

2016-2017

Mention Biologie et Technologie du Végétal

iteipmai

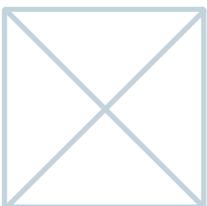


Participation à l'étude phyto- chimique de la Bardane

LEGAST Emilie |

Sous la direction de **M. BELLENOT** |

Membres du jury
SIMIER Philippe | Président
FONTAINE Kévin | Tuteur
MONTIEL Grégory | Auditeur



Soutenu publiquement le :
28 Juin 2017



ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussignée Emilie Legast
déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiante le **22 juin 2017**

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de mon stage et qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce rapport.

Tout d'abord, je tiens à remercier vivement mon maître de stage, Monsieur Denis BELLENOT, responsable du service Phyto-chimique et Normalisation au sein de l'Iteipmai, pour son accueil, le partage de ses connaissances et son expertise au quotidien. Grâce à son aide j'ai pu en apprendre beaucoup dans un domaine qui m'était inconnu. Je le remercie également pour sa patience lors de la correction de ce rapport de stage.

Je tiens également à adresser mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidée lors de mon stage, Amandine ARIAS CUENOT, Karine LOUVARD, Marianick BAPST et Aurélie BOUET. Elles m'ont aidé à trouver mes marques dans le laboratoire et répondu à toutes mes questions. Je les remercie leurs patience et leurs disponibilité tout au long de mon passage à l'Iteipmai.

Enfin je voudrais remercier mon professeur Kévin FONTAINE, pour ses précieux conseils lors de la rédaction de ce rapport.

Ce stage est une vraie chance car il m'a beaucoup appris dans le domaine de la phyto-chimie et m'a aidé dans le choix de mon parcours professionnel. Je remercie donc la personne qui m'a donnée l'occasion de découvrir cette entreprise.

Table des matières

TABLE DES FIGURES

TABLE DES TABLEUX

1.	Introduction	1
1.1.	Iteipmai.....	3
1.2.	Les objectifs de l'étude.....	3
1.3.	Recherches bibliographiques sur la Bardane et ces composés.....	5
1.4.	Stratégie	9
2.	Matériel et Méthodes	11
2.1.	Matériel biologique.....	11
2.2.	Dosage des Acides hydroxycinnamiques.....	11
1.1.	CCM semi-préparative et GC/MS	15
1.2.	CCM	15
1.3.	Extraction sur phase solide (SPE)	17
1.4.	RMN	17
2.	Résultats	17
2.1.	Dosage des Acides hydroxy-cinnamiques	17
2.2.	Identification de composé polyacétylène dans le lappaphen	23
3.	Discussion	25
3.1.	Dosage des Acides hydroxy-cinnamiques	25
3.2.	Identification de composée poly-acétylène dans le Lappaphen.....	29
4.	Conclusions et perspectives	31
5.	Bibliographie	33
6.	Annexe	35
6.1.	Annexe 1- Tableau 5 Résumé des résultats des dosages de chaque échantillon	35
6.2.	Annexe 2- Spectre obtenu par RMN de l'extrait fluorescent bleu	35
6.3.	Annexe 3- Protocole du dosage des dérivés hydroxycinnamique totaux exprime en acide chlorogénique par spectrometrie	37

Table des Figures

Figure 1 Organigramme Iteipmai	2
Figure 2 Planche d'herbier de la partie aérienne fleurie d' <i>Arctium lappa</i>	4
Figure 3 Exemples de composé aliphatique C15 et C16 identifiés dans les plantes de l'espèce des <i>Asteraceae</i> , d'après Konovalov et al., 2014.	6
Figure 4 Exemples de polyacétylènes mono et dithiophènes identifiés dans les plantes de l'espèce des <i>Asteraceae</i> , d'après Konovalov et al., 2014.	6
Figure 5 Structure de guaianolides d'après Simonsen et al., 2013	8
Figure 6 Structure du Lappaphen-a d'après Washino et al., 1987.....	8
Figure 7 Structure du Beta-sitostérol	8
Figure 8 Schéma de la stratégie expérimentale	8
Figure 9 Schéma synoptique de la méthode de dosage des acide hydroxy-cinnamiques	10
Figure 10 Schéma synoptique du protocole de la CCM semi-préparative couplé à la GC/MS	14
Figure 11 Schéma synoptique du protocole de l'extraction sur phase solide SPE	14
Figure 12 Coefficient de variation des résultats des dosages selon la filtration utilisée.....	16
Figure 13 Mesure de l'évolution de la Do en fonction du temps après ajout des réactifs	16
Figure 14 Boxplot des résultats obtenu après pesé le jour même (1) et pesé la veille(2)	18
Figure 15 Comparaison des deux méthodes de prise d'essai, l'une la veille de la mesure (droite noir) et l'autre le jour même (triangle bleu).....	18
Figure 16 Différence de concentration des échantillons mesurée en fonction du temps de conservation des réactifs	18
Figure 17 Concentrations en acide chlorogénique en fonction de la DO mesuré sur les essais A1, B1 et C1	18
Figure 18 Boxplot des concentrations mesurées des différents groupes d'échantillons	20
Figure 19 Boxplot des résultats du dosage des échantillons E147 à E154, E16 et E196	20
Figure 20 Corrélation Comparant les résultats obtenus à l'Iteipmai avec un autre laboratoire	20
Figure 21 CCM Echantillon E153 RF : 0.77	22
Figure 22 CCM Echantillon E96 RF haut en bas bande rouge 1 : 0.94, bande 2 : 0.86, bande 3 : 0.8.....	22
Figure 23 CCM obtenu avec l'échantillon E16, RF de haut en bas : Bande 4(rouge) : 0.88, Bande 3 : 0.83, Bande 2 : 0.75, Bande 1 : 0.37	22
Figure 24 Flacon d'extrait pour la GC/MS.....	22
Figure 25 CCM de l'échantillon E153 avec un témoin beta-sitostérol à droite.....	24
Figure 26 Superposition des spectres de l'échantillon E153 et du témoin de beta sitostérol	24

Table des Tableaux

Tableau 1 Volume des réactifs et témoins.....	12
Tableau 2 Moyenne des concentrations par groupe en g par 100 g.....	20
Tableau 3 coefficient de variation entre les résultats obtenu à l'Iteipmai et ceux de l'autre laboratoire	20
Tableau 4 RF moyen des bandes bleu sur les CCM des deux échantillons E153 et E96.....	22
Annexe 1 Tableau 5 Résumé des résultats des dosages de chaque échantillon	35

Participation à l'étude phyto-chimique de la Bardane

1. Introduction

Les plantes ont toujours été au cœur de la médecine, autant dans la médecine moderne que dans la médecine traditionnelle. En effet, les plantes sont une grande source de matière première pour des traitements médicaux; et depuis la médecine traditionnelle chinoise jusqu'au traitement actuel du Paludisme, il existe de nombreux exemples de l'efficacité des traitements à base de plante. Dans ces traitements, ce sont les métabolites secondaires présents dans les plantes qui ont le plus grand intérêt. Parmi les 422 000 plantes à fleurs connues, le nombre de plante utilisées à des fins médicales est estimé à 70 000 (Schippmann *et al.*, 2006). Les PPAM, plantes à parfum, aromatiques et médicinales, représentent donc un marché important, qui est actuellement en pleine expansion. La Chine est le pays dominant de ce marché avec 194 900 tonnes de produits exportés (Ilbert *et al.*, 2016). En France métropolitaine, 3 496 exploitations ont été recensées en 2014 avec une surface de production de 42 000 ha de PPAM (Allain *et al.*, 2016). La part la plus importante en surface de production est celle des lavandes et lavandins produits au sud, représentant la moitié de la surface de production.

La filière des PPAM est très diversifiée en termes d'utilisation industrielle, les produits issus de ces plantes sont redistribués dans 5 secteurs d'après une étude de France AgriMer, (Allain *et al.*, 2016) :

- Les plantes coupées et triées, utilisées en herboristerie et en complément alimentaire
- L'extraction alcoolique et hydro alcoolique, avec pour principaux débouchés l'utilisation en pharmacie ou en cosmétique.
- Les huiles essentielles, utilisées en cosmétique, parfum et pharmacie
- L'extraction avec des hydrocarbures où les PPAM sont transformé en « concrètes » qui peuvent être reprises par alcool puis purifiées par précipitation des cires à froid pour donner des « absolues » qui serviront dans les parfums aromatiques
- L'extraction sélective, avec pour débouché la pharmacie.

La région des Pays de la Loire est un lieu de production important, avec une soixantaine de producteurs dispersés sur près de 900 ha ('La filière PSBBE des Pays de la Loire: Situation et Enjeux', 2009). La principale richesse de la production de cette région est sa diversité de plantes cultivées. Cette diversité est due à un savoir-faire régional, entretenu par la présence de structures tel que le pôle de compétitivité du végétal, VEGEPOLYS, l'iteipmai (l'institut de recherche national de la filière), l'INRA, le GEVES, et d'autres structures spécialisées. Celles-ci apportent un véritable atout en termes d'innovation, d'outils de recherche et de structuration de la filière.

L'iteipmai, qui est l'une de ces structures, a un rôle majeur dans la filière des PPAM. Il s'agit d'une association, répartie en deux centres ; la station nationale basée à Chemillé-Melay, et la station Sud-Est, basée au Centre d'expérimentation de la Vallée du Rhône, près de Montélimar. Cet organisme a pour mission l'élaboration de nouvelles variétés, le développement d'outils de conseil, et la participation à la structuration de la normalisation dans la filière des PPAM en partenariat avec l'AFNOR et la pharmacopée européenne.

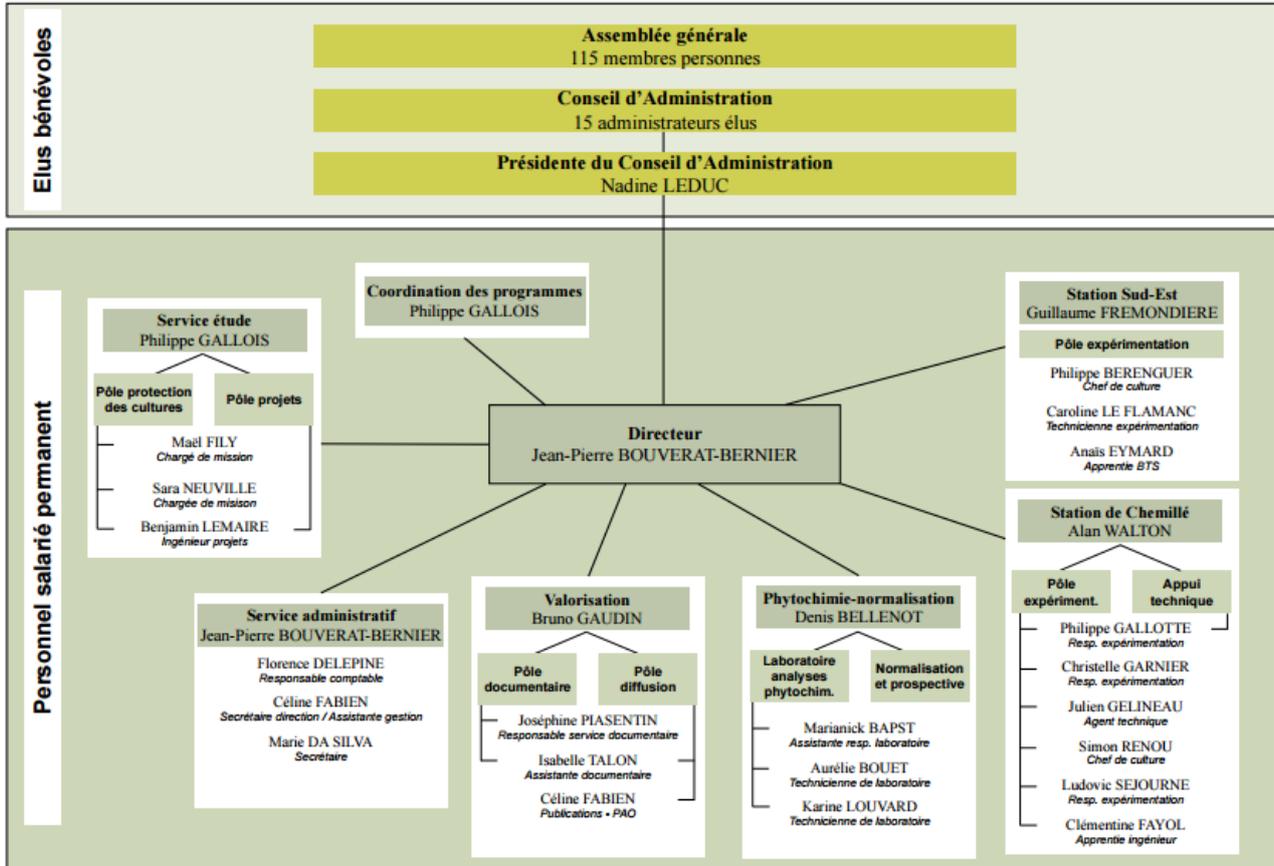


Figure 1 Organigramme Iteipmai

1.1. Iteipmai

L'iteipmai est une association, créée en 1980. Cette structure de 25 salariés est gérée par Monsieur Jean-Pierre Bouverat-Bernier. La station nationale de Chemillé-Melay est le siège de l'association. Elle s'étend sur 12 ha de terrain d'expérimentation consacrés à la création variétale et l'amélioration des itinéraires techniques et comporte un laboratoire pour l'expérimentation, les analyses phyto-chimiques et le traitement d'information. La station sud-est est spécialisée dans les plantes à parfum et aromatiques.

L'association elle-même est répartie en plusieurs secteurs (figure 1) : le service d'étude chargé de la mise en place de projets et la connaissance en matière de protection des cultures, le service administratif permettant l'organisation générale de l'association, le service valorisation chargé de diffuser les études et les résultats obtenu par l'expérimentation, les services d'expérimentation de la station Sud-Est et Chemillé, chargés de la création variétal et de l'expérimentation et le service Phytochimie- Normalisation chargé d'analyser les échantillons, et aidant à la structuration de la normalisation de la filière.

En effet, les PPAM sont soumises à des réglementations spécifiques auxquels les producteurs doivent se conformer. La pharmacopée européenne est le principal acteur de la réglementation, par la création de monographies dans lequel sont décrites les plantes pouvant être utilisés à des fins médicales et les substances chimiques identifiées (les principes actifs ou des marqueurs d'identification de la plantes). Les extraits et produits doivent donc être contrôlés afin de certifier leurs identités et leurs compositions. L'iteipmai effectue ces analyses dans le respect des normes de la pharmacopée, pour divers clients.

C'est le service phyto-chimie qui propose ces prestations : il s'agit de l'analyse de la qualité des produits des producteurs. Ces analyses sont faites sur différents types d'échantillons : des plantes, extraits, huiles essentielles, Elles sont faites dans le respect des normes officielles. L'équipement du laboratoire permet des analyses sur une large gamme de molécule, à l'exclusion des contaminants. Cette diversification permet à l'iteipmai d'avoir un grand nombre de partenaires et de clients provenant de ces différents secteurs, tels que des laboratoires, et des producteurs.

La difficulté du laboratoire est la quantité variable d'analyses, les commandes sont ponctuelles et les quantités d'échantillons très variables, la répartition de l'activité est donc très changeante dans l'année, il y a cependant une hausse à la fin de saison estivale, correspondant aux récoltes des plantes. Il existe peu de laboratoires proposant ce type de service, aussi la concurrence est faible (BotaniCert, InVivoLabs,..). Mais la demande dans ce secteur est également faible, par exemple les grandes entreprises utilisant des produits aromatiques tel que Ducros ont leurs propre laboratoire in-situ, ce qui réduit la demande.

1.2. Les objectifs de l'étude

L'étude effectuée, entre dans le cadre de la normalisation d'une PPAM. La Bardane, comme beaucoup de PPAM, fait l'objet de recherche, car elle possède de nombreuses molécules d'intérêt qui pourraient être utilisés en pharmacopée. La plante fait donc l'objet d'une nouvelle demande. Ce qui entraine un besoin des producteurs, qui doivent prouver la qualité de leurs produit, et des entreprises tel que l'iteipmai qui ont besoin d'un ensemble de protocoles normalisés, pour validé la qualité de la plante. Pour répondre à ces besoin, il existe actuellement une monographie de la Bardane à la pharmacopée française et la pharmacopée européenne a pour projet de moderniser ces textes. Le texte de la monographie décrit les substances chimiques identifiées dans la plante.



Figure 2 Planche d'herbier de la partie aérienne fleurie d'*Arctium lappa*

Dans la Bardane, il existe plusieurs substances chimiques identifiées d'intérêt, dont des acides phénols. Dans ce cadre, la méthode de dosage des dérivés hydroxy-cinnamiques totaux doit être validée afin d'être intégrée dans la mise à jour de la monographie européenne de la Bardane. La pharmacopée européenne cherche également un marqueur spécifique de la Bardane qui permettrait son identification par CCM.

Cette étude a donc deux objectifs : dans un premier temps l'étude du dosage des acides hydroxy-cinnamiques en déterminant la robustesse de la méthode, puis dans un second temps l'identification de composés poly-acétyléniques dans la racine de Bardane. L'un de ces composés pourrait être un marqueur d'identification spécifique de la Bardane.

1.3. Recherches bibliographiques sur la Bardane et ces composés

Afin de mettre en place cette étude, différentes recherches ont été effectuées afin de mieux connaître la plante et les composés étudiés. L'étude des dérivées hydroxycinnamiques permet la compréhension de la méthode de dosage et les recherches sur les composés poly-acétyléniques ont permis d'identifier une molécule, spécifique de la Bardane, et de mieux cibler les analyses utilisées pour son identification.

1.3.1. La Bardane

La Bardane, *Arctium lappa* est une Asteracée. Elle est fréquente dans toute l'Europe, à l'exception de la région méditerranéenne (Wichtl & Anton, 2003). Elle est cultivée en France et dans l'Europe de l'Est, Bulgarie et Pologne, pour ses vertus médicinales. La récolte s'effectue en automne lors de la première année ou au printemps lors de la seconde année. En France, elle se trouve fréquemment dans les terrains vagues et les bords des chemins. La Bardane est également présente en Asie et en Amérique du Nord.

Les parties aériennes forment une grande plante qui peut aller jusqu'à 150 cm de hauteur. Ses tiges sont reconnaissables par la présence de poils. Elles portent de grandes feuilles de parfois 50 cm de longueur. Celles-ci portent également des poils sur la phase interne du limbe.

La Bardane est reconnaissable par ces capitules terminaux de formes rondes. Les fleurs prennent place sur le dessus de ces capitules, elles sont tubulaires des couleurs rouges. Tout le reste des capitules est entouré d'involucre de bractées. Ces bractées ont la particularité de se terminer en pointes recourbées, ce qui leur donne une forme de crochet (figure 2).

La racine de la Bardane, est de type pivotant. Sa couche externe est brune, et elle est blanche dans la partie interne. C'est cette partie de la plante qui est utilisée dans la pharmacopée.

Les principaux composés présents dans la racine de bardane sont l'inuline, des guaianolides, des acides phénols (acide caféique, chlorogénique, acide dicaféylquinique et dérivés succinylés) et des composés polyinsaturés (polyènes et polyynes) dérivées du lappaphène (BRUNETON, 2009).

La Bardane est traditionnellement utilisée comme traitement pour les infections bactériennes. Elle est également beaucoup utilisée dans la cuisine au Japon, en Corée et en Chine, considérée comme un aliment bon pour la santé. De nombreux chercheurs se sont intéressés aux composés des différents organes de la plante, pour connaître leurs potentielles utilisations médicinales.

Certains composés trouvés dans la feuille et le fruit de la bardane, comme arctigenin, arctiin, et matairesinol, auraient des propriétés permettant la limitation du développement des cellules cancéreuses

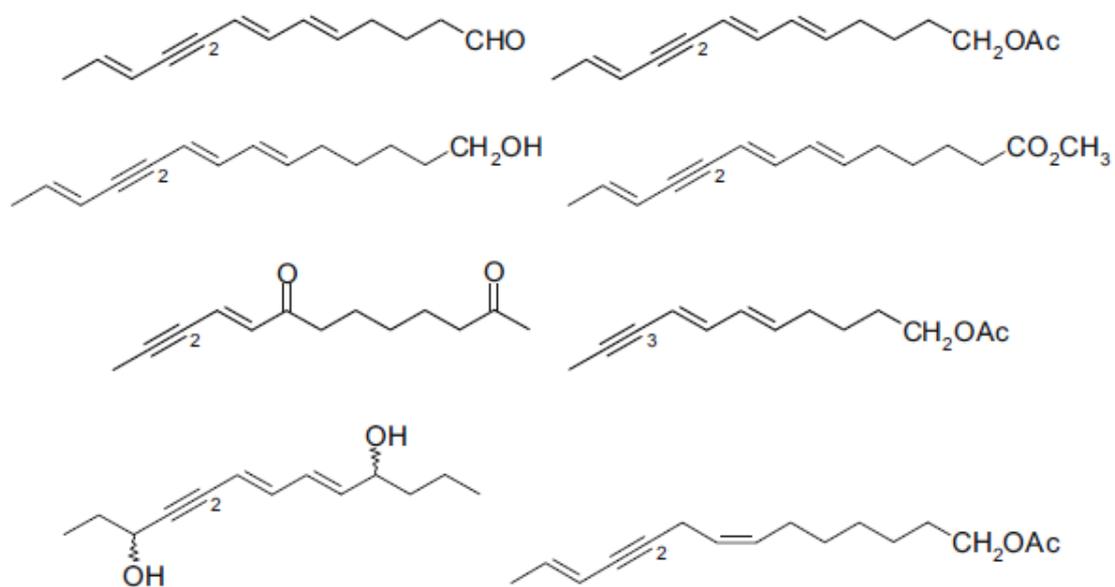


Figure 3 Exemples de composé aliphatique C15 et C16 identifiés dans les plantes de l'espèce des *Asteraceae*, d'après Konovalov et al., 2014.

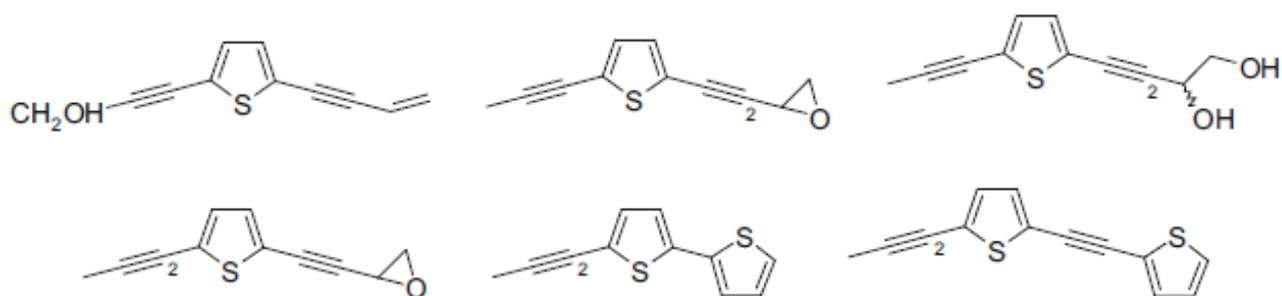


Figure 4 Exemples de polyacétylènes mono et dithiophènes identifiés dans les plantes de l'espèce des *Asteraceae*, d'après Konovalov et al., 2014.

(Liu *et al.*, 2005). Les acides phénols seraient les principaux responsables de l'activité antibactériennes de la racine de bardane (Lou *et al.*, 2010), ce sont également des antioxydants qui accroissent l'intérêt pharmaceutique de la plante. D'autres composés présents dans la bardane semblent avoir des effets positifs sur la guérison de brûlure et des propriétés anti-inflammatoires (Robbins, 2013).

1.3.2. Les Dérivés Cinnamiques

La racine de Bardane contient jusqu'à 3,5% d'acides phénols (BRUNETON, 2009). Parmi ces composants, il y a des dérivés hydroxycinnamiques tel que les acides chlorogéniques et les acides caféiques (Chan *et al.*, 2011). Parmi ces acides, 24 dérivés hydroxycinnamiques sont dénombrés dans la racine de bardane (Lin & Harnly, 2008). Ces acides sont analysés dans les échantillons de racines de Bardanes afin de connaître leurs teneurs. Le protocole appliqué provient d'un dosage décrit par L.E Arnow 1937. Cette méthode utilise la synthèse d'un dérivé coloré mesurable par spectrométrie. Elle s'inspire de la réaction entre le 3,4-dihydroxyphenylalanine et une tyrosinase qui aboutit à la formation de mélanine, un composé coloré. Dans notre cas les molécules d'acides phénols prennent une coloration jaune en présence d'acide nitrique. La coloration devient rouge en excès d'hydroxyde de sodium. A cela sont ajoutés deux réactifs ; le molybdate de sodium, qui est ajouté en même temps que le nitrate de sodium, permet la stabilisation de la réaction, il empêche la décomposition trop rapide de l'acide nitreux. Pour cette raison, la réaction est stable une trentaine de minutes après l'ajout des réactifs. Dans un second temps, le milieu est acidifié, afin d'empêcher une précipitation de la mélanine et qu'elle conserve sa coloration rouge (Arnow, 1937). Ces deux réactifs ont donc un rôle de stabilisation de la réaction. Ce dosage établit la concentration de la racine analysée en g acide chlorogénique pour 100 g de matière, l'un des principaux dérivés hydroxycinnamiques présents dans la Bardane.

Ces dérivés sont beaucoup décrits dans la littérature, ils auraient une importante activité anti-oxydante intéressante, fournissant une source naturelle importante, qui pourra être utilisée dans la formulation de nouveaux médicaments. Cependant, l'activité anti-oxydante de la plante est plus importante dans les graines, car elles contiennent plus de composés phénoliques (Ferracane *et al.*, 2010).

1.3.3. Les dérivées acétyléniques

Les composés acétyléniques sont des composés présents dans la nature, chez les plantes, les lichens, mousses champignons, les insectes et les bactéries. Ils sont distribués dans un nombre restreint de familles végétales; 24 familles dont 7 où ils sont plus présent : les *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Araliaceae*, *Campanulaceae*, *Olacaceae*, *Pittosporaceae* et *Santalaceae*. Ces composés comprennent toutes les substances avec des triples liaisons entre deux carbones ou des groupes fonctionnels alkyles (Konovalov, 2014). Les dérivés acétyléniques ont une diversité structurelle assez importante, comme des structures cycliques ou aliphatiques, qui peuvent contenir des atomes d'oxygène, azote, ou soufre, cela les rend très spécifiques et faciles à identifier. La particularité de la triple liaison rend ces composés chimiquement ou biologiquement actifs. Un rôle de défense leur est souvent attribué dans le cas des plantes ; ils permettraient de limiter des attaques de pathogènes fongiques ou de nématodes. Ils sont particulièrement présents chez la famille des *Asteraceae*, une famille de plante dans laquelle 1100 types d'acétylènes différents ont été identifiés (Konovalov, 2014). La Bardane fait partie de cette famille et plus particulièrement de la tribu des *Cardueae*.

La tribu des *Cardueae*, contient de nombreux dérivés acétyléniques :

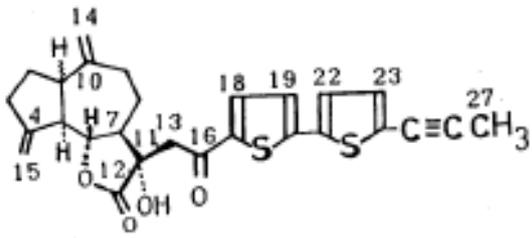


Figure 6 Structure du Lappaphen-a d'après Washino et al., 1987.

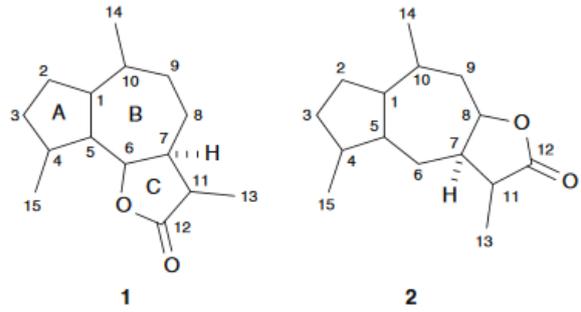


Figure 5 Structure de guaianolides d'après Simonsen et al., 2013

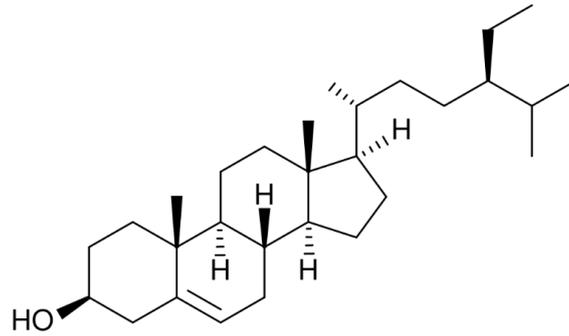


Figure 7 Structure du Beta-sitostérol

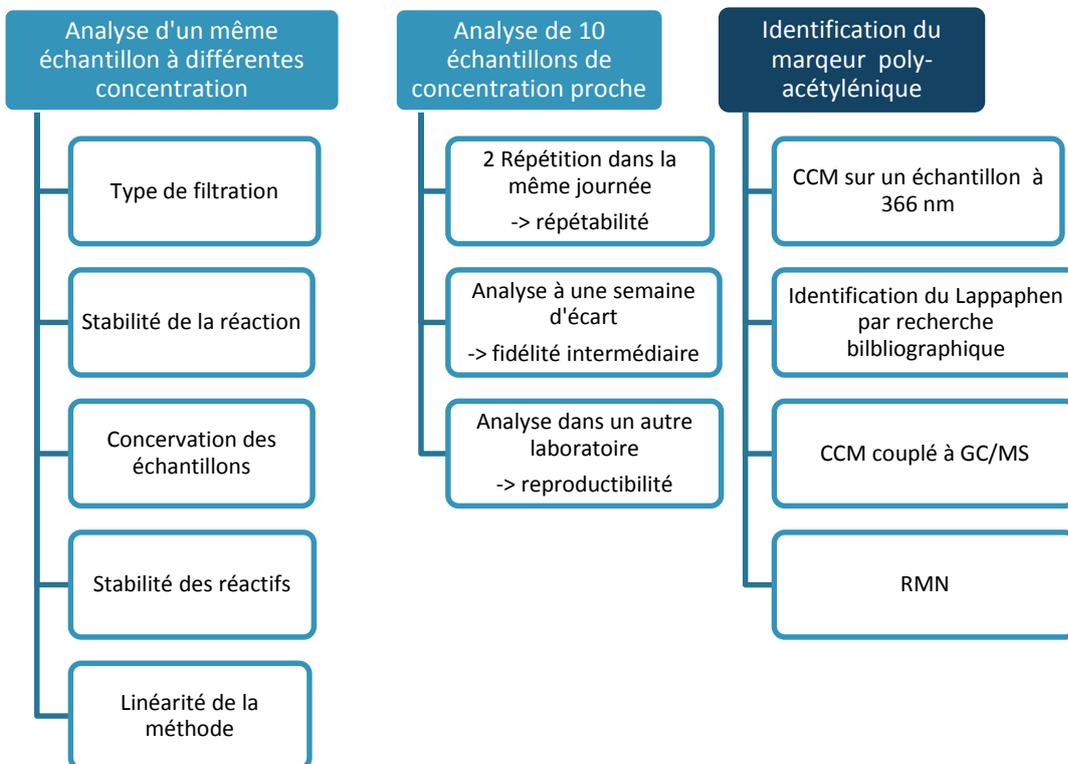


Figure 8 Schéma de la stratégie expérimentale

- des composés aliphatiques C15- C16, qui correspondent à de longues chaînes carbonées, possédant un ion oxygène, soit sous la forme de groupement alcool ou sous la forme de composé carbonyle (figure 3).
- des mono, di ou trithiophènes, qui sont des hétérocycliques aromatiques soufrés, compris dans une chaîne carbonée. Il peut y avoir un ou plusieurs hétérocyclique par molécule (figure 4).

Les dérivés thiophènes trouvés chez *Arctium lappa*, sont très spécifiques, car pour certains, ils n'ont été trouvés chez aucune autre *Asteraceae* (Christensen & Lam, 1990). L'un de ces composés, est le Lappaphen (Washino *et al.*, 1987) . Il a une structure particulière, avec un groupement di-thiophène lié à un sesquiterpène-phénol (figure 5). C'est une molécule facilement détectable sous UV à 366 nm, car elle fluoresce d'une couleur bleutée. Il est également caractéristique d'une autre famille de composés, les Guaianolides. Les Guaianolides sont un groupe de sesquiterpènes qui ont une importante activité biologique (Simonsen *et al.*, 2013). Les propriétés biologiques de ces composés ont encouragé les recherches à leur sujet dans le but d'obtenir de nouvelles sources naturelles de traitement médical. Ils sont composés d'un squelette à trois cycles (figure 6), comme le Lappaphen. Les Guaianolides sont présents chez de nombreux organismes. La majorité de ces composés ont été découverts chez des végétaux tel que les *Asteraceae*, ou les *Apiaceae*. Ils ont été décrits comme ayant des activités anti-tumorales, anti-schistosomiques, antimicrobiennes, stimulatrices de la croissance racinaire. Malheureusement ce sont également des molécules toxiques, ce qui explique leur absence dans les traitements d'aujourd'hui. De nombreuses pistes telles que la synthèse et la biosynthèse sont étudiées, ce qui permettrait également de ne pas avoir le problème d'épuisement des ressources naturelles. Des recherches ont été faites sur la biosynthèse et les activités biologiques de ces composés, mais il existe très peu d'articles dédiés au Lappaphen et à *Arctium Lappa*.

1.3.4. Le Beta-Sitostérol

Ce composant a été détecté lors d'une analyse, ce qui a suscité l'intérêt. En effet s'il était spécifique de la Bardane, sa détection aurait été bénéfique pour cette étude. Pour cette raison une recherche rapide a été effectuée à son sujet.

Le β -sitostérol est l'un des principaux phytostérol utilisé dans l'industrie alimentaire trouvé chez les plantes ('Human Metabolome Database: Showing metabocard for Beta-Sitosterol (HMDB00852)') (figure 7). Il se retrouve surtout dans les graines et les fruits: les graines de citrouille, le germe de blé, le grain de maïs, graine de soja, etc. Cette molécule a de potentielles activités dans la prévention des cancers humains. Il possède une longue chaîne carbonée cyclisée, avec une fonction alcool.

Cela signifie qu'il n'est pas spécifique de la Bardane, et ne pourra être utilisé comme marqueur.

1.4. Stratégie

Les recherches bibliographiques associées aux études préliminaires ont contribué à la mise en place d'une stratégie expérimentale.

En ce qui concerne la détermination de la robustesse de la méthode du dosage des acides hydroxycinnamiques, un protocole fourni a donné la première base sur laquelle repose toutes les analyses. Le principe de la méthode et la description par L.E Arnow ont permis de connaître les points critiques de la méthode. L'étude de cette méthode a été faite en deux parties (figure 8) tout d'abord un même échantillon a été analysé plusieurs

Préparation de la solution échantillon

Prise d'essai :
peser 0.600 g

Chauffer à reflux au bain marie
pendant 30 min dans l'éthanol à 50%

Laisser refroidir puis filtrer dans une
fiolle de 100 ml

Rincer le filtre

Compléter à 100ml

Préparation des réactifs

Ethanol 50% V/V

Solution d'acide
chlorhydrique à 0.5M

Réactif d'Arnou (pour 100ml):
10 g de Nitrite de sodium
10 g de molybdate de sodium

Solution d'hydroxyde de sodium dilué à
8,5g pour 100ml

Toute les solutions devons être thermostaté à 20°C avant d'être compléter au volume final

Solution à examiner

Dans un tube à essai

Ajouter 1 ml de solution échantillon

Ajouter 2ml d'acide chlorhydrique à 0.5M

Ajouter 2ml de Réactif d'Arnou

Ajouter 2ml d'hydroxyde de sodium

Compléter à 10 ml avec de l'eau distillé

Solution de compensation

Dans un tube à essai

Ajouter 1 ml de solution échantillon

Ajouter 2ml d'acide chlorhydrique à 0.5M

Ajouter 2ml d'hydroxyde de sodium

Compléter à 10 ml avec de l'eau distillé

Mesurer immédiatement l'absorbance de la solution échantillon à 525 nm par comparaison à la
solution de compensation

Figure 9 Schéma synoptique de la méthode de dosage des acide hydroxy-cinnamiques

fois avec des concentrations différentes afin de déterminer la robustesse de la méthode. Certains paramètres ont ainsi pu être étudiés comme la stabilité des solutions et la linéarité du dosage. Ensuite, une série de 10 échantillons a été analysée à plusieurs reprises et dans un autre laboratoire afin de déterminer la fidélité de la méthode. Tout au long de cette étude, différents paramètres de la méthode ont été changés, ce qui a influencé positivement les résultats.

En parallèle, la recherche des composés poly-acétyléniques dans la racine de Bardane s'est faite de manière empirique : Des recherches avaient déjà été faites sur ces composés, d'après celles-ci, ils se manifestent par une fluorescence bleue à 366 nm sur CCM. Par la suite des recherches bibliographiques ont permis d'obtenir plus d'informations ; la molécule qui émet cette fluorescence est le Lappaphen, une molécule spécifique de la racine de bardane. Une CCM semi préparatrice a été faite puis des fractions ont été récupérées puis analysées en GC/MS. Malheureusement aucun élément n'a été identifié. Dans le but d'essayer une nouvelle méthode d'identification, un nouvel échantillon a donc été extrait puis séparé en plusieurs fractions sur colonne SPE, avant d'être analysée par RMN.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel biologique

Le matériel utilisé est de la poudre de granulométrie 355, de racine séché de Bardane. Il y a plusieurs échantillons, dont 8 provenant d'un premier fournisseur (E147 à E154) et deux échantillons provenant d'un second fournisseur (E16 et E96). L'échantillon E96 était fourni sous forme de morceau non pulvérisé, il a donc été conditionné sous forme de poudre 355 pour le dosage.

2.2. Dosage des Acides hydroxycinnamiques

Le dosage des acides hydroxy-cinnamiques est un dosage décrit par L.E Arnow 1937. Il convient pour tous les ortho diphénols. Il est d'ailleurs déjà décrit dans la pharmacopée pour doser l'acide rosmarinique dans le romarin et la mélisse, à la différence du calcul final. La méthode décrite figure 9, est celle qui a été utilisée pour chaque dosage. Le matériel utilisé est le suivant :

- Broyeur Cyclo Tech
- Balances : Balance METTLER AE260 précision 1mg, Balance RADWAG XA60220 précision 1/10° mg
- Spectromètre BIO-TEK INSTRUMENTS
- Acide chlorhydrique 99% Sigma Aldrich
- Ethanol absolu 99.9% SERVILAB
- Hydroxyde de sodium pastille CARLO ERBA
- Molybdate de sodium FLUKA
- Nitrite de sodium CARLO ERBA

Cette méthode permet le calcul de la teneur pour cent en dérivés hydroxy-cinnamiques totaux, exprimés en acide chlorogénique, à l'aide de l'expression : $(A \times 5.3) / m$. Dans cette expression, A est la mesure de l'absorbance mesurée (Do de la solution à examiner - Do de la solution de compensation), le M exprime la masse en g, et le 5,3 est une simplification du pourcentage, de la dilution et de l'absorbance spécifique de l'acide

Tableau 1 Volume des réactifs et témoins

Volume ml de solution mère,	1	1	1	1	1
ml d'acide chlorhydrique 0,5 M,	2	2	2	2	2
ml de solution d'Arnou	2	2	2	2	2
ml de solution diluée d'hydroxyde de sodium R	2	2	2	2	2
V de solution d'acide chlorogénique à 0,12 mg/ml	0	0,5	1	1,5	2
complétez à 10,0 ml avec de l'eau R	3	2.5	2	1,5	0
Concentration mg/ml d'acide chlorogénique dans les tubes à essais	0,006	0,012	0,018	0,024	0,030

chlorogénique à 525 nm qui est de 188 :

$$m \text{ pour } 100 \text{ g} = \frac{A \times 0.1}{188 \times m} \times 100 = \frac{A \times 1000}{188 \times m} = \frac{A \times 5.3}{m}$$

Certaines modifications ont été apportées sur la méthode au cours du temps :

- La filtration : Lors des premiers dosages la filtration se faisait sur coton, mais après les premiers résultats, les filtres coton ont été remplacés par des filtres papier qui ont donné de meilleurs résultats.
- La plupart du temps les pesées de la prise d'essai étaient faites à l'avance, la veille de la manipulation, mais lors des derniers dosages ce point a été changé et toutes les pesées se font maintenant le jour même du dosage.

Lors d'un dosage les échantillons testés subissent une mesure de la matière sèche afin d'obtenir une teneur finale en g d'acide pour cent gramme de matière sèche. La matière sèche est obtenue après pesé d'une portion d'échantillon, ici 2 g, avant et après passage à l'étuve durant une nuit.

Dans un premier temps, les dosages ont été effectués sur un même échantillon, E16, à différentes concentrations en triple répétition. Pour cela la masse pesée lors de la prise d'essai a été modifiée, obtenant ainsi après extraction un échantillon plus concentré. Les masses choisies sont 0,200g, 0,600g, 1,800g et 2,500g. Ces masses permettent d'avoir des échantillons avec des concentrations équivalentes de 0,06mg/ml, 0,18mg/ml, 0,54 mg/ml et 0,75 mg/ml. Cela permettrait de voir si la masse choisie est optimisée pour le dosage, ainsi que les limites de concentration de l'échantillon.

Après cela, la linéarité de la méthode a été évaluée par un dosage où une faible masse d'échantillon a été pesée, puis un volume d'une solution d'acide chlorogénique a été ajouté afin d'obtenir une échelle de concentration croissante (tableau 1) Ce dosage a été fait selon le protocole illustré figure 9.

Enfin, les dosages ont été effectués sur plusieurs échantillons E147 à E154, E16 et E96, chaque semaine durant 3 semaines en double répétition afin de déterminer la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité de la méthode. La répétabilité est déterminée par le calcul du CMV, coefficient de variation entre deux répétitions d'un même échantillon : $CMV = \left(\frac{100 \times \text{Ecartype des concentrations}}{\text{Moyenne des concentrations}} \right)$.

Dans un second temps la fidélité intermédiaire est mesurée. Il s'agit de la variabilité intra-laboratoire, celle-ci englobe donc tout l'essai effectué fait sur un même échantillon. Pour déterminer si la méthode est répétable, il faut comparer la valeur du coefficient de répétabilité avec la différence absolue entre la valeur minimum et la valeur maximum obtenu. Le coefficient de répétabilité se calcule avec l'équation suivante : $3,3 - S_r$,

S_r étant l'écart type corrigé de répétabilité. Dans le cas où la différence est inférieure au coefficient, il est possible de dire que les essais sont répétables entre eux.

Un intervalle a pu être calculé en fonction de l'incertitude élargie. L'incertitude élargie est un paramètre associé au résultat d'une mesure pour caractériser la dispersion raisonnable que l'on peut associer à la valeur de cette mesure. Elle est calculée selon le niveau de confiance bilatérale de la moyenne arithmétique de la série, ici 95%. L'équation utilisée est la suivante :

$$\frac{t(0.975, n - 1) \times s}{\sqrt{n}}$$

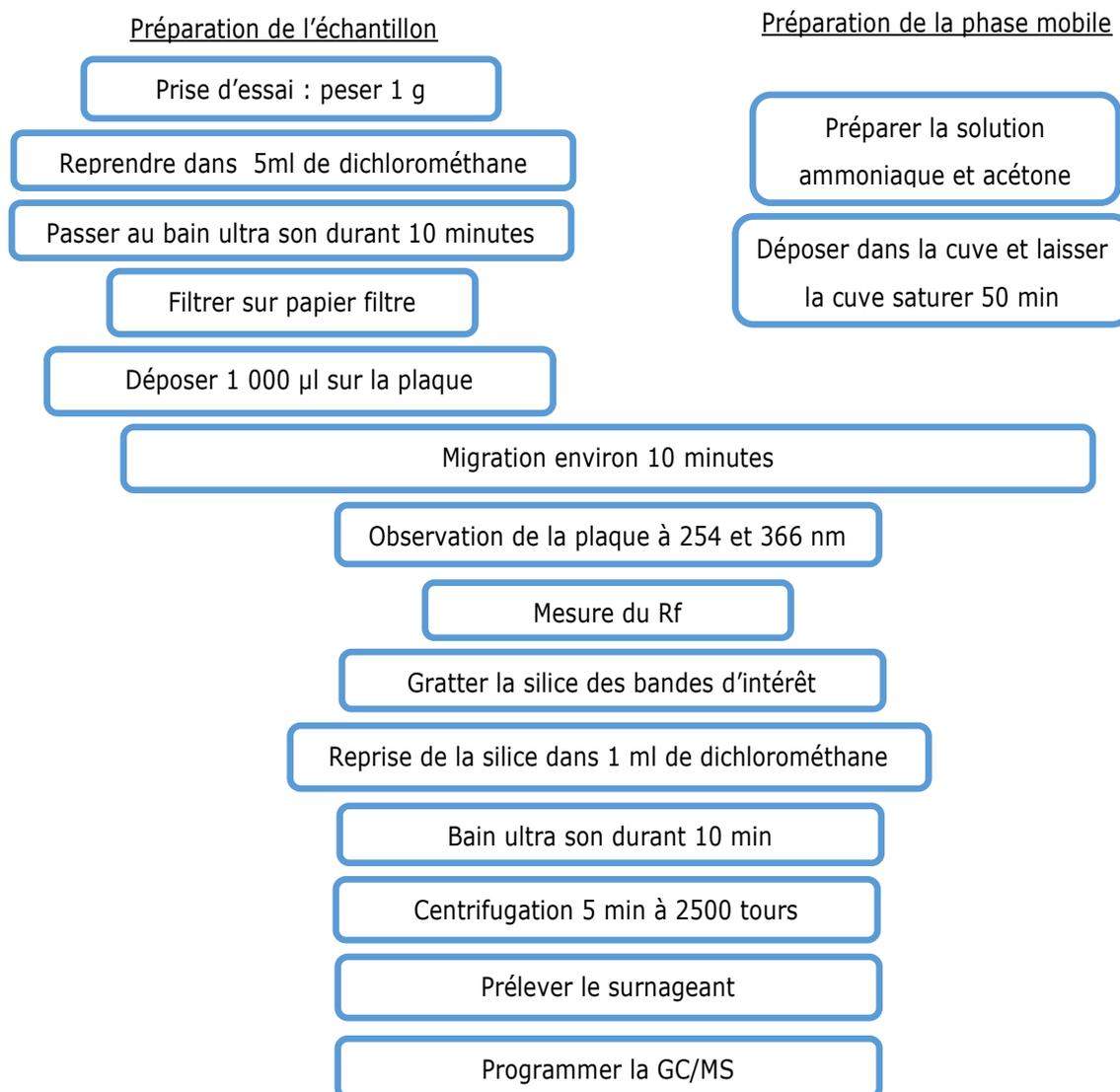


Figure 10 Schéma synoptique du protocole de la CCM semi-préparative couplé à la GC/MS

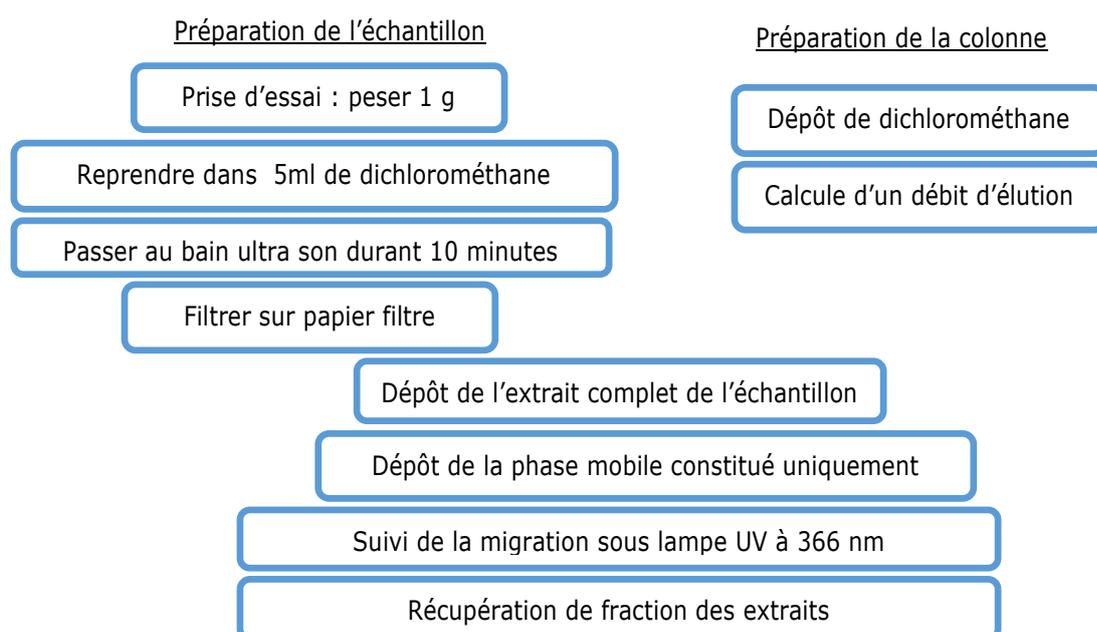


Figure 11 Schéma synoptique du protocole de l'extraction sur phase solide SPE

où t (0.975, $n-1$) est issu de la table statistique de distribution Student, « s » est l'écart type et « n » le nombre d'essai. Ce calcul permet donc d'obtenir l'incertitude élargie, qui est utilisée afin de calculer des intervalles d'incertitude.

1.1. CCM semi-préparative et GC/MS

Il s'agit de la méthode utilisée pour l'identification du Lappaphen, d'après un protocole déjà appliqué lors d'essais précédents par un autre laboratoire.

1.1.1. CCM semi-préparative

La CCM a été faite avec plusieurs échantillons en utilisant la méthode figure 10. Les réactifs utilisés sont les suivants :

- Acétone pure 99% CARLO ERBA
- Ammoniaque 30% CARLO ERBA
- Dichlorométhane 99% FLUKA

Les plaques utilisées sont des plaques de silice MACHEREY NAGEL SIL G-25/ UV254 20x20, avec support en aluminium. Les échantillons utilisés dans cette étude sont l'E153, E16 et E96. L'observation s'est faite à 254 et 365 nm, avec une lampe VL-6LC.

1.1.2. GC/MS

Les premiers échantillons analysés par GC/MS sont extraits d'une fraction récupérée sur une plaque CCM, tandis que par la suite, pour avoir une plus forte concentration en composants, trois fractions provenant de trois plaques différentes ont été réunies dans 1 ml de dichlorométhane. La GC/MS est de la marque SHIMADZU, modèle GCMS-QP2010 SE. Le programme utilisé pour la GC/MS a évolué : dans un premier temps ce programme était : colonne à 40 °C, Injection à 220°C, avec une pression de 49.5 kPa, une montée en température de 240 ° en 5 minutes et le détecteur à 200°C. Puis la température du four et du détecteur ont été changées, ce qui a permis d'obtenir de meilleurs résultats : colonne à 40 °C, injection à 250°C, avec une pression de 137,2 kPa, une montée en température de 335 ° en 15 minutes et le détecteur à 250°C. Ce programme semblait plus adapté à la taille de la molécule étudiée.

1.2. CCM

Une CCM a été effectuée sur l'échantillon E153, avec un témoin, en suivant le protocole décrit par le schéma figure 11, suivie d'une révélation. Le révélateur utilisé est la vanilline en solution dans l'éthanol et l'acide sulfurique. Après chauffage cela a permis de comparer l'échantillon E153 à un témoin de beta-sitostérol. Les réactifs utilisés sont les suivants:

- Acétone pure 99% CARLO ERBA
- Ammoniaque 30% CARLO ERBA
- Dichlorométhane 99% FLUKA
- Vanilline SIGMA ALDRICH
- Acide sulfurique 96% SIGMA

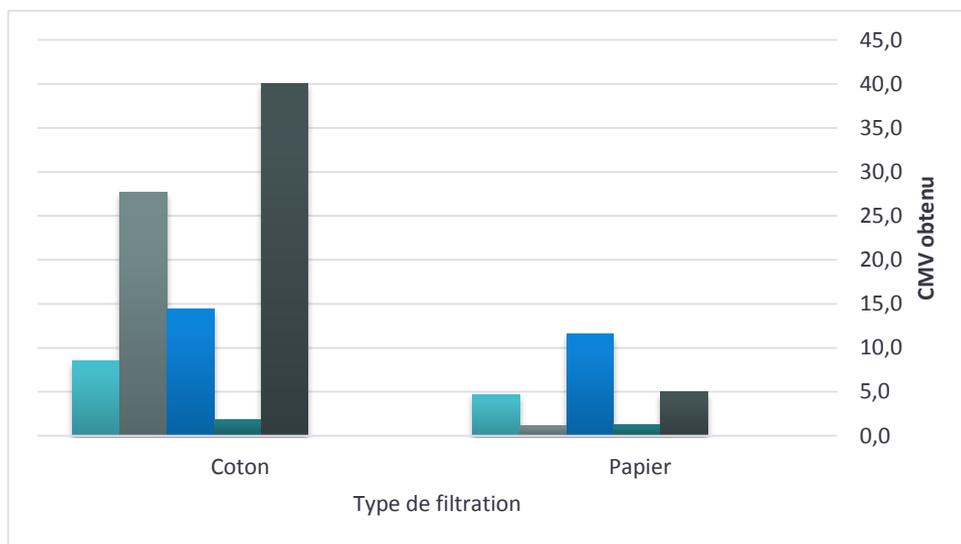


Figure 12 Coefficient de variation des résultats des dosages selon la filtration utilisée

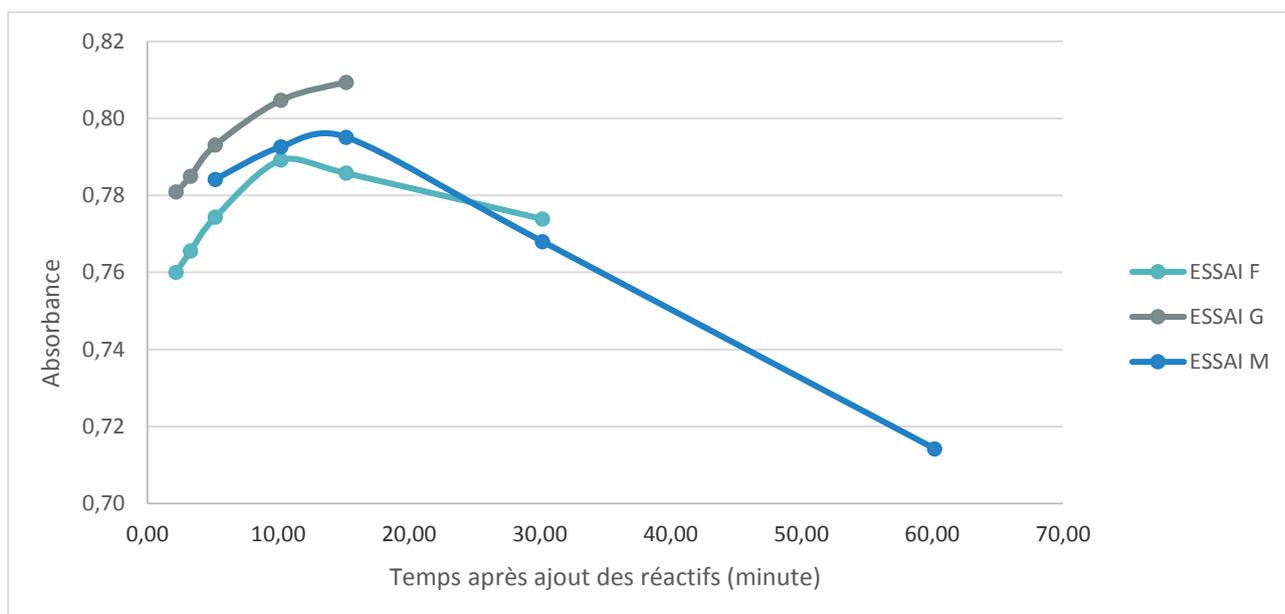


Figure 13 Mesure de l'évolution de la Do en fonction du temps après ajout des réactifs

1.3. Extraction sur phase solide (SPE)

L'extraction sur phase solide SPE s'est faite avec un extrait de l'échantillon E153, suivant le protocole illustré figure 10. Cette méthode a permis d'obtenir une plus grande quantité de la fraction d'intérêt de l'échantillon E153. Les fractions ainsi obtenues ont été ensuite séchées sous Azote, afin d'avoir des extraits purs pour le passage en RMN. Les réactifs utilisés sont :

- Acétone pure 99% CARLO ERBA
- Dichlorométhane 99% FLUKA
- Colonne SPE SIL MACHEREY NAGEL

1.4. RMN

La RMN a été faite au laboratoire du SONAS qui a bien voulu effectuer les mesures. Les deux fractions obtenues par l'extraction sur phase solide, ainsi qu'un extrait total de l'échantillon E153 ont été analysés. Les échantillons étaient tous à sec et ont été suspendus dans du Chloroforme deutéré avant d'être analysés.

2. Résultats

2.1. Dosage des Acides hydroxy-cinnamiques

2.1.1. Robustesse de la méthode

Les premiers essais avaient pour but d'effectuer cette méthode au sein du laboratoire, en adaptant la méthode selon le matériel disponible. Plusieurs paramètres ont été étudiés pour obtenir des résultats plus justes. En parallèle des essais avec des concentrations différentes d'échantillons ont été faits avec pour but de connaître les limites de détection de la méthode et sa robustesse face à ce changement de paramètres.

a) Paramètres étudiés

La filtration

Le premier point clé du protocole est la filtration. En effet il est important qu'elle soit identique pour tous les échantillons afin d'obtenir des résultats répétables. Dans un premier temps, la filtration coton a été utilisée, car elle est la plus utilisée au laboratoire. Les résultats obtenus par cette méthode ont été comparés, par calcul du coefficient de variation, CMV, entre les répétitions d'un même échantillon. Les moyennes de CMV de chaque groupe sont 18.51% pour la filtration coton et 4.75% pour la filtration papier. Avec la figure 12 à l'appui, les coefficients relatifs au groupe « filtre coton » sont plus élevés que ceux du groupe « filtre papier ».

Stabilité de la réaction

Après l'ajout des réactifs à la solution extraite, une réaction se produit, ayant pour effet l'obtention d'un dérivé coloré. L'intensité de la coloration de ce dérivé permet la mesure. Il est donc important de connaître la stabilité de ce dérivé et le temps avant sa dégradation. Différentes mesures ont été effectuées à des temps différents, permettant de visualiser l'évolution de la DO, après l'ajout des réactifs (figure 13). Tout d'abord la DO mesurée

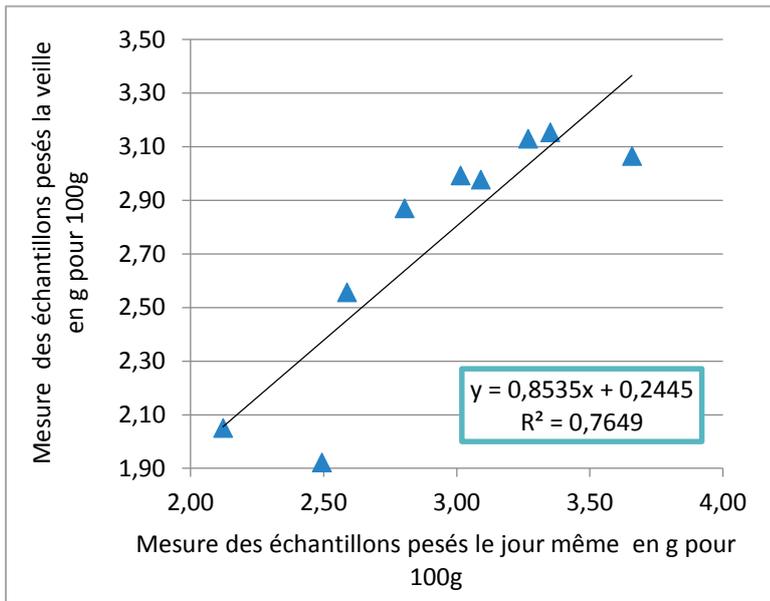


Figure 15 Comparaison des deux méthodes de prise d'essai, l'une la veille de la mesure (droite noir) et l'autre le jour même (triangle bleu).

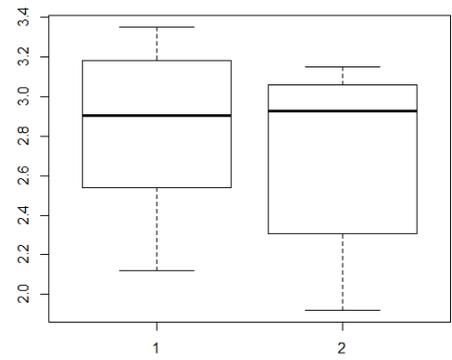


Figure 14 Boxplot des résultats obtenu après pesé le jour même (1) et pesé la veille(2)

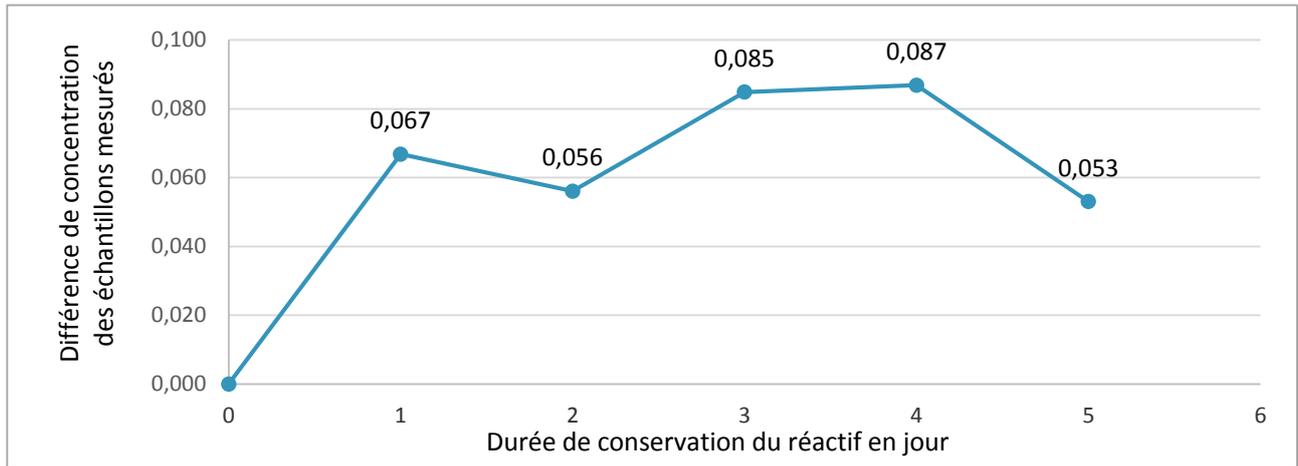


Figure 16 Différence de concentration des échantillons mesurée en fonction du temps de conservation des réactifs

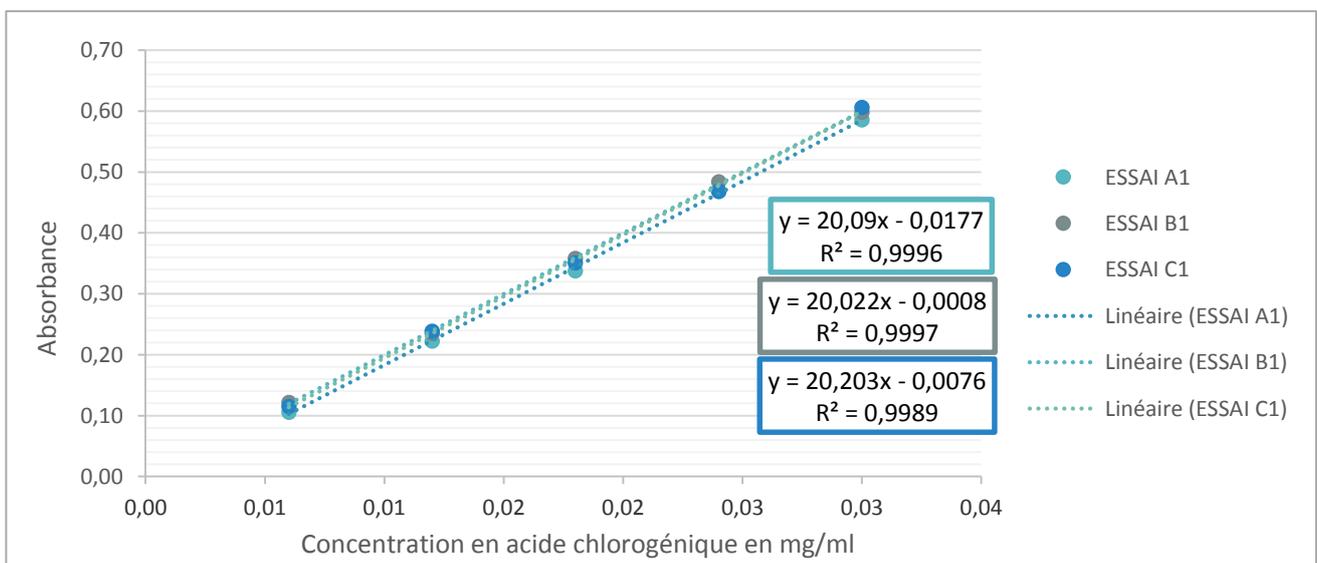


Figure 17 Concentrations en acide chlorogénique en fonction de la DO mesuré sur les essais A1, B1 et C1

augmente de 0,03 en 4 à 5 minutes, avant de redescendre d'environ 0,002 par minute. La réaction n'est donc pas stable dans le temps. Il y a un écart important entre le moment du dépôt des réactifs et quelques dizaines de minutes après. Cela prouve que le temps a une grande influence sur la prise de mesure.

Conservation des échantillons

Le paramètre de la conservation des échantillons broyés est un point faible de la méthode qui a été détecté tardivement. La pesée des échantillons est une des étapes de la méthode qui demande du temps. Pour des raisons pratiques d'organisation, elle a été très souvent faite la veille de la mesure. Une anomalie détectée après un dosage a mis en avant ce problème. Pour comprendre les raisons de cette anomalie, les résultats des précédentes prises d'essai ont donc été comparés à des mesures prises sur des échantillons préparés le jour même (figure 15). La droite figure 15 représente la courbe des concentrations obtenues avec des échantillons pesés la veille. Cela permet de voir les résultats obtenus avec des échantillons pesés le jour même (triangle bleu) sont supérieurs aux autres à l'exception de deux points. Un boxplot des deux séries (figure 14) permet également de visualiser cet écart, avec une distribution plus haute des résultats obtenus après pesée le jour même comparé à ceux pesés la veille. Il semble que les mesures prises sur des échantillons pesés la veille subissent un biais. L'hypothèse est que la conservation des échantillons pendant 12 heures, sous forme d'un faible volume de poudre, dans un ballon fermé par un film, altère la teneur en acides hydroxycinnamique. Ceci s'expliquerait par la forte sensibilité de ces molécules à l'oxydation, phénomène accéléré par la grande surface d'exposition à l'air d'une faible quantité de poudre.

Stabilité des réactifs

Jusqu'à présent, les solutions des réactifs d'Arnou et l'hydroxyde de sodium sont refaites à chaque nouveau dosage, afin de garantir leurs validités pour le dosage. Dans le cadre d'une méthode effectuée en routine, la préparation des réactifs chaque jour prend du temps et n'est pas toujours précise pour des faibles masses. Une étude a donc été faite sur la conservation des réactifs dans le temps. Pour cela, des échantillons ont été mesurés avec les mêmes réactifs durant une semaine. Les différences de concentration mesurées entre des réactifs préparés le jour même et des réactifs préparés le lundi ont été calculés (figure 16). D'après ces résultats, les mesures obtenues ont une différence de 0,060 à 0,09 g pour cent g. Les mesures varient donc faiblement avec des réactifs préparés à l'avance.

Linéarité de la méthode

La linéarité de la méthode est une vérification afin de voir qu'aucun élément du protocole ne fausse la mesure. L'ensemble du protocole a été reproduit ici avec des concentrations attendues, ainsi les mesures ont été mises en relation avec les concentrations théoriques (figure 17). Les trois essais ont été faits avec l'échantillon E16 afin d'avoir une triple répétition. Les coefficients de corrélation obtenus figure 17 illustrent la linéarité de la méthode. Autrement dit, avec une teneur croissante d'acide chlorogénique, le volume de réactifs permet une mesure constante sans biais.

b) Test de robustesse de la méthode

Pour ce test, le même échantillon a été mesuré à des concentrations différentes. Pour cela les masses des

Tableau 2 Moyenne des concentrations par groupe en g par 100 g

Masse de la prise d'essai	0.2	0.6	1.8	2.5 dilué
Moyenne des concentrations en g pour 100 g	3.26	2.84	2.57	2.57

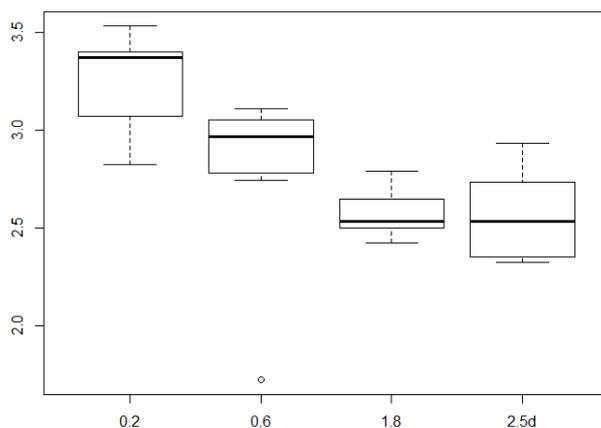


Figure 18 Boxplot des concentrations mesurées des différents groupes d'échantillons

Tableau 3 coefficient de variation entre les résultats obtenu à l'Iteipmai et ceux de l'autre laboratoire

Echantillon	E147	E148	E149	E150	E151	E152	E153	E154	E196	Moyenne
Coefficient de variation	0.71	2.48	1.97	1.99	0.09	0.35	1.46	1.02	0.818	1.01

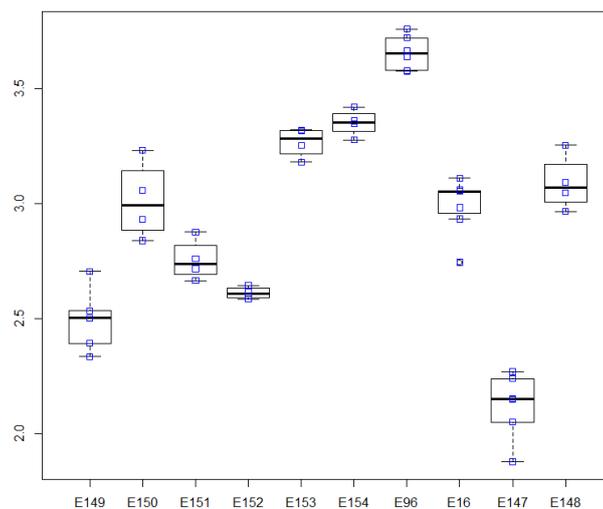


Figure 19 Boxplot des résultats du dosage des échantillons E147 à E154, E16 et E196

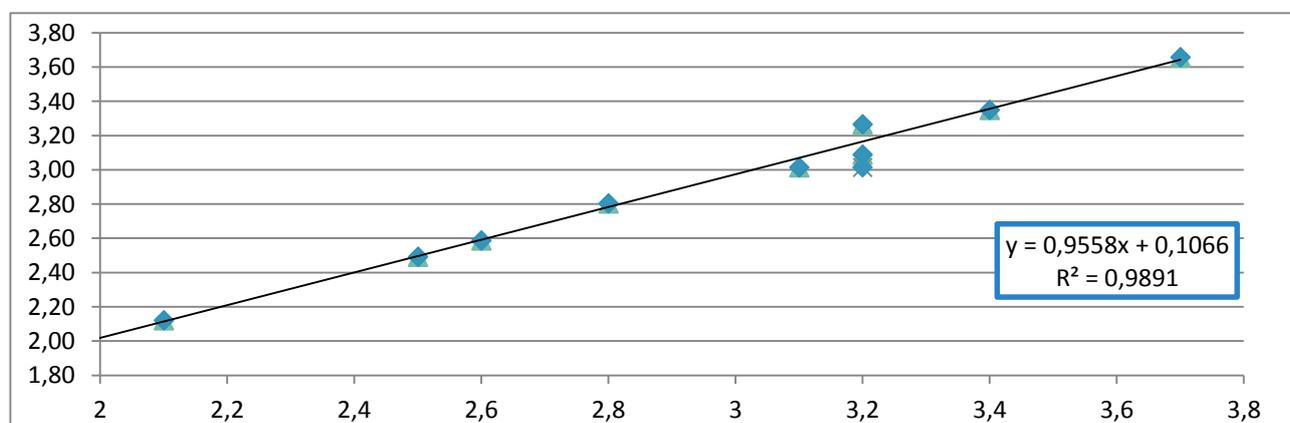


Figure 20 Corrélation Comparant les résultats obtenus à l'Iteipmai avec un autre laboratoire

prises d'essai ont été variées, ce qui a fait varier la concentration en acide chlorogénique de l'extrait préparé. Ainsi un essai dont la masse pesée est de 0,2g avait un extrait de concentration 0.06 mg/ml. Après calcul, la concentration mesurée étant ramenée à la masse de la prise d'essai, les résultats obtenus sont censés être similaires. La dilution des extraits obtenus avec des échantillons à 2,5g a été nécessaire afin de ne pas sortir de la plage de lecture du spectromètre. La variation de masse de la prise d'essai semble avoir joué un rôle plus important que prévu au niveau du dosage. En effet les moyennes des concentrations de chaque groupe sont variables (tableau 2). Il semble y avoir un effet de concentration décroissante en fonction des prises d'essai : Lorsque la masse est de 0,2g la concentration est la plus haute, 3,26 g pour 100g et si la masse est de 2,5 dilué et 1,8g, la concentration est de 2,57 g pour 100g. Il y a une différence de 0,69 g pour 100g entre les deux masses extrêmes. Cette distribution est visible figure 18, où l'on voit que le groupe des échantillons dont la prise d'essai a une masse de 0,2g en plus haut que les autres. Les deux derniers groupes 1,8 et 2,5 dilué sont les plus proches avec la même moyenne et la même médiane mais avec des dispersions différentes. Il y a donc des écarts de mesure entre des concentrations d'échantillons différentes. En effet, une masse plus importante d'échantillon entraîne un biais sur la mesure obtenue. La concentration, une fois rapportée sur la masse de la prise d'essai par calcul, est plus faible qu'avec un volume d'échantillon plus faible.

2.1.2. Fidélité de la méthode

Afin de connaître la fidélité de la méthode la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité ont été calculées.

a) Répétabilité et fidélité intermédiaire

La répétabilité correspond à l'écart entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à un essai dans le même laboratoire, avec le même opérateur, et la même journée. La répétabilité est illustrée ici par les moyennes de CMV, coefficient de variation. Pour chaque échantillon, il y a eu deux essais effectués le même jour. Les résultats obtenus ont permis de calculer un CMV, qui est un coefficient de variation. Les CMV obtenus pour un même échantillon ont été rassemblés sous une moyenne (Tableau 3). Les écarts obtenus sont majoritairement inférieur à 5%. Leurs moyennes est de 2.30%, ce qui est très satisfaisant, la valeur seuil acceptée au sein du laboratoire étant autour de 10% pour les dosages effectués en spectrométrie

Dans un second temps la fidélité intermédiaire a été calculée comme expliquée plus tôt. D'après ce calcul, tous les essais sont répétables entre eux (tableau 5, en annexe). Les incertitudes élargies calculées d'après les résultats obtenus ne dépassent pas 0,271 et sont en moyenne plutôt faibles (tableau 5, en annexe).

La dispersion des résultats est illustrée par la figure 19, où l'on voit les boîtes à moustache de chaque échantillon. Cela permet de voir la distribution des résultats pour chaque échantillon. En moyenne ils semblent tous resserrés comme pour les calculs de répétabilité et d'incertitude, avec quelques exceptions, pour les échantillons E149, E150 et E147 qui ont des écarts plus importants entre leurs concentrations. Cette figure illustre également des différences entre chaque échantillon. Les concentrations obtenues sont très variées d'un échantillon à l'autre, ce qui illustre la variabilité naturelle de la racine de Bardane.

b) Reproductibilité du dosage

Les échantillons analysés, ont également été analysés dans un autre laboratoire, permettant ainsi de voir la reproductibilité de la méthode. Une première comparaison graphique (figure 20) illustre l'écart entre les résultats

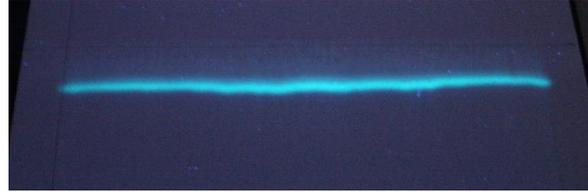


Figure 21 CCM Echantillon E153 RF : 0.77

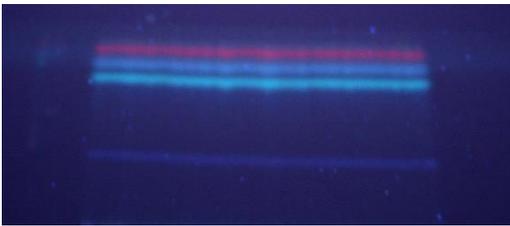


Figure 23 CCM obtenu avec l'échantillon E16, RF de haut en bas : **Bande 4(rouge)** : 0.88, **Bande 3** : 0.83, **Bande 2** : 0.75, **Bande 1** : 0.37

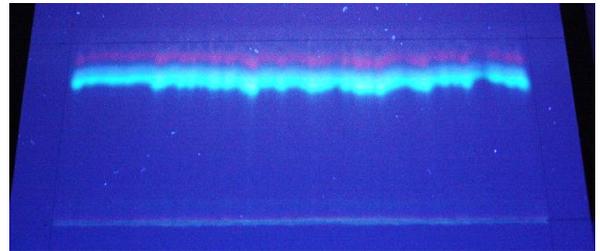


Figure 22 CCM Echantillon E96 RF haut en bas **bande rouge 1** : 0.94, **bande 2** : 0.86, **bande 3** : 0.8

Tableau 4 RF moyen des bandes bleu sur les CCM

Echantillon	E153	E96
RF moyen	0.793	0.767



Figure 24 Flacon d'extrait pour la GC/MS

obtenu à l'Iteipmai et ceux de d'un autre laboratoire. Le coefficient de corrélation de cette courbe est très proche de 1. Il y a donc une forte corrélation entre les résultats.

Afin de confirmer ces premières observations, un coefficient de variation a été calculé pour chaque échantillon entre la moyenne de résultats obtenus à l'iteipmai et celle obtenue par le second laboratoire. La moyenne de ces coefficients confirme qu'il y a très peu d'écart entre les résultats. Cela permet également de voir que l'écart n'est pas homogène entre les échantillons. La variabilité des mesures n'est donc pas constante.

2.2. Identification de composé polyacétylène dans le lappaphen

2.2.1. CCM semi-préparative couplé à la GC/MS

Le premier échantillon analysé par CCM est l'E16. D'après la CCM obtenue (figure 22), il contient plusieurs composants visibles avec cette phase mobile. Le RF correspondant au poly-acétylène recherché se situe entre 0,8 et 0,7. Selon la couleur de la fluorescence et le RF calculé, il correspond à la bande 2. Après observation, la silice a été grattée puis suspendue dans 1 ml de dichlorométhane. L'analyse par GC/MS n'a donné aucun résultat concret, sans doute à cause de la faible concentration de l'échantillon, mais aussi peut-être d'un manque d'agitation après la suspension dans le dichlorométhane. Après ce premier essai, deux autres échantillons ont été testés, à plusieurs reprises (figure 21 et 23). L'échantillon E153 contient moins de composés différents visibles par cette méthode, il n'y a qu'une bande qui apparaît, tandis que l'échantillon E96 possède plusieurs bandes. Le RF de la bande fluorescente bleu clair est la même d'une CCM à l'autre avec une moyenne de 0,78 (Tableau 4). Les extraits préparés par GC/MS sont maintenant faits à partir de 3 CCM. La concentration est augmentée pour avoir plus de chance d'identifier la molécule d'intérêt à la GC/MS. Une vérification visuelle a été faite afin de s'assurer de la présence de la molécule dans l'extrait pour la GC/MS (figure 24). La fluorescence est bien visible dans le flacon à 366 nm, ce qui correspond bien à la molécule isolée par CCM. De plus le changement de programmation de la GC/MS favorise la possibilité d'obtenir un spectre de la molécule recherche.

2.2.2. Extraction sur phase solide SPE et RMN

Afin d'obtenir une plus grande quantité d'extrait visible en fluorescence bleu, qui correspondrait au Lappaphen, une nouvelle méthode de purification a été mis en place. L'extraction sur phase solide SPE a été utilisée afin d'obtenir une fraction pure et plus grande de la molécule. Elle a été effectuée sous UV afin de suivre la migration de l'extrait d'intérêt. Cette méthode a permis de récupérer deux fractions de l'extrait, l'un correspondant à la coloration bleue, et l'autre montrant une coloration bleue foncée. Ce sont ces échantillons qui ont été analysés par RMN, ainsi qu'un troisième échantillon, qui était un extrait n'ayant subi aucune séparation chromatographique. Les spectres RMN obtenus n'ont pas donné les résultats espérés, affichant dans la plupart des cas seulement des pics relatifs au solvant utilisé pour l'extraction.

Les pics identifiés sur la première fraction (Annexe 2) correspondent à des solvants, le premier correspond au CDCL3 visible à 7,26 ppm. Les pics visibles à 5,30 ppm correspondent au dichlorométhane. De même le pic à 2,17 ppm correspond à l'acétone utilisé en phase mobile.

2.2.3. Témoin beta-sitostérol

Lors des analyses par GC/MS des échantillons de Bardane, une molécule a été identifiée par comparaison avec les bases de données fournies avec le logiciel. En effet, lors des recherches le Beta-sitostérol a été

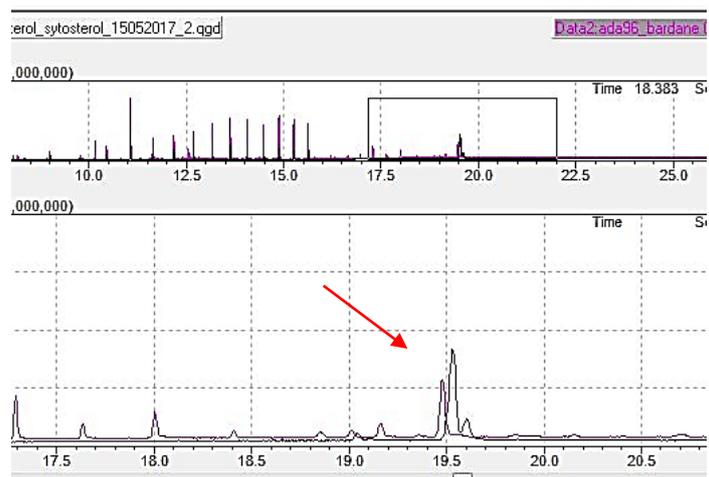


Figure 25 CCM de l'échantillon E153 avec un témoin beta-sitostérol à droite

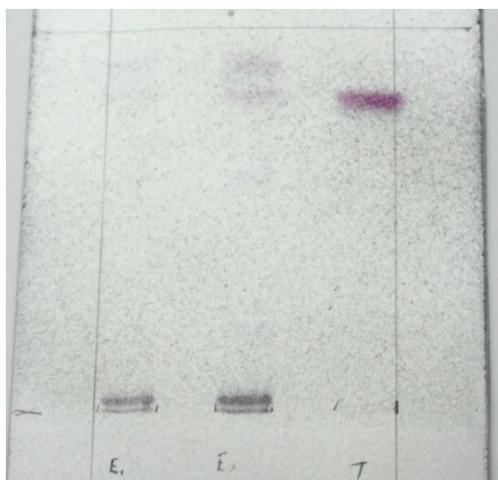


Figure 26 Superposition des spectres de l'échantillon E153 et du témoin de beta sitostérol

identifié : c'est une molécule qui est très fréquente dans la nature et qui est apparue parmi les signaux de l'échantillon. Sa présence dans la racine de bardane devait être confirmée. Pour cela, deux vérifications ont été faites : Tout d'abord en GC/MS, une solution témoin de beta-sitostérol a été faite, pour être comparée au signal. Le spectre ainsi obtenu a été superposé à celui obtenu avec l'échantillon E153, confirmant que le pic identifié par le logiciel correspond bien à la molécule de beta-sitostérol (figure 25). Dans un second temps, l'échantillon E153 a été extrait, puis déposé selon le protocole utilisé pour la CCM, et après observation, un révélateur a été appliqué. La figure 26, illustre les bandes obtenues : l'échantillon E153 avec deux dépôts différents, et le témoin de beta-sitostérol. Des bandes provenant de l'échantillon ont migré à la même distance et répondent de la même façon au révélateur. Cela confirme la présence de beta-sitostérol dans la racine de bardane.

3. Discussion

3.1. Dosage des Acides hydroxy-cinnamiques

3.1.1. Robustesse de la méthode

Le protocole du dosage des acides hydroxy-cinnamiques de la Bardane est un protocole qui sera proposé dans la monographie de la pharmacopée européenne. Le but de cette étude est de vérifier sa robustesse afin qu'il puisse être appliqué dans n'importe quel laboratoire. Dans ce but, une étude a été faite en plusieurs parties. Tout d'abord certains paramètres ont été ajustés afin d'appliquer le protocole dans les meilleures conditions possible :

La filtration est le premier de ces paramètres. Dans le protocole initial, aucune méthode en particulier n'est spécifiée. C'est pourquoi, lors des premiers essais, le mode de filtration utilisé était le même que celui utilisé en routine dans le laboratoire de l'ITEIPMAI. Ce mode de filtration a été rapidement remis en question à cause de l'écart entre les mesures de deux répétitions d'un même échantillon. Afin de baisser les écarts que pourrait entraîner une filtration hétérogène des échantillons, un autre type de filtration, la filtration sur papier, a donc remplacé la filtration coton. Avec ce changement les résultats obtenus sont beaucoup plus proches. Cela est prouvé par le calcul des coefficients de variation. Les coefficients de variation entre les répétitions obtenues sont de 18,51% avec les filtres coton et 4,75% avec les filtres papier. Il est donc rationnel de dire que la filtration sur papier entraîne des résultats plus répétables que la filtration sur coton. En effet, la taille des filtres papiers est plus constante et laisse passer la même quantité d'extrait, tandis que la filtration coton est variable selon l'opérateur.

Le second paramètre étudié est la stabilité de la réaction. Celle-ci est un point important de la mesure. Il est écrit dans la description du dosage par L.E Arnow 1937 que la réaction n'est pas stable. D'ailleurs deux des réactifs, le molybdate de sodium et l'acide chlorhydrique sont présents pour permettre une stabilisation du dérivé. Mais les effets de ces réactifs semblent limités dans le temps. Les mesures qui ont été prises permettent de conclure que lors de la manipulation, il est important que l'opérateur effectue la mesure dans les 5 minutes qui ont suivies l'ajout des réactifs, afin de conserver un résultat fiable. Il serait même préférable de faire la mesure à un temps constant, pour obtenir les mesures les plus précises possible. Cela explique donc la nécessité d'effectuer la mesure d'un seul échantillon à la fois. Le troisième paramètre est la conservation des échantillons. L'altération des échantillons après la prise d'essai est prouvée par les comparaisons entre la série de mesure faite avant et après le changement de méthode. Même si l'altération semble légère, entre une pesée la veille et le jour

même, elle est vérifiée par le graphique de comparaison des deux séries. Cette altération pourrait être due à une oxydation des composés phénoliques, dû à l'environnement du stockage qui était non maîtrisé. Aucune recherche bibliographique n'a permis de prouver qu'une oxydation de ces composés est possible.

Dans le cadre d'une mesure en routine, la stabilité des réactifs a également fait l'objet d'observation : Après plusieurs mesures, les résultats ont permis de conclure qu'il est possible de préparer à l'avance les réactifs nécessaires pour des mesures effectués le jour même et le jour suivant. Ainsi la quantité de réactif préparée pourra être mieux adaptée à la demande. De plus la préparation de grande quantité de réactif est plus précise, car la quantité de matière à peser est plus grande donc plus précise.

Enfin la linéarité de la méthode a été étudiée. Cette mesure est nécessaire pour savoir si aucun élément du protocole ne fausse la mesure. Les résultats reportés vont d'ailleurs dans ce sens, car le coefficient de corrélation de la comparaison de la DO obtenu en fonction de la concentration théorique est très proche de 1. Le protocole ne contient donc aucun paramètre pouvant fausser les résultats.

Dans un second temps la robustesse de la méthode a été mise à l'épreuve. La variation du paramètre de concentration des analytes a permis de voir la robustesse de la méthode. Avec les différents paramètres vu précédemment, ainsi que l'étude de linéarité de la méthode, il est cohérent de penser que la méthode est plutôt robuste. Cependant la variation de quantité d'échantillon, donc de concentration de l'extrait mesuré, semble avoir un impact sur la mesure. En effet lors de la mesure d'un échantillon avec 0,2g de d'échantillon la mesure donne un résultat plus élevée que dans le cas d'une masse de 1,8g. Cela pourrait être expliqué par des interférences créées par la matrice. En effet, en ajoutant une plus grande quantité d'échantillon, il y a une plus grande concentration des molécules d'intérêt mais également une plus grande quantité d'autres composants qui pourraient interagir avec les réactifs durant le dosage. Il est également important de savoir que le réactif d'Arnou utilisé n'est pas spécifique de l'acide chlorogénique (L.E Arnou 1937). L'hypothèse la plus probable est donc qu'avec une quantité trop importante d'échantillon, la quantité de molécules interférant est trop importante et cela fausse le résultat. Pour cette raison, la masse de la prise d'essai est très importante, et doit donc être respectée à 0,6g afin d'avoir la même quantité de molécules interférentes dans chaque prise de mesure.

3.1.2. Fidélité de la méthode

La fidélité de la méthode est le dernier paramètre qui a été étudié. Pour cela la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité de la mesure ont été observées. Chacun de ces paramètres convergent vers la même idée : le protocole permet des mesures fiables et fidèles de la concentration en g pour 100 g d'acide chlorogénique. La répétabilité qui a été vérifiée par des coefficients de variation semble suffisante pour valider la qualité des résultats obtenus. L'incertitude élargie qui a été calculé est faible ce qui garantit des résultats répétable au sein d'un même laboratoire. Enfin la reproductibilité entre laboratoires est également très correcte, pour deux laboratoires n'ayant pas communiqué pour l'application du protocole. Les écarts relevés sont faibles et hétérogènes, ce qui signifie que l'erreur n'est pas systématique, elle ne vient donc pas du protocole mais de l'opérateur, ou des conditions de dosage variables dans le temps. Cela prouve que le protocole (Annexe 3) est suffisamment précis et la méthode valide pour être utilisée n'importe où et obtenir des résultats fiables.

3.2. Identification de composé poly-acétylène dans le Lappaphen

Les recherches préliminaires, faites dans le cadre de la proposition de monographie de la pharmacopée européenne avaient permis d'identifier une bande fluorescente colorée bleue claire, comme marqueur spécifique de la Bardane. Jusqu'à présent, la nature des molécules composant cette bande est restée indéterminée. L'hypothèse émise sur la nature de ces molécules, était que ce sont des composés poly-acétyliques. En effet, ces composés sont souvent spécifiques des *Astéraceae* (Konovalov, 2014). La recherche bibliographique menée sur ces composés a été fructueuse. En effet, l'article de Washino et al, 1987, sur le Lappaphen a donné une indication sur la structure de la molécule recherchée. D'un point de vue des observations faites, de la coloration visible en CCM à 365nm et des informations de l'article, il est presque certain que le Lappaphen est la molécule présente dans la racine de Bardane. Cette découverte permet mieux de cibler les recherches sur cette molécule. De plus l'article de Washino et al, 1987, donne des informations très précises sur la structure de la molécule, son spectre après analyse en spectrométrie de masse, et après analyses en RMN. Malheureusement les différentes analyses faites lors de notre étude n'ont pas permis d'identifier formellement cette molécule. En effet, malgré les changements effectués dans le protocole, les adaptations du programme de la GC/MS, aucun spectre n'a révélé la présence du Lappaphen. L'essai d'extraction sur phase solide SPE, a certes donné une plus grande quantité d'extrait, mais cela n'a pas été suffisant pour observer la molécule après analyse des échantillons par RMN. Il semble que la molécule, bien que visible sous fluorescence, soit présente en très faible quantité dans la racine de Bardane.

Une première hypothèse est que le Lappaphen serait plus facilement détectable, si les extraits étaient fait sur de la matière fraîche. En effet, c'est de la matière fraîche qui est utilisée en générale, pour analyser les polyines (autre nom des poly-acétylènes), par CCM ou HPLC (BRUNETON, 2009). Jusqu'à présent les échantillons utilisés sont sous forme de poudre de racine séchée. Dans un second temps, après relecture de l'article de Washino et al., 1987, il faudrait une quantité très importante de matière fraîche. En effet, celui-ci rapport dans son article, une extraction de 120 kg de matière fraîche pour obtenir environ 3,5 mg de Lappaphen purifié, soit une teneur de 0,029 mg par kg ou 29 ppb.

Cela explique les difficultés pour identifier la molécule, à partir des échantillons disponibles. Mais ces informations pourraient permettre de poursuivre les analyses. Sachant cela, un nouveau protocole pourra être mis en place afin d'identifier la molécule dans la Bardane.

Une autre solution sera de comparer l'échantillon que nous possédons avec un témoin pur de la molécule. En effet, si cette molécule migre de la même façon (même RF) et avec la même fluorescence que celle présente dans les échantillons, cela permettrait de valider la présence de Lappaphen dans la racine de Bardane. Cependant, au vue des dates auxquelles les recherches sur ce sujet ont été faites, il parait impossible que les laboratoires qui ont participé à la recherche possèdent encore la molécule. Mais avec les informations données par l'article, il est envisageable de la synthétiser. La molécule de synthèse servirait alors de témoin.

L'identification du beta-sitostérol dans la racine de bardane, a été bénéfique, car elle a prouvé que le protocole utilisé fonctionnait. Malheureusement cette molécule n'est pas spécifique de la bardane et ne pourra pas être utilisée dans le cadre de l'identification.

4. Conclusions et perspectives

Cette étude a été menée avec deux objectifs : la détermination de la robustesse du dosage des acides hydroxy-cinnamiques, et l'identification d'un marqueur spécifique de la Bardane. Le premier objectif a été mené à bien. La répétabilité et reproductibilité de la méthode ont été mises en avant par les différentes mesures effectuées. Sa robustesse a été établie également grâce aux précisions apportées aux protocoles et aux recherches effectuées sur les différents points critiques de la méthode. Une dernière étude plus poussée sur l'importance de la masse utilisée pour la prise d'essai sera intéressante. En effet, la variation de la mesure selon la masse d'échantillon semble très importante, il serait bon de mesurer son impact avec des masses plus rapprochées de la masse indiquée par le protocole. Dans un second temps, une recherche plus approfondie sur la question de l'oxydation des échantillons mesurés à l'avance permettrait de vérifier cette hypothèse. N'ayant pas trouvé de bibliographie à ce sujet, un test pourrait être fait avec des prises de mesures effectuées à différentes périodes sur des temps différents.

Ensuite, cette méthode étant applicable à d'autres plantes pour le dosage d'autres molécules ortho diphénols, un essai d'automatisation a été mis en place. En effet, l'automatisation de cette méthode, permettrait de limiter les erreurs de manipulations de l'opérateur, tout en permettant un vrai gain de temps. L'essai a été effectué sur des plaques de 96 puits. Dans le cas présent, l'opérateur a utilisé une pipette multicanaux, dans le cadre d'une automatisation, un robot effectuera les pipetages. Dans les deux cas, l'ensemble des échantillons est mesuré en même temps, car l'ajout des réactifs est grandement diminué. Ainsi le temps avant l'altération des réactifs est respecté. Une plaque permet la mesure de 5 échantillons, en doubles répétitions, ce qui est un vrai gain de temps et sera un atout pour un laboratoire qui utilise cette méthode en routine.

Enfin, le second objectif n'est pas tout à fait atteint, mais les recherches effectuées ont été fructueuses et ont affiné le domaine de recherche. Le Lappaphen semble en effet être le bon marqueur d'identification de la racine de bardane, étant très spécifique de celle-ci. Son identification d'après un échantillon de la plante serait l'idéal. Pour cela il faudra appliquer l'une des deux hypothèses émises. La synthèse de la molécule de Lappaphen serait possible avec l'aide du laboratoire de recherche du SONAS.

Cette étude apportera cependant des éléments nouveaux, participants à la mise à jour de la monographie de la racine de Bardane dans la pharmacopée Européenne.

5. Bibliographie

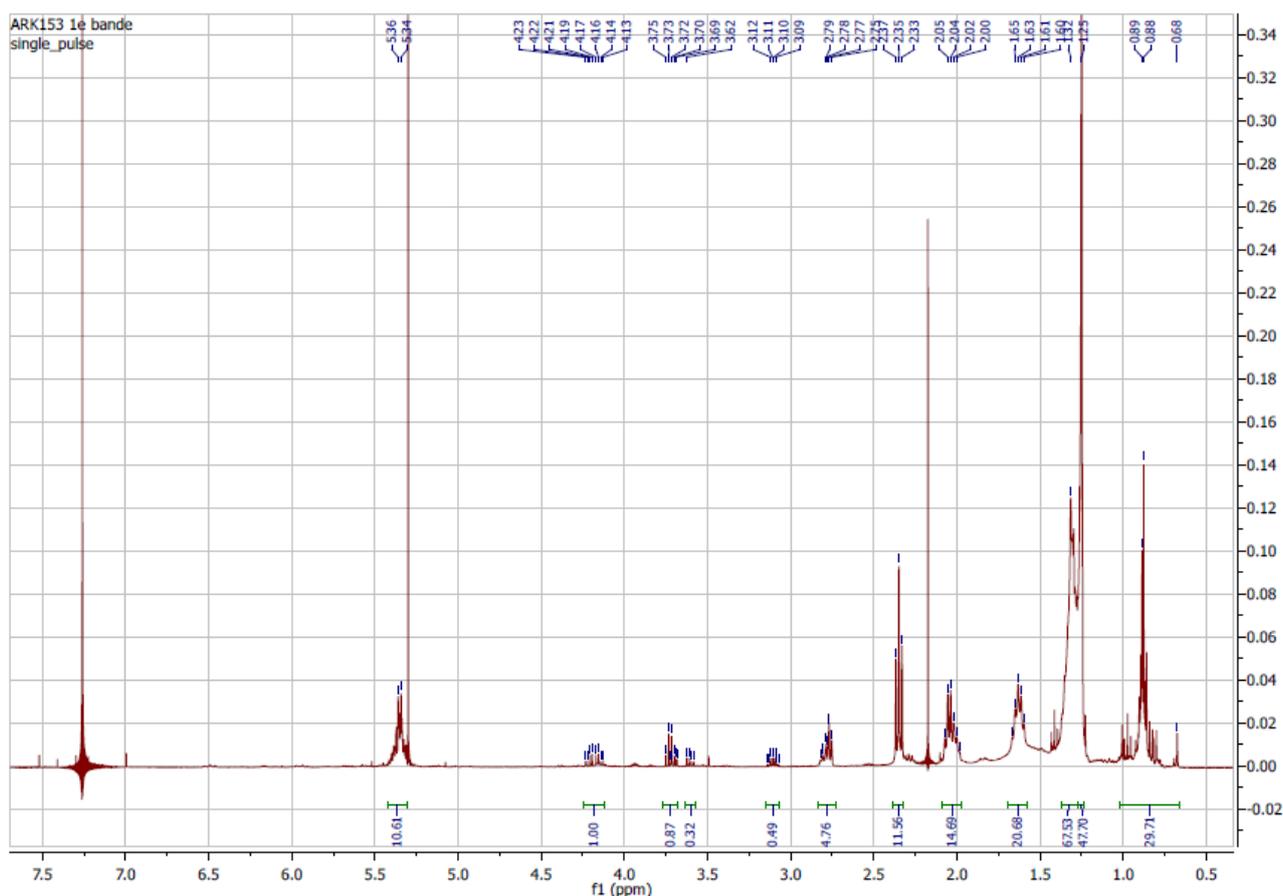
- Allain E, Marchés, , études et prospective. 2016.** Filières plantes à parfum, aromatiques et médicinales Panorama 2015. *DONNÉES ET BILANS Plantes à parfum, aromatiques et médicinales*.
- Arnou LE. 1937.** Colorimetric determination of the components of 3, 4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *J. Biol. Chem* **118**: 531–537.
- BRUNETON J. 2009.** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.)*. Lavoisier.
- Chan Y-S, Cheng L-N, Wu J-H, Chan E, Kwan Y-W, Lee SM-Y, Leung GP-H, Yu PH-F, Chan S-W. 2011.** A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock). *Inflammopharmacology* **19**: 245–254.
- Christensen LP, Lam J. 1990.** Acetylenes and related compounds in Cynareae. *Phytochemistry* **29**: 2753–2785.
- Ferracane R, Graziani G, Gallo M, Fogliano V, Ritieni A. 2010.** Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **51**: 399–404.
- Human Metabolome Database: Showing metabocard for Beta-Sitosterol (HMDB00852).**
- Ilbert H, Hoxha V, Sahi L, Courivaud A, Chailan C. 2016.** Le marché des plantes aromatiques et médicinales : analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en Albanie et en Algérie. *Montpellier: CIHEAM/ FranceAgriMer Options Méditerranéennes, Série B: Etudes et Recherches*: 222.
- Jean B. 2009.** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.)*. Lavoisier.
- Konovalov DA. 2014.** Polyacetylene Compounds of Plants of the Asteraceae Family (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal* **48**: 613–631.
- La filière PSBBE des Pays de la Loire: Situation et Enjeux. 2009.**
- Lin L-Z, Harnly JM. 2008.** Identification of hydroxycinnamoylquinic acids of arnica flowers and burdock roots using a standardized LC-DAD-ESI/MS profiling method. *Journal of agricultural and food chemistry* **56**: 10105–10114.
- Liu S, Chen K, Schliemann W, Strack D. 2005.** Isolation and identification of arctiin and arctigenin in leaves of burdock (*Arctium lappa* L.) by polyamide column chromatography in combination with HPLC-ESI (sol) MS. *Phytochemical analysis* **16**: 86–89.
- Robbins LR. 2013.** Natural Variability in Phenolic and Sesquiterpene Constituents Among Burdock (*Arctium lappa* L. and *Arctium minus* L.) Leaves for Potential Medicinal Interests.
- Schippmann U, Leaman D, Cunningham AB. 2006.** A comparison of cultivation and wild collection of medicinal and aromatic plants under sustainability aspects. *Frontis* **17**: 75–95.
- Simonsen DHT, Weitzel C, Christensen DSB. 2013.** Guaianolide Sesquiterpenoids: Pharmacology and Biosynthesis. In: Ramawat KG, Mérillon J-M, eds. *Natural Products*. Springer Berlin Heidelberg, 3069–3098.
- Washino T, Kobayashi H, Ikawa Y. 1987.** Structures of Lappaphen-a and Lappaphen-b, new guaianolides linked with a sulfur-containing acetylenic compound, from *Arctium lappa* L. *Agricultural and biological chemistry* **51**: 1475–1480.
- Wichtl M, Anton R. 2003.** *Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. Tec & Doc.

6. Annexe

6.1. Annexe 1- Tableau 5 Résumé des résultats des dosages de chaque échantillon

	E149	E150	E151	E152	E153	E154	E96	E16	E147	E148
moyenne	2,493	3,014	2,754	2,610	3,267	3,351	3,657	2,991	2,991	2,991
NB	5	4	4	4	4	4	6	7	7	7
Ecart type	0,143	0,170	0,090	0,026	0,065	0,059	0,074	0,123	0,123	0,123
Coefficient de répétabilité	0,472	0,561	0,298	0,086	0,216	0,193	0,245	0,406	0,406	0,406
 xmax-xmin 	0,370	0,392	0,211	0,058	0,139	0,143	0,183	0,366	0,366	0,366
incertitude	0,178	0,271	0,143	0,042	0,104	0,093	0,078	0,114	0,114	0,114
Intervalle d'incertitude	[2,67: 2,3]	[2,74 : 3,28]	[2,61 : 2,90]	[2,56: 2,65]	3,16: 3,37]	[3,26: 3,44]	3,58: 3,74]	2,88: 3,10]	[1,92: 2,32]	[2,82 :3,36]
CMV moyen	3,90	3,08	3,27	0,45	0,83	1,63	0,30	2,20	4,57	2,78

6.2. Annexe 2- Spectre obtenu par RMN de l'extrait fluorescent bleu



6.3. Annexe 3– Protocole du dosage des dérivés hydroxycinnamique totaux exprime en acide chlorogénique par spectrometrie

MATERIEL

Broyeurs IKAM20
Bain-marie
Spectrophotomètre UV-Visible

REACTIFS

Acide chlorhydrique R
Eau distillée
Ethanol absolu
Hydroxyde de sodium (Carlo ref 480507)
Molybdate de sodium (Fluka ref 71756)
Nitrite de sodium (Fluka ref 71759)

METHODE

Préparation des réactifs

- **Ethanol 50 pour cent V/V**

Dans une fiole de 1000 ml, ajouté 500 ml d'éthanol absolu et 500 ml d'eau distillée

- **Solution d'acide chlorhydrique 0.5 M**

Dans une fiole de 100 ml, ajouter de l'eau distillée, prélever 4,30 ml HCL R, compléter avec de l'eau distillée, thermostat à 20°C

- **Réactif d'Arnou**

Dans une fiole de 100 ml, peser 10 g de Nitrite de sodium et 10 g de Molybdate de sodium, passer au bain-ultrasons, thermostat à 20°C et compléter avec de l'eau distillée.

Solution à examiner. Introduire 0.600g de poudre pulvérisé 355 dans un ballon jaugé de 100,0 mL, ajouter 90 ml d'éthanol 50% et chauffer à reflux au bain-marie pendant 30 min (à 95°C). Laisser refroidir, filtrer sur papier dans fiole de 100 ml, rincer le filtre avec 10 ml d'éthanol 50%, thermostat à 20°C et compléter à 100 ml avec éthanol à 50% à 20°C.

Solution A : Dans un tube à essai, introduire 1,0 ml de solution mère à 20°C, ajouter 2 ml d'acide chlorhydrique 0,5 M à 20°C, ajoutez 2 ml du réactif d'Arnou à 20°C, ajoutez 2 ml de solution diluée d'hydroxyde de sodium à 20°C compléter à 10 ml avec de l'eau distillée à 20°C et agiter.

Liquide de compensation. Dans un tube à essai, introduire 1,0 ml de solution mère à 20°C, ajouter 2 ml d'acide chlorhydrique 0,5 M à 20°C, ajoutez 2 ml de solution diluée d'hydroxyde de sodium à 20°C compléter à 10 ml avec de l'eau distillée à 20°C et agiter. Mesurer immédiatement à 525 nm.

Le calcul de la teneur pour cent m/m en dérivés hydroxycinnamiques totaux, exprimés en acide chlorogénique, à l'aide de l'expression :

$$(A \times 5,3) / m$$

En prenant 188 comme valeur de l'absorbance spécifique de l'acide chlorogénique à 525 nm.

A = absorbance à 525 nm, m = masse de la prise d'essai, en grammes.

RÉSUMÉ

Les plantes ont toujours été au cœur de la médecine, autant dans la médecine moderne que dans la médecine traditionnelle. Parmi les 422 000 plantes à fleurs connues, le nombre de plante utilisée à des fins médicales est estimé à 70 000. Les PPAM, plantes à parfum, aromatiques et médicinales, représentent donc un marché important, qui est actuellement en pleine expansion. L'iteipmai, qui est l'une de ces structures, a un rôle majeur dans la filière des PPAM. Cet organisme a pour mission l'élaboration de nouvelle variété, le développement d'outils de conseil, et la participation à la structuration de la normalisation dans la filière des PPAM en partenariat avec l'AFNOR et la pharmacopée européenne. L'étude effectuée, entre dans le cadre de la normalisation d'une PPAM. La Bardane, comme beaucoup de PPAM, fait l'objet de recherches, car elle possède de nombreuses molécules d'intérêt qui pourrait être utilisés en pharmacopée. La plante fait donc l'objet d'une nouvelle demande. Pour répondre à ces besoin, il existe actuellement une monographie de la Bardane à la pharmacopée française et la pharmacopée européenne a pour projet de modernisé ses textes. Le texte de la monographie décrit les substances chimiques identifiées dans la plante. Dans la Bardane, il existe plusieurs substances chimiques identifiées d'intérêt, dont des acides phénols. Dans ce cadre, la méthode de dosage des dérivés hydroxy-cinnamiques totaux doit être validée afin d'être introduite dans la monographie européenne de la Bardane. La pharmacopée européenne cherche également un marqueur spécifique de la Bardane qui permettrait son identification par CCM.

Cette étude a donc deux objectifs : dans un premier temps l'étude du dosage des acides hydroxy-cinnamiques en déterminant la robustesse de la méthode, puis dans un second temps l'identification de composés poly-acétyléniques dans la racine de Bardane. L'un de ces composés pourrait être un marqueur d'identification spécifique de la Bardane.

mots-clés : Bardane, *Arctium Lappa*, Iteipmai, Monographie européenne, acides hydroxy-cinnamiques, Lappaphen

ABSTRACT

Plants have always been at the heart of medicine, both in modern medicine and traditional medicine. Of the 422,000 known flowering plants, the number of plants used for medical purposes is estimated at 70,000. The PPAM, perfume, aromatic and medicinal plants, therefore represent an important market, which is currently expanding. The Iteipmai, which is one of these structures, has a major role in the PPAM field. The mission of this organization is to develop new varieties, develop advisory tools and participate in the structuring of standardization in the PPAM chain in partnership with AFNOR and the European Pharmacopoeia. The study carried out is part of the standardization of a PPAM. Burdock, like many PPAMs, is the subject of research because it has many molecules of interest that could be used in pharmacopoeia. The plant is therefore the subject of a new application. To answer these needs, there is currently a monograph on Burdock at the French Pharmacopoeia and the European Pharmacopoeia plans to modernize its texts. The text of the monograph describes the chemicals identified in the plant. In Burdock there are several identified chemicals of interest, including phenol acids. In this context, the dosage method the total hydroxy-cinnamic derivatives must be validated in order to be updated in the European monograph on Burdock. The European Pharmacopoeia is also looking for a specific Burdock marker that would allow its identification by TLC.

This study has two objectives: first, to study the determination of hydroxy-cinnamic acids by determining the strenght of the method, and secondly to identify poly-acetylenic compounds in Burdock root. One of these compounds could be a specific Burdock identification marker.

keywords : Burdock, *Arctium Lappa*, Iteipmai, European monograph, Hydroxycinnamic acids, Lappaphen