoires, antioxydant, collagénase, callogénèse, suspensions cellulaires, élicitation

Abstract : The phytochemical study of *Armeria maritima* and *Helichrysum stoechas* led to the isolation of 31 molecules never reported before in the genus *Armeria*, 4 of which being new flavonol diglycosides, and to the development of a dereplication strategy for the study of *H. stoechas*. In both species, an abundance of polyphenols was observed, which could be extracted with eco-friendly methods like SFE. Both halophytes showed a strong biological potential as their extracts and molecules demonstrated antioxidant, anti-collagenase, anti-inflammatory and wound healing activities. Moreover, we initiated for the first time cell suspensions of *A. maritima*, and identified elicitors, such as methyl-jasmonate, which led to *H. stoechas* cell suspensions with an increased content in 3,5-dicaffeoylquinic acid, a bio-marker of anti-inflammatory activity. The production of bioactive molecules in "plant cell factories" could be scaled-up to enhance the valorization potential of both halophytes in dermocosmetics.

Keywords : Halophytes, *Armeria maritima*, *Helichrysum stoechas*, flavonoid glycosides, phenols, lignans, megastigmanes, wound-healing, pro-inflammatory cytokines, antioxidant, collagenase, callogenesis, cell suspensions, elicitation

Nom du document : Manuscrit version corrigée.docx
Répertoire : C:\Users\Lorène\Dropbox\manuscrit
Modèle : C:\Users\Lorène\AppData\Roaming\Microsoft\Templates\Normal.dotm
Titre :
Sujet :
Auteur : Lorène gourguillon
Mots clés :
Commentaires :
Date de création : 06/07/2017 17:45:00
N° de révision : 43
Dernier enregistr. le : 27/07/2017 14:40:00
Dernier enregistrement par : Lorène gourguillon
Temps total d'édition :766 Minutes
Dernière impression sur : 27/07/2017 14:40:00
Tel qu'à la dernière impression
Nombre de pages : 434
Nombre de mots : 349 950 (approx.)
Nombre de caractères : 1 924 725 (approx.)