

<b>SOMMAIRE GENERAL .....</b>	<b>I</b>
<b>TABLE DES FIGURES .....</b>	<b>IV</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I: ÉVALUATION DE L'APPORT DE METHODES DE CULTURE INNOVANTES SUR UNE PLANTE LOCALE DANS LE DOMAINE DE LA COSMETIQUE .....</b>	<b>7</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>8</b>
<b>1 LES ORIGINES DE L'UTILISATION DES PLANTES .....</b>	<b>10</b>
<b>2 LES METABOLITES PRIMAIRES ET SPECIALISES DES PLANTES.....</b>	<b>12</b>
2.1 Les terpénoïdes .....	14
2.2 Les composés phénoliques.....	17
2.3 Les alcaloïdes.....	32
<b>3 DIVERSITE D'ACCUMULATION DES METABOLITES SPECIALISES .....</b>	<b>37</b>
<b>4 LES DIFFERENTS MODES DE CULTURE .....</b>	<b>38</b>
4.1 La culture classique .....	41
4.2 La culture aéroponique .....	41
4.3 L'élicitation lumineuse .....	44
<b>5 LA GRANDE BARDANE (<i>ARCTIUM LAPPA</i> L.) .....</b>	<b>47</b>
5.1 Localisation.....	47
5.2 Description phénotypique et généralités.....	47
5.3 Vertus médicinales .....	49
5.4 Signature phytochimique .....	50
<b>6 OBJECTIFS .....</b>	<b>54</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>55</b>
<b>CHAPITRE II: STRATEGIES MISES EN PLACE POUR LA VALORISATION DE PLANTES LOCALES – APPROCHES DE CULTURES INNOVANTES ET CARACTERISATION METABOLOMIQUE.....</b>	<b>64</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>65</b>
<b>1 VALORISATION DE LA FLORE LOCALE : CHOIX DES PLANTES ETUDIEES .....</b>	<b>68</b>
<b>2 LES DIFFERENTS MODES DE CULTURE MIS EN ŒUVRE .....</b>	<b>69</b>
2.1 Mise en culture des plantes et élicitation lumineuse .....	69
<b>3 METHODOLOGIE D'EXTRACTION .....</b>	<b>77</b>
3.1 Les ultrasons.....	77
3.2 L'extraction assistée par ultrasons.....	78
<b>4 STRATEGIE METABOLOMIQUE.....</b>	<b>79</b>

4.1 Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse .....	79
4.2 Identification des signatures phytochimiques – Traitement statistique des données .....	86
4.3 Tests basés sur des allégations cosmétiques .....	89
<b>5 EN RESUME .....</b>	<b>114</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>115</b>
<b>CHAPITRE III: INFLUENCE D'UNE APPROCHE D'ELICITATION ET DE DIFFERENTS MODES DE CULTURE</b>	
<b>SUR LE PROFIL PHYTOCHIMIQUE ET L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE MOLECULES ISSUES D'UNE PLANTE</b>	
<b>MODELE.....</b>	<b>122</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>123</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>125</b>
<b>2 ÉVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE A VISEE COSMETIQUE DE TREIZE PLANTES .....</b>	<b>126</b>
2.1 Criblage d'activité biologique <i>in tubo</i> des treize plantes .....	127
2.2 Choix de la plante modèle pour les études d'optimisation des extraits .....	134
<b>3 MISE EN PLACE D'UNE CULTURE DE CALS DE LA GRANDE BARDANE ET EVALUATION DE L'INFLUENCE DE L'ELICITATION</b>	
<b>.....</b>	<b>134</b>
<b>4 APPORT DU MODE DE CULTURE DE LA GRANDE BARDANE ET DE L'ELICITATION LUMINEUSE SUR LE PROFIL</b>	
<b>PHYTOCHIMIQUE DE SES EXTRAITS ET DE LEURS ACTIVITES BIOLOGIQUES .....</b>	<b>138</b>
4.1 <u>Partie 1</u> : Évaluation de l'impact du mode de culture et de l'éllicitation sur l'activité anti-	
tyrosinase et identification des molécules responsables de cette activité.....	141
4.2 <u>Partie 2</u> : Impact de l'éllicitation sur l'activité antioxydante et identification de molécules	
responsables de cette activité.....	161
<b>5 CONCLUSION .....</b>	<b>207</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>209</b>
<b>CONCLUSION GENERALE &amp; PERSPECTIVES.....</b>	<b>212</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>221</b>







# Table des figures

<b>FIGURE I-1 :</b> (A) EXTRAIT D'UNE PEINTURE MURALE REPRESENTANT UNE EGYPTIENNE PORTANT DU KOHL, MUSEE DU LOUVRE ( <a href="https://collections.louvre.fr/ark:/53355/cl010036097">HTTPS://COLLECTIONS.LOUVRE.FR/ARK:/53355/CL010036097</a> ), (B) PHOTOGRAPHIE D'UNE POUDRE DE HENNE ET (C) PLANCHE BOTANIQUE DE LAWSONIA INERMIS, ADAPTATION DE BLANCO 1880-1883 .....	11
<b>FIGURE I-2 :</b> (A) MOLECULE DE MORPHINE ET (B) PLANCHE BOTANIQUE DE PAPAVER SOMNIFERUM L., THOME 1885 .....	13
<b>FIGURE I-3 :</b> DIAGRAMME CIRCULAIRE REPRESENTANT LES PRINCIPAUX GROUPES DE METABOLITES SPECIALISES D'APRES CROTEAU ET AL. 2000, ADAPTATION DE ZWENGER ET BASU 2008.....	13
<b>FIGURE I-4 :</b> UNITE ISOPRENE ET LES DIFFERENTS TYPES DE LIAISON UTILISEES POUR LA FORMATION DES TERPENOÏDES, ADAPTATION DE CROTEAU ET AL. 2000 .....	14
<b>FIGURE I-5 :</b> BIOSYNTHESE DES COMPOSES PHENOLIQUES AU SEIN DES VOIES DU PENTOSE PHOSPHATE, DU SHIKIMATE ET DES PHENYLPROPANOÏDES CHEZ LES PLANTES, VATTEM ET AL. 2005.....	18
<b>FIGURE I-6 :</b> LES DIFFERENTS SOUS-GROUPES STRUCTURELS DES LIGNANES, ADAPTATION DE RODRIGUEZ-GARCIA ET AL. 2019 .....	23
<b>FIGURE I-7 :</b> STRUCTURES DU SECOISOLARICIREINOL SOUS SA FORME LEVOGYRE (-) (A GAUCHE) ET DEXTROGYRE (+) (A DROITE) ....	23
<b>FIGURE I-8 :</b> VOIE DE BIOSYNTHESE DES PRINCIPAUX LIGNANES, RODRIGUEZ-GARCIA ET AL. 2019. PNGT : PINORESINOL GLUCOSYLTRANSFERASE, PSS : PIPERITOL/SESAMIN SYNTHASE, PLR : PINORESINOL/LARICIREINOL REDUCTASE, LGT : LARICIREINOL GLYCOSYLTRANSFERASE, SGT : SECOISOLARICIREINOL GLYCOSYLTRANSFERASE, SID : SECOISOLARICIREINOL DESHYDROGENASE, MMT : MATAIRESINOL O-METHYLTRANSFERASE, GLC : GLUCOSIDE.....	24
<b>FIGURE I-9 :</b> SQUELETTE DE BASE DES FLAVONOÏDES ET LES DIFFERENTS SOUS-GROUPES, ADAPTATION DE PANCHE ET AL. 2016 .....	25
<b>FIGURE I-10 :</b> VOIE DE BIOSYNTHESE SIMPLIFIEE DES FLAVONOÏDES, KOES ET AL. 1994. PAL : PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE, C4H : CINNAMATE 4-HYDROXYLASE, 4CL : 4-COUMAROYL-COENZYME A LIGASE, CHS : CHALCONE SYNTHASE, CHI : CHALCONE FLAVANONE ISOMERASE, F3H : FLAVANONE 3-B-HYDROXYLASE, DFR : DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE, FLS : FLAVONOL SYNTHASE, IFS : ISOFLAVONOÏD SYNTHASE, AS : ANTHOCYANIN SYNTHASE, UF3GT : UDP-GLUCOSE/FLAVONOÏD 3-O-GLUCOSYLTRANSFERASE .....	26
<b>FIGURE I-11 :</b> VOIE DE BIOSYNTHESE SIMPLIFIEE DES COUMARINES, SHIMIZU 2014. PAL : PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE, 4CL : 4-COUMAROYL-COENZYME A LIGASE, LES POSITIONS ORTHO SONT INDIQUEES PAR LES FLECHES ROUGES ET LES ATOMES D'OXYGENE INTRODUIITS PAR ORTHO-HYDROXYLATION SONT INDIQUEES EN ROUGE, LES FLECHES EN POINTILLEES CORRESPONDENT A DES HYDROXYLASES PAS ENCORE DECRITES.....	29
<b>FIGURE I-12 :</b> STRUCTURE CHIMIQUE DE PLUSIEURS STILBENES DE PLANTES, DUBROVINA ET KISELEV 2017 .....	30
<b>FIGURE I-13 :</b> VOIE DE BIOSYNTHESE DES STILBENES CHEZ LES PLANTES, DUBROVINA ET KISELEV 2017. PAL : PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE, C4H : CINNAMATE 4-HYDROXYLASE, C3H : P-COUMARATE 3-HYDROXYLASE, CL : COUMARATE :COA LIGASE, HCT : HYDROXYCINNAMOYLTRANSFERASE, STS : STILBENE SYNTHASE.....	31
<b>FIGURE I-14 :</b> EXEMPLES DE PRODUITS COMMERCIALISES PAR L'ENTREPRISE CAUDALIE, UNE CREME CACHEMIRE REDENSIFIANTE A BASE DE RESVERATROL (A GAUCHE) ET UN SERUM ECLAT ANTI-TACHES A BASE DE VINIFERINES (A DROITE) ( <a href="https://fr.caudalie.com">HTTPS://FR.CAUDALIE.COM</a> ) .....	32
<b>FIGURE I-15 :</b> EXEMPLES D'ALCALOÏDES VRAIS .....	33
<b>FIGURE I-16 :</b> EXEMPLES DE PROTO-ALCALOÏDES.....	33

<b>FIGURE I-17</b> : EXEMPLES DE PSEUDO-ALCALOÏDES .....	34
<b>FIGURE I-18</b> : STRUCTURE CHIMIQUE DE BASE DES DIFFERENTS GROUPES D'ALCALOÏDES, KUKULA-KOCH ET WIDELSKI 2017 .....	35
<b>FIGURE I-19</b> : PRODUITS KLORANE DE LA GAMME A LA QUININE. DE GAUCHE A DROITE : DES COMPLEMENTS ALIMENTAIRES, UN SOIN ANTI-CHUTE, UN SHAMPOOING ET UN BAUME APRES-SHAMPOOING ( <a href="https://www.klorane.com/fr-fr/cheveux/quinine">HTTPS://WWW.KLORANE.COM/FR-FR/CHEVEUX/QUININE</a> ) .....	37
<b>FIGURE I-20</b> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES SYSTEMES DE CULTURE (DE GAUCHE A DROITE) HYDROPONIQES, AEROPONIQES ET AQUAPONIQES .....	39
<b>FIGURE I-21</b> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES ETAPES D'OBTENTION DES CALS ET DES SUSPENSIONS CELLULAIRES JUSQU'À LA CULTURE EN BIOREACTEUR, D'APRES GEORGIEV ET AL. 2018 .....	40
<b>FIGURE I-22</b> : PHOTOGRAPHIE DU DEVELOPPEMENT DE MINI-TUBERCULES DE POMME DE TERRE (SOLANUM TUBEROSUM CULTIVAR PERUVIEN "CANCHAN") EN CULTURE AEROPONIQUE AU CENTRE INTERNATIONAL DE LA POMME DE TERRE (INTERNATIONAL POTATO CENTER, CIP), OTAZU 2010 .....	42
<b>FIGURE I-23</b> : PHOTOGRAPHIES DE LAITUES CULTIVEES EN SYSTEME AEROPONIQUE (A), EN SYSTEME HYDROPONIQUE (B) ET EN POT DANS DU SABLE (C), EL-HELALY ET DARWISH 2019 .....	43
<b>FIGURE I-24</b> : (A) PLANCHE BOTANIQUE DE GINGEMBRE (ZINGIBER OFFICINALE ROSCOE), (B) MOLECULE DE GINGEROL ET (C) MOLECULE DE ZINGIBERENE .....	44
<b>FIGURE I-25</b> : (A) PLANCHE BOTANIQUE DE PERVENCHE DE MADAGASCAR (CATHARANTHUS ROSEUS), (B) MOLECULES DE LOCHNERICINE ET (C) MOLECULE DE HÖRHAMMERICINE .....	45
<b>FIGURE I-26</b> : PHENOTYPE DES DEUX CULTIVARS DE BASILIC (OCIMUM BASILICUM L.) "SWEET GENOVESE" A GAUCHE ET "RED RUBIN" A DROITE .....	45
<b>FIGURE I-27</b> : CARTES (A) DE LA DISTRIBUTION MONDIALE D'ARCTIUM LAPPA AVEC LES ABONDANCES DE LA PLUS ELEVEE EN ROUGE A LA PLUS FAIBLE EN JAUNE, GBIF SECRETARIAT 2019 ET DE LA PRESENCE D'ARCTIUM LAPPA EN BLEU EN FRANCE METROPOLITAINE (B) ET EN REGION CENTRE-VAL DE LOIRE (C), MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE SITE WEB : <a href="https://inpn.mnhn.fr">HTTPS://INPN.MNHN.FR</a> .....	47
<b>FIGURE I-28</b> : (A) PLANCHE BOTANIQUE D'ARCTIUM LAPPA ET (B) PHOTOGRAPHIES DES CAPITULES D'ARCTIUM LAPPA (A GAUCHE) ET D'ARCTIUM MINUS (A DROITE), REPERTOIRE QUEBEC NATURE SITE WEB : <a href="http://www.repertoirequebecnature.com">HTTP://WWW.REPERTOIREQUEBECNATURE.COM</a> ..	48
<b>FIGURE I-29</b> : (A) GEORGE DE MESTRAL ET SON CHIEN (PHOTO : CHARLES DE MESTRAL), (B) CROCHETS A L'EXTREMITÉ DES CAPITULES D'ARCTIUM LAPPA L. (PHOTO : JEAN M. OLLIVIER), (C) SYSTEME VELCRO® AVEC LA PARTIE CROCHET (A GAUCHE) ET LA PARTIE VELOURS (A DROITE) (PHOTO : HADLEY PAUL GARLAN).....	49
<b>FIGURE I-30</b> : SPECIALITES OFFICINALES A BASE DE BARDANE .....	50
<b>FIGURE I-31</b> : PRODUITS COSMETIQUES DE LA MARQUE NIVEA A BASE D'EXTRAITS DE BARDANE BIO (SITE WEB : <a href="https://www.nivea.fr/actualites-nivea/naturallygood-visage">HTTPS://WWW.NIVEA.FR/ACTUALITES-NIVEA/NATURALLYGOOD-VISAGE</a> ).....	50
<b>FIGURE II-1</b> : PRESENTATION DES DIFFERENTES ETAPES MISES EN JEU LORS DE L'APPROCHE DE VALORISATION DU VEGETAL DANS LE CADRE DE NOTRE ETUDE .....	67
<b>FIGURE II-2</b> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PRINCIPE DE LA CALLOGENESE.....	70
<b>FIGURE II-3</b> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ETAPES DE DEVELOPPEMENT DE SUSPENSIONS CELLULAIRES A PARTIR DE CULTURE DE CALS, GEORGIEV ET AL. 2018 .....	72
<b>FIGURE II-4</b> : ILLUSTRATION DE LA MISE EN PLACE D'UNE CULTURE AEROPONIQUE .....	74

<b>FIGURE II-5 :</b> SYSTEME DE LAMPE LED XMAX 4 V4 UTILISE POUR LES ELICITATIONS DES CULTURES DE BARDANE EN HYDROPONIE ACTIVE ET EN HYDROPONIE PASSIVE (HORTICOLED) .....	75
<b>FIGURE II-6 :</b> (A) SCHEMA DU DISPOSITIF MIS EN PLACE POUR L'ELICITATION DE LA BARDANE EN CULTURE D'HYDROPONIE ACTIVE ET (B) PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF .....	76
<b>FIGURE II-7 :</b> REPRESENTATION DE LA CROISSANCE ET DE L'IMPLOSION DE LA BULLE DE CAVITATION, PETRIER ET AL. 2008 .....	78
<b>FIGURE II-8 :</b> REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'EVOLUTION D'UNE BULLE DE CAVITATION A PROXIMITE D'UNE SURFACE SOLIDE, MICHEL 2011, ADAPTATION DE PETRIER ET AL. 2008 .....	78
<b>FIGURE II-9 :</b> SCHEMA SIMPLIFIEE D'UNE CHAINE CHROMATOGRAPHIQUE HPLC, LE 2020 .....	80
<b>FIGURE II-10 :</b> SCHEMA DU SPECTROMETRE DE MASSE MAXIS UHR-QTOF ET LA SOURCE ESI UTILISE, ADAPTATION DE FERREY 2017 .....	81
<b>FIGURE II-11 :</b> REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UNE SOURCE ELECTRONEBULISATION OU ELECTROSPRAY, FERREY 2017 .....	82
<b>FIGURE II-12 :</b> SCHEMA DE L'EMISSION DES IONS $[M+nH]^{n+}$ EN PHASE GAZEUSE EN ESI D'APRES (A) LE MODELE DE DOLE ET (B) LE MODELE D'IRIBARNE ET THOMSON, ADAPTATION DE FERREY 2017 .....	83
<b>FIGURE II-13 :</b> ORGANIGRAMME DES DIFFERENTES ETAPES D'ITERATION DU LOGICIEL XCMS, ADAPTATION DE SMITH ET AL. 2006..	87
<b>FIGURE II-14 :</b> COMPARAISON DES STRUCTURES D'UNE PEAU JEUNE ET D'UNE PEAU AGE, ADAPTATION DU SITE INTERNET <a href="https://www.dralexchambers.co.uk/fat-removal/improving-skin-thickness-and-elasticity.html">HTTPS://WWW.DRALEXCHAMBERS.CO.UK/FAT-REMOVAL/IMPROVING-SKIN-THICKNESS-AND-ELASTICITY.HTML</a> .....	89
<b>FIGURE II-15 :</b> LES SOURCES ENDOGENES DES ROS DANS L'ORGANISME, ADAPTATION DE DEMARCHEZ 2012 .....	90
<b>FIGURE II-16 :</b> REDUCTION ENZYMATIQUE DE L'ANNEAU TETRAZOLIUM DU XTT EN FORMAZAN. ENCADRE EN ROUGE : ANNEAU TETRAZOLIUM A GAUCHE ET FORMAZAN A DROITE, ADAPTATION DE KUETE ET AL. 2017 .....	94
<b>FIGURE II-17 :</b> SCHEMA REPRESENTATIF DE L'ACTION DES ROS SUR LA CONVERSION DU DCF-DA EN DCF FLUORESCENT .....	95
<b>FIGURE II-18 :</b> REACTIONS AVEC DES COMPOSES PHENOLIQUES DE L'ACIDE PHOSPHOTUNGSTIQUE (A) ET DE L'ACIDE PHOSPHOMOLYBDIQUE (B), ADAPTATION DE BANCUTA ET AL. 2016 .....	96
<b>FIGURE II-19 :</b> REACTION ENTRE LE RADICAL ABTS ET UN COMPOSE ANTIOXYDANT (AO-H), DROUET 2019 .....	97
<b>FIGURE II-20 :</b> REACTION DU RADICAL STABLE DPPH AVEC UN COMPOSE ANTIOXYDANT (AO-H), DROUET 2019 .....	99
<b>FIGURE II-21 :</b> REACTION DU COMPLEXE CUIVRE AVEC UN COMPOSE ANTIOXYDANT (AO-H), DROUET 2019 .....	100
<b>FIGURE II-22 :</b> VOIE DE BIOSYNTHESE DES MELANINES, KIM ET UYAMA 2005 .....	101
<b>FIGURE II-23 :</b> FORMULE DE L'ARCTIINE ET DE L'ARCTIGENINE, LEE ET AL. 2010 .....	107
<b>FIGURE II-24 :</b> EXEMPLES D'INHIBITEURS SYNTHETIQUES DE LA COLLAGENASE, LA BATIMASTAT <sup>•</sup> (A) ET LE MARIMASTAT <sup>•</sup> (B) .....	112
<b>FIGURE III-1 :</b> REPRESENTATION SOUS FORME HEATMAP A L'AIDE DU LOGICIEL MEV (MULTIPLE EXPERIMENT VIEWER) DES MESURES DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS DES ORGANES RETENUS POUR LES TREIZE PLANTES SUR TROIS TESTS CHIMIQUES EXPRIMEES EN VALEURS D'IC <sub>50</sub> .....	128
<b>FIGURE III-2 :</b> ACTIVITES DE L'ENZYME TYROSINASE EXPRIMEES EN POURCENTAGE POUR LES TREIZE EXTRAITS D'ORGANES DE PLANTES DILUES AU 1/2 DANS LE SOLVANT D'EXTRACTION. SUBSTRAT : L-DOPA, INHIBITEUR : GLABRIDINE, N=3 .....	130
<b>FIGURE III-3 :</b> CLASSIFICATION DES TREIZE EXTRAITS D'ORGANES DE PLANTES DU PLUS INHIBITEUR (A GAUCHE) AU MOINS INHIBITEUR (A DROITE) VIS-A-VIS DE LA TYROSINASE .....	131
<b>FIGURE III-4 :</b> ACTIVITES DE L'ENZYME ELASTASE EXPRIMEES EN POURCENTAGE POUR LES TREIZE EXTRAITS D'ORGANES DE PLANTES DILUES AU 1/2 DANS LE SOLVANT D'EXTRACTION. SUBSTRAT : ÉLASTINE, INHIBITEUR : N-METHOXYSUCCINYL-ALA-ALA-PRO-VAL-CHLOROMETHYLKETONE, N=3 .....	131

<b>FIGURE III-5 :</b> CLASSIFICATION DES TREIZE EXTRAITS D'ORGANES DE PLANTES DU PLUS INHIBITEUR (A GAUCHE) AU MOINS INHIBITEUR (A DROITE) VIS-A-VIS DE L'ELASTASE .....	132
<b>FIGURE III-6 :</b> MESURES DE L'ACTIVITE DE L'ENZYME COLLAGENASE EXPRIMEES EN POURCENTAGE POUR LES TREIZE EXTRAITS D'ORGANES DE PLANTES DILUES AU ½ DANS LE SOLVANT D'EXTRACTION. SUBSTRAT : GELATINE, INHIBITEUR : 1,10-PHENANTHROLINE, N=3 .....	132
<b>FIGURE III-7 :</b> CLASSIFICATION DES TREIZE EXTRAITS D'ORGANES DE PLANTES DU PLUS INHIBITEUR (A GAUCHE) AU MOINS INHIBITEUR (A DROITE) VIS-A-VIS DE LA COLLAGENASE .....	133
<b>FIGURE III-8 :</b> (A) PHOTOGRAPHIES DES CALS ET (B) PESEES DES CALS APRES 96 HEURES D'ELICITATION LUMINEUSE, N=3 .....	135
<b>FIGURE III-9 :</b> ÉVALUATION DU POTENTIEL DE L'ELICITATION LUMINEUSE SUR UNE CULTURE IN VITRO DE CALS DE BARDANE (A) TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX EXPRIMEE EN MG/L D'EQUIVALENT D'ACIDE GALLIQUE PAR MG DE POIDS SEC ET MESUREE A L'AIDE DU REACTIF DE FOLIN-CIOALTEU POUR LES CALS ELICITES AVEC DIFFERENTES LUMIERES EN COMPARAISON DES DEUX CONTROLES, LES CALS A L'OBSCURITE ET LES RACINES DE BARDANE ET (B) MESURES DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS DE CALS ELICITES SUR TROIS TESTS CHIMIQUES EXPRIMEES EN EQUIVALENT TROLOX ET REPRESENTES SOUS FORME HEATMAP A L'AIDE DU LOGICIEL MEV (MULTIPLE EXPERIMENT VIEWER), N=3 .....	136
<b>FIGURE III-10 :</b> EXEMPLE D'EXTRACTIONS D'IONS (EIC) DES STANDARDS SODES ET NON SODES D'UN MELANGE DES STANDARDS A 5µG/ML. LA PRECISION POUR EXTRAIRE L'EIC DE CHAQUE ION EST DE ± 0,005 M/z .....	142
<b>FIGURE III-11 :</b> EXEMPLE DE CHROMATOGRAMME DE L'ÉCHANTILLON QC REGROUPANT A VOLUME EGAUX L'ENSEMBLE DES EXTRAITS OBTENUS EN HYDROPONIE ACTIVE ET LES EXTRACTIONS D'IONS DES MOLECULES D'INTERETS SODEES ET NON SODEES. LA PRECISION POUR EXTRAIRE L'EIC DE CHAQUE ION EST DE ± 0,005 M/z .....	143
<b>FIGURE III-12 :</b> COURBES D'ETALONNAGE POUR LES DEUX MOLECULES D'INTERET, EN BLEU POUR L'ARCTIGENINE ET EN ORANGE POUR L'ARCTIINE PERMETTANT D'ETABLIR UNE CORRELATION ENTRE LA CONCENTRATION DU STANDARD ET L'AIRE DU PIC CHROMATOGRAPHIQUE CORRESPONDANT .....	144
<b>FIGURE III-13 :</b> QUANTIFICATION DE L'ARCTIINE (ORANGE) ET DE L'ARCTIGENINE (BLEU) DANS DES EXTRAITS DE BARDANE CULTIVEE EN HYDROPONIE PASSIVE ET SOUS UNE LUMIERE D'ELICITATION ROUGE (A), BLEUE (B) ET BLANCHE (C). ND = NON DETECTE....	145
<b>FIGURE III-14 :</b> ACTIVITE DE LA TYROSINASE EXTRAITE DE CHAMPIGNON EXPRIMEE EN POURCENTAGE POUR CHACUN DES EXTRAITS DE CALS CULTIVES A LA LUMIERE OU A L'OBSCURITE PENDANT 30 HEURES, N=2. TRAIT ROUGE : LIMITE DE 100%.....	147
<b>FIGURE III-15 :</b> ACTIVITE DE LA TYROSINASE EXTRAITE DE CHAMPIGNON EXPRIMEE EN POURCENTAGE POUR LES EXTRAITS DE BARDANE CULTIVEE EN HYDROPONIE ACTIVE AVEC ET SANS ELICITATIONS LUMINEUSES DILUES AU ½ DANS LE SOLVANT D'EXTRACTION, N=3. LED : ELICITATION A LA LUMIERE BLEUE EN PLUS DE LA LUMIERE NATURELLE, Ø : LUMIERE NATURELLE, TRAIT ROUGE : LIMITE DE 100%.....	148
<b>FIGURE III-16 :</b> ACTIVITE DE L'ENZYME TYROSINASE EXTRAITE DE CHAMPIGNON EXPRIMEE EN POURCENTAGE EN PRESENCE DES EXTRAITS DE BARDANE CULTIVEE EN HYDROPONIE PASSIVE SOUS DIFFERENTES LUMIERES D'ELICITATION DILUES AU ½ DANS LE SOLVANT D'EXTRACTION, N=3. TRAIT ROUGE : LIMITE DE 100%.....	149
<b>FIGURE III-17 :</b> CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS DE PETIOLES DE BARDANE ELICITEE SOUS LUMIERE BLEUE ET SOUS LUMIERE ROUGE OBTENUS PAR ESI-QTOF-MS ET SOUSTRACTIONS DES CHROMATOGRAMMES REALISEES PAR LE LOGICIEL METABOLITEDETECT. LES BANDEAUX ORANGE METTENT EN EVIDENCE LES PICS DE NOS MOLECULES D'INTERETS, L'ARCTIINE (1) ET L'ARCTIGENINE (2) .....	151

<b>FIGURE III-18</b> : CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS DE PETIOLES DE BARDANE ELICITEE SOUS LUMIERE ROUGE ET SOUS LUMIERE BLANCHE OBTENUS PAR ESI-QTOF-MS ET SOUSTRATIONS DES CHROMATOGRAMMES REALISEES PAR LE LOGICIEL METABOLITEDTECT. LES BANDEAUX ORANGE METTENT EN EVIDENCE LES PICS DE NOS MOLECULES D'INTERETS, L'ARCTIINE (1) ET L'ARCTIGENINE (2).....	152
<b>FIGURE III-19</b> : CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS DE PETIOLES DE BARDANE ELICITEE SOUS LUMIERE BLEUE ET SOUS LUMIERE BLANCHE OBTENUS PAR ESI-QTOF-MS ET SOUSTRATIONS DES CHROMATOGRAMMES REALISEES PAR LE LOGICIEL METABOLITEDTECT. LES INDICENT LES PICS CHROMATOGRAPHIQUES ENCADRES EN GRIS IDENTIQUES A CEUX ENCADRES LORS DE LA COMPARAISON ENTRE L'EXTRAIT BLANC ET L'EXTRAIT ROUGE A LA FIGURE PRECEDENTE .....	153
<b>FIGURE III-20</b> : SPECTRES DE MASSE DES TROIS PICS CHROMATOGRAPHIQUES MIS EN EVIDENCE A LA FIGURE PRECEDENTE, SYMBOLISES PAR DES ET POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE L'ACTIVITE DE L'EXTRAIT VIS-A-VIS DE LA TYROSINASE AVEC EN ROUGE LES IONS RESULTATS DES SOUSTRATIONS .....	154
<b>FIGURE III-21</b> : ACTIVITE ANTIOXYDANTE EXPRIMEE EN $\mu\text{g/mL}$ D'EQUIVALENT TROLOX MESUREE AVEC LE TEST DPPH POUR LES EXTRAITS DE BARDANE CULTIVEE EN HYDROPONIE ACTIVE, N=3. LED : ELICITATION A LA LUMIERE BLEUE EN COMPLEMENT DE LA LUMIERE NATURELLE ET $\emptyset$ : LUMIERE NATURELLE UNIQUEMENT .....	162
<b>FIGURE III-22</b> : ACTIVITE ANTIOXYDANTE EXPRIMEE EN $\mu\text{g/mL}$ D'EQUIVALENT TROLOX MESUREE AVEC LE TEST CUPRAC POUR LES EXTRAITS DE BARDANE CULTIVEE EN HYDROPONIE ACTIVE, N=3. LED : ELICITATION A LA LUMIERE BLEUE EN COMPLEMENT DE LA LUMIERE NATURELLE ET $\emptyset$ : LUMIERE NATURELLE UNIQUEMENT .....	163
<b>FIGURE III-23</b> : ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITE PAR LE TEST DE XTT DES EXTRAITS DE RACINES (A) ET DE FEUILLES (B) DE BARDANE CULTIVEE EN HYDROPONIE ACTIVE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS ET EXPRIMEE EN POURCENTAGE DE VIABILITE CELLULAIRE PAR RAPPORT AUX CELLULES NON TRAITEES, 4 EXPERIENCES INDEPENDANTES AVEC N=3. NT : NON TRAITEE, LED : ELICITATION A LA LUMIERE BLEUE EN COMPLEMENT DE LA LUMIERE NATURELLE, $\emptyset$ : LUMIERE NATURELLE UNIQUEMENT, † : 2 EXPERIENCES INDEPENDANTES AVEC N=3, ‡ : 1 EXPERIENCE INDEPENDANTE AVEC N=3 ET TRAIT ROUGE : LIMITE DE 100%.....	165
<b>FIGURE III-24</b> : PROTECTION CONTRE LES ROS EXPRIMEE EN POURCENTAGE PAR RAPPORT AUX CELLULES IRRADIEES CONTROLES POUR LES EXTRAITS DE RACINES (A) ET DE FEUILLES (B) DE BARDANE CULTIVEE EN HYDROPONIE ACTIVE SOUS ELICITATION A LA LUMIERE BLEUE (BLEU) OU SOUS LUMIERE NATURELLE (ORANGE), 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES AVEC N=5. LED : ELICITATION A LA LUMIERE BLEUE EN COMPLEMENT DE LA LUMIERE NATURELLE, $\emptyset$ : LUMIERE NATURELLE UNIQUEMENT .....	167
<b>FIGURE III-25</b> : CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS DE FEUILLES DE BARDANE, CULTIVEE EN HYDROPONIE ACTIVE SOUS LUMIERE NATURELLE ( $\emptyset$ ) OU SOUS LUMIERE BLEUE (LED) ET ECHANTILLONNES A 3 JOURS DE CULTURE OBTENUS PAR ESI-QTOF-MS ET SOUSTRATIONS DES CHROMATOGRAMMES REALISEES PAR LE LOGICIEL METABOLITEDTECT.....	169
<b>FIGURE III-26</b> : SPECTRES DE MASSE DES 7 PICS CHROMATOGRAPHIQUES MIS EN EVIDENCE A LA FIGURE PRECEDENTE PAR DES ENCADRES BLEUS ET POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE LA DIMINUTION DE LA TOXICITE DE L'EXTRAIT DE FEUILLES DE BARDANE A LA LUMIERE BLEUE (LED) VIS-A-VIS DES CELLULES DE KERATINOCYTES, EN COMPARAISON DE L'EXTRAIT DE FEUILLES A LA LUMIERE NATURELLE AU MEME TEMPS D'ECHANTILLONNAGE, AVEC EN ROUGE LES IONS RESULTATS DES SOUSTRATIONS .....	170
<b>FIGURE III-27</b> : EXEMPLE DE SPECTRE DE MASSE MS EN BLEU AU TEMPS DE RETENTION 11,56 MIN AVEC L'ION A M/z 221,1899 SYMBOLISE PAR UN ET DU SPECTRE DE FRAGMENTATION MS/MS DE L'ION A M/z 221,1899 EN BLEU CIEL .....	174
<b>FIGURE III-28</b> : STRUCTURES CHIMIQUES DU FARNESAL (A) ET DE L'HORMONE JUVENILE III (B) .....	175

<b>FIGURE III-29</b> : CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS DE RACINES DE BARDANE, CULTIVEE EN HYDROPONIE ACTIVE SOUS LUMIERE NATURELLE (Ø) ET ECHANTILLONNES AU DEBUT (T0) OU APRES 21 JOURS DE CULTURE (T+21J) OBTENUS PAR ESI-QTOF-MS ET SOUSTRACTION DES CHROMATOGRAMMES REALISEES PAR LE LOGICIEL METABOLITEDETECT .....	176
<b>FIGURE III-30</b> : SPECTRES DE MASSE DES 5 PICS CHROMATOGRAPHIQUES MIS EN EVIDENCE A LA FIGURE PRECEDENTE PAR DES ENCADRES BLEUS ET POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE L'AUGMENTATION DE LA PROTECTION DES KERATINOCYTES CONTRE LES ROS OBSERVEE ENTRE L'EXTRAIT DE RACINES AU DEBUT DE LA CULTURE ET L'EXTRAIT DE RACINES APRES 21 JOURS DE CULTURE SOUS LUMIERE NATURELLE, AVEC EN ROUGE LES IONS RESULTATS DES SOUSTRACTIONS.....	177
<b>FIGURE III-31</b> : CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS DE FEUILLES DE BARDANE, CULTIVEE EN HYDROPONIE ACTIVE SOUS LUMIERE NATURELLE (Ø) ET ECHANTILLONNES SOIT AU DEPART DE LA CULTURE (T0) SOIT APRES 21 JOURS DE CULTURE (T+21J) OBTENUS PAR ESI-QTOF-MS ET SOUSTRACTIONS DES CHROMATOGRAMMES REALISEES PAR METABOLITEDETECT.....	181
<b>FIGURE III-32</b> : SPECTRES DE MASSE DES 6 PICS CHROMATOGRAPHIQUES MIS EN EVIDENCE A LA FIGURE PRECEDENTE PAR DES ENCADRES BLEUS ET POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE L'AUGMENTATION DE LA PROTECTION DES KERATINOCYTES CONTRE LES ROS OBSERVEE ENTRE L'EXTRAIT DE FEUILLES AU DEBUT DE LA CULTURE ET L'EXTRAIT DE FEUILLES APRES 21 JOURS DE CULTURE SOUS LUMIERE NATURELLE, AVEC EN ROUGE LES IONS RESULTATS DES SOUSTRACTIONS.....	182
<b>FIGURE III-33</b> : STRUCTURE CHIMIQUE DE L'ACIDE CHLOROGENIQUE .....	182
<b>FIGURE III-34</b> : STRUCTURES CHIMIQUES DU 1-AMINOCYCLOHEXANECARBOXYLIC ACID (A) ET DE L'INDOLINE (B), DES EXEMPLES PARMI LES NOMBREUSES CORRESPONDANCES DE LEUR FORMULE BRUTE RESPECTIVEMENT $C_7H_{13}NO_2$ ET $C_8H_9N$ , DANS LA BASE DE DONNEES METLIN POUR L'IDENTIFICATION DES IONS A $m/z$ 144,1021 ET $m/z$ 120,0808.....	185
<b>FIGURE III-35</b> : STRUCTURES CHIMIQUES DE L'ACIDE INDOLE ACRYLIQUE (A) ET DE L'ACIDE 3-AMINO-2-NAPHTHOIQUE (B), LES DEUX PROPOSITIONS D'IDENTIFICATIONS POUR L'ION A $m/z$ 188,0708 FOURNIES PAR LA BASE DE DONNEES METLIN .....	186
<b>FIGURE III-36</b> : CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS DE RACINES DE BARDANE, CULTIVEE EN HYDROPONIE ACTIVE SOUS LUMIERE NATURELLE (Ø) OU SOUS LUMIERE BLEUE (LED) ET ECHANTILLONNES A 21 JOURS DE CULTURE OBTENUS PAR ESI-QTOF-MS ET SOUSTRACTIONS DES CHROMATOGRAMMES REALISEES PAR METABOLITEDETECT .....	187
<b>FIGURE III-37</b> : SPECTRES DE MASSE DES DEUX PICS CHROMATOGRAPHIQUES MIS EN EVIDENCE A LA FIGURE PRECEDENTE PAR DES ENCADRES ORANGE ET POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE LA DIFFERENCE OBSERVEE ENTRE LES CAPACITES DE PROTECTION DES EXTRAITS DE RACINES ECHANTILLONNES A 21 JOURS DE CULTURE SOUS LUMIERE NATURELLE OU SOUS LUMIERE BLEUE, AVEC EN ROUGE LES IONS RESULTATS DES SOUSTRACTIONS.....	188
<b>FIGURE III-38</b> : CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS DE FEUILLES DE BARDANE, CULTIVEE EN HYDROPONIE ACTIVE SOUS LUMIERE NATURELLE (Ø) OU SOUS LUMIERE BLEUE (LED) ET ECHANTILLONNES A 21 JOURS DE CULTURE OBTENUS PAR ESI-QTOF-MS ET EXTRACTIONS D'IONS DES DEUX IONS MIS EN EVIDENCE DANS LES RACINES DE BARDANE DANS LES MEMES CONDITIONS DE CULTURE ET POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DES DIFFERENCES DE CAPACITE DE PROTECTION CONTRE LES ROS OBSERVEES ENTRE LES DEUX CONDITIONS D'ECLAIRAGE. LA PRECISION POUR EXTRAIRE L'EIC DE CHAQUE ION EST DE $\pm 0,005 m/z$ .....	189
<b>FIGURE III-39</b> : CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS DE FEUILLES ET DE RACINES DE BARDANE, CULTIVEE EN HYDROPONIE ACTIVE SOUS LUMIERE BLEUE (LED) ET ECHANTILLONNES A 21 JOURS DE CULTURE OBTENUS PAR ESI-QTOF-MS ET SOUSTRACTIONS DES CHROMATOGRAMMES REALISEES PAR LE LOGICIEL METABOLITEDETECT .....	190
<b>FIGURE III-40</b> : SPECTRES DE MASSE DES CINQ PICS CHROMATOGRAPHIQUES MIS EN EVIDENCE A LA FIGURE PRECEDENTE PAR DES ENCADRES VERT ET POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE LA DIFFERENCE OBSERVEE ENTRE LES CAPACITES DE PROTECTION DES	

EXTRAITS DE RACINES ET DE FEUILLES SOUS LUMIERE BLEUE ET ECHANTILLONNES A 21 JOURS DE CULTURE, AVEC EN ROUGE LES IONS RESULTATS DES SOUSTRATIONS.....	191
<b>FIGURE III-41</b> : STRUCTURES CHIMIQUES DE L'ARTEMISINE (A), DE LA SILYBINE B (B) ET DES ISOSILYBINES A (C) ET B (D), EXEMPLES DE MOLECULES PARMIS LES PROPOSITIONS D'IDENTIFICATION POUR LES IONS MIS EN EVIDENCE COMME POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DES DIFFERENCES DE CAPACITE DE PROTECTION CONTRE LES ROS OBSERVEES ENTRE LES EXTRAITS DE RACINES ET LES EXTRAITS DE FEUILLES DE BARDANE.....	195
<b>FIGURE III-42</b> : CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS DE FEUILLES ET DE RACINES DE BARDANE, CULTIVEE EN HYDROPONIE ACTIVE SOUS LUMIERE NATURELLE (Ø) ET ECHANTILLONNES A 21 JOURS DE CULTURE OBTENUS PAR ESI-QTOF-MS ET SOUSTRACTION DES CHROMATOGRAMMES REALISEES PAR LE LOGICIEL METABOLITEDETECT.....	196
<b>FIGURE III-43</b> : SPECTRES DE MASSE DES TREIZE PICS CHROMATOGRAPHIQUES MIS EN EVIDENCE A LA FIGURE PRECEDENTE PAR DES ENCADRES JAUNE ET POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE LA CAPACITE DE PROTECTION DES EXTRAITS DE RACINES ET DE FEUILLES DE BARDANE SOUS LUMIERE NATURELLE ET ECHANTILLONNES A 21 JOURS DE CULTURE, AVEC EN ROUGE LES IONS QUE NOUS AVONS CHERCHE A IDENTIFIER .....	197





# Table des tableaux

<b>TABLEAU I-1</b> : CLASSIFICATION DES TERPENOÏDES.....	15
<b>TABLEAU I-2</b> : CLASSIFICATION DES COMPOSES PHENOLIQUES.....	19
<b>TABLEAU I-3</b> : LES DIFFERENTS SOUS-GROUPES DE COUMARINES, ADAPTATION DE VENUGOPALA ET AL. 2013 .....	28
<b>TABLEAU I-4</b> : PRINCIPAUX COMPOSES DE LA BARDANE ET LEURS EFFETS, D'APRES CHAN ET AL. 2011.....	51
<b>TABLEAU II-1</b> : LISTE DES 13 PLANTES SELECTIONNEES AU DEPART DU PROJET .....	68
<b>TABLEAU II-2</b> : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE DES CALS POUR 1 L, <sup>1</sup> MURASHIGE ET SKOOG, 1962 ; <sup>2</sup> AJOUTE STERILEMENT APRES AUTOCLAVE .....	70
<b>TABLEAU II-3</b> : COMPOSITION DU Fe-EDTA D'APRES MURASHIGE ET SKOOG, 1962. *LES COMPOSES SONT DISSOUTS SEPAREMENT DANS 500 ML AVANT L'ADDITION LENTE DE LA SOLUTION DE SULFATE DE FER DANS LA SOLUTION DE SULFATE DI-SODIQUE .....	71
<b>TABLEAU II-4</b> : COMPOSITION DES VITAMINES DE MOREL ET WETMORE D'APRES MOREL ET WETMORE 1951. LES VITAMINES SONT FILTRES SUR UNE MEMBRANE DE 0,20 µM APRES STERILISATION DU MILIEU A L'AUTOCLAVE A PARTIR D'UNE SOLUTION CONCENTREE 200X.....	71
<b>TABLEAU II-5</b> : COMPOSITION DES MACROELEMENTS (A GAUCHE) ET DES MICROELEMENTS (A DROITE) D'APRES MURASHIGE ET SKOOG, 1962.....	71
<b>TABLEAU II-6</b> : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE L'IONISATION ELECTROSPRAY .....	83
<b>TABLEAU II-7</b> : TABLEAU COMPARATIF DES PERFORMANCES DES DIFFERENTS ANALYSEURS.....	85
<b>TABLEAU II-8</b> : EXEMPLES D'ANTIOXYDANTS ENZYMATIQUES, ADAPTATION DE BIRBEN ET AL. 2012.....	91
<b>TABLEAU II-9</b> : EXEMPLES DE MOLECULES ANTIOXYDANTES NON-ENZYMATIQUES .....	92
<b>TABLEAU II-10</b> : COMPOSES UTILISES POUR LE TRAITEMENT DE L'HYPERPIGMENTATION APPROUVEES PAR LE MINISTERE JAPONAIS DE LA SANTE, DU TRAVAIL ET DES AFFAIRES SOCIALES (MHLW) .....	103
<b>TABLEAU II-11</b> : EXEMPLES DE MOLECULES D'ORIGINE NATURELLE INHIBITRICES DE L'ELASTASE .....	109
<b>TABLEAU II-12</b> : EXEMPLES DE MOLECULES D'ORIGINE NATURELLE INHIBITRICES DE LA COLLAGENASE .....	113
<b>TABLEAU III-1</b> : LISTE DES DIFFERENTS ORGANES D'INTERET « COSMETIQUE » ETUDIES POUR CHACUNE DES TREIZE PLANTES.....	127
<b>TABLEAU III-2</b> : TABLEAU REGROUPANT LES RESULTATS D'IDENTIFICATION APRES RECHERCHES DANS LA BASE DE DONNEES LOTUS POUR LES TROIS IONS D'INTERETS .....	156
<b>TABLEAU III-3</b> : PROPOSITIONS DE FORMULES BRUTES DE L'OUTIL SMART FORMULA POUR LA FORME [M+H] <sup>+</sup> ET PROPOSITIONS D'IDENTIFICATION DES BASES DE DONNEES METLIN ET MASSBANK A PARTIR DES SPECTRES DE FRAGMENTATION MS/MS POUR LES TROIS IONS MIS EN EVIDENCE COMME POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE L'ACTIVITE TYROSINASE DES EXTRAITS DE BARDANE CULTIVEE EN HYDROPONIE PASSIVE ET SOUS ELICITATION LUMINEUSE .....	157
<b>TABLEAU III-4</b> : PROPOSITIONS DE FORMULES BRUTES DE L'OUTIL SMART FORMULA POUR LA FORME [M+H] <sup>+</sup> ET PROPOSITIONS D'IDENTIFICATION DES BASES DE DONNEES METLIN ET MASSBANK A PARTIR DES SPECTRES DE FRAGMENTATION MS/MS POUR LES SEPT IONS POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE LA DIMINUTION DE LA CYTOTOXICITE OBSERVEE AVEC LES EXTRAITS DE BARDANE CULTIVEE EN HYDROPONIE ACTIVE SOUS LUMIERE BLEUE .....	171
<b>TABLEAU III-5</b> : TABLEAU REGROUPANT LES RESULTATS D'IDENTIFICATION APRES RECHERCHES DANS LA BASE DE DONNEES LOTUS POUR LES CINQ IONS D'INTERETS .....	178

<b>TABLEAU III-6</b> : PROPOSITIONS DE FORMULES BRUTES DE L'OUTIL SMART FORMULA POUR LA FORME $[M+H]^+$ ET PROPOSITIONS D'IDENTIFICATION DES BASES DE DONNEES METLIN ET MASSBANK A PARTIR DES SPECTRES DE FRAGMENTATION MS/MS POUR LES DEUX IONS POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE L'AUGMENTATION DE LA PROTECTION DES KERATINOCYTES CONTRE LES ROS AU COURS DU TEMPS DE CULTURE DANS LES RACINES ET POUR LESQUELS AUCUNE CORRESPONDANCE N'A ETE TROUVE DANS LA BASE DE DONNEES LOTUS .....	180
<b>TABLEAU III-7</b> : PROPOSITIONS DE FORMULES BRUTES POUR LA FORME $[M+H]^+$ DE L'OUTIL SMART FORMULA ET PROPOSITIONS D'IDENTIFICATION DES BASES DE DONNEES METLIN ET MASSBANK A PARTIR DES SPECTRES DE FRAGMENTATION MS/MS POUR LES CINQ IONS POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE L'AUGMENTATION DE LA PROTECTION DES KERATINOCYTES CONTRE LES ROS AU COURS DU TEMPS DE CULTURE DANS LES FEUILLES ET POUR LESQUELS AUCUNE CORRESPONDANCE N'A ETE TROUVE DANS LA BASE DE DONNEES LOTUS .....	183
<b>TABLEAU III-8</b> : PROPOSITIONS DE FORMULES BRUTES DE L'OUTIL SMART FORMULA POUR LA FORME $[M+H]^+$ ET PROPOSITIONS D'IDENTIFICATION DES BASES DE DONNEES METLIN ET MASSBANK A PARTIR DES SPECTRES DE FRAGMENTATION MS/MS POUR LES QUATRE IONS POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DES DIFFERENCES DE PROTECTION DES KERATINOCYTES CONTRE LES ROS OBSERVEES EN FONCTION DE L'ORGANE ETUDIE ET POUR LESQUELS AUCUNE CORRESPONDANCE N'A ETE TROUVE DANS LA BASE DE DONNEES LOTUS.....	193
<b>TABLEAU III-9</b> : TABLEAU REGROUPANT LES RESULTATS D'IDENTIFICATION APRES RECHERCHES DANS LA BASE DE DONNEES LOTUS POUR CINQ IONS D'INTERETS MIS EN EVIDENCE LORS DE LA RECHERCHE DE MOLECULES COMMUNES AUX EXTRAITS DE RACINES ET DE FEUILLES DE BARDANE A 21 JOURS DE CULTURE SOUS LUMIERE NATURELLE ET POTENTIELLEMENT RESPONSABLE DE LEUR CAPACITE DE PROTECTION DES KERATINOCYTES CONTRE LES ROS.....	198
<b>TABLEAU III-10</b> : PROPOSITIONS DE FORMULES BRUTES POUR LA FORME $[M+H]^+$ DE L'OUTIL SMART FORMULA ET PROPOSITIONS D'IDENTIFICATION DES BASES DE DONNEES METLIN ET MASSBANK A PARTIR DES SPECTRES DE FRAGMENTATION MS/MS POUR LES QUATORZE IONS POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE LA CAPACITE DE PROTECTION DES KERATINOCYTES CONTRE LES ROS OBSERVEE DANS LES EXTRAITS DE RACINES ET DE FEUILLES DE BARDANE ET POUR LESQUELS AUCUNE CORRESPONDANCE N'A ETE TROUVE DANS LA BASE DE DONNEES LOTUS.....	201





# Liste des abbréviations

**ABTS** : 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzoThiazoline-6-Sulfonic acid)

**ACP** : Analyse en Composantes Principales

**ANA** : Acide 1-Naphtalène acétique

**APA** : Protocole de Nagoya sur l'accès et le partage des avantages

**ATCC** : American Type Culture Collection

**BAP** : 6-BenzylAminoPurine

**CUPRAC** : CUPric-Reducing Antioxidant Capacity

**DCF/DCF-DA** : 2',7'-Dichlorofluorescéine/2',7'-Dichlorodihydrofluorescéine diacétate

**DPPH** : 2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl

**EIC** : Extraction Ion Chromatogram

**IECIC** : Inventory of Existing Cosmetic Ingredients in China

**LED** : Light-Emitting Diode

**LOD/LOQ** : Limit Of Detection/Limit of Quantification

**MeV** : Mutiple experience Viewer

**Nd** : Non détecté

**PAR** : Photosynthetically Active Radiation

**PLS-DA** : Partial Least Squares – Discriminant Analysis

**QC** : Quality Control

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**TEAC** : Trolox Equivalent Activity Concentration

**Trolox** : Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique

**UV** : Ultraviolet

**XTT** : 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide



# Introduction générale







La peau constitue le plus grand organe du corps humain, en effet elle représente environ 16% de son poids total (Boutonnat 2006)<sup>1</sup>. Notre peau est notre première ligne de défense contre les agressions extérieures qu'elles soient d'origine pathogène, comme les virus ou les bactéries ou d'origine environnementale comme les rayons ultraviolets. Les sources de stress ainsi que la pollution environnementale par l'utilisation de pesticides par exemple pourraient engendrer un vieillissement prématuré de la peau. De nombreux autres facteurs tels qu'un mode de vie de plus en plus sédentarisé ainsi qu'une alimentation riche en graisses saturées et/ou en sucres de même que le manque de sommeil contribuent à l'accélération du vieillissement de la peau. C'est pourquoi nous faisons face à une demande croissante pour de nouveaux soins anti-âge plus performants à laquelle s'ajoute une préférence des consommateurs pour les produits cosmétiques à base d'extraits naturels ou d'actifs de plantes. Parallèlement, ce secteur a connu un revirement considérable avec de nouvelles réglementations telles que le Protocole de Nagoya qui imposent une adaptation nécessaire quant au choix des matières premières qui entreront dans la composition des produits cosmétiques. Ces nouvelles réglementations nous fournissent aujourd'hui une occasion importante d'élaborer des approches innovantes faisant appel à l'utilisation et à la valorisation de la flore locale.

L'innovation technologique ne doit pas être écartée de cette démarche de développement durable d'une filière d'approvisionnement local de matières premières végétales. En effet, les entreprises cosmétiques sont soumises à des pressions constantes et intenses pour innover, en vue de particulariser leurs produits pour attirer de nouveaux consommateurs et s'assurer ainsi un avantage commercial. Aujourd'hui, il existe sur le marché une large variété de produits cosmétiques contenant des extraits de plantes ou des principes actifs d'origine naturelle. La valorisation de la richesse de la biodiversité régionale et la mise en place d'une démarche durable dans la production de bioactifs répond aux besoins de l'industrie cosmétique dans un contexte réglementaire contraignant.

Les végétaux supérieurs ainsi que d'autres ressources naturelles constituent une réserve encore sous-exploitée riche en substances biologiques actives qui ont pour certaines trouvé des applications dans les industries cosmétiques. Les connaissances ethnobotaniques permettent de cibler des plantes ou des parties de celles-ci potentiellement intéressantes pour répondre à des approches cosmétiques telles que la réduction des rides ou la diminution de l'hyperpigmentation par exemple.

C'est dans ce contexte que nos études au sein du projet ValBioCosm' se sont concentrées sur l'impact du mode de culture et de l'élicitation lumineuse sur le profil phytochimique et l'activité

---

<sup>1</sup> **Boutonnat J. (2006)** Chapitre 9 : La peau. *Histologie - Étude des tissus, PCEM1 Année universitaire 2006-2007* [Internet]. <https://docplayer.fr/45670653-Docteur-jean-boutonnat.html>

biologique d'extraits de plante. Le projet ValBioCosm' signifiant « Valorisation de la Biodiversité en Cosmétique » a été réalisé dans le cadre du programme ARD 2020 CosmétoSciences et financé par la Région Centre-Val de Loire. Ce projet s'inscrit dans une démarche de valorisation du patrimoine végétal et de l'industrie locale de la Région Centre-Val de Loire tout en mettant en lien de nombreux acteurs de la région dans le but d'un approvisionnement de l'industrie cosmétique. Le projet ValBioCosm' regroupe huit partenaires. Tout d'abord quatre partenaires académiques : le Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC) USC1328 INRA de Chartres, l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) UMR CNRS 7311 de l'Université d'Orléans, le laboratoire Biomolécules et Biotechnologies Végétales (BBV) EA2106 de l'Université de Tours et le Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) UPR 4301 du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) d'Orléans. Ce projet implique également quatre entreprises : l'entreprise BOTANICOSM'ETHIC basée à Neuville-aux-Bois (45), les laboratoires Sederma basés au Perray-en-Yvelines (78), les laboratoires Caudalie basés à Gidy (45) et le Comité de Développement Horticole de la Région Centre-Val-de-Loire (CDHRC) basé à Saint-Cyr-en-Val (45), un organisme regroupant des horticulteurs et des pépiniéristes de la Région Centre-Val de Loire ainsi qu'une station d'expérimentation de cultures ornementales possédant de nombreuses serres horticoles. Ce projet fonctionne selon une approche dite « circulaire » avec en point de départ un sourcing dit « naturel » basé sur la richesse de la biodiversité locale de la région et un sourcing dit « biotechnologique ». Vient ensuite l'identification de principes actifs grâce à la mise en place d'une plateforme de criblages biologiques avec l'appui de techniques d'objectivations et d'analyses moléculaires des bioactifs tout au long de la démarche. Ma thèse s'intègre à part entière dans cette approche circulaire et est à l'interface entre la mise en place des différents modes de culture, l'extraction, l'évaluation de l'activité de ces extraits et la corrélation des effets avec des analyses phytochimiques. Dans le cadre de ce projet, un peu moins d'une quinzaine de plantes ou leurs co-produits issus de la biodiversité de la région pouvant être d'intérêt pour la filière horticole ont été sélectionnées et étudiées.

L'objectif de cette thèse est de mettre en place des systèmes aéroponiques pour cultiver en serre et en continu une grande quantité de plantes dans des conditions de culture contrôlées afin d'orienter la bioproduction vers les bioactifs d'intérêts en contrôlant les paramètres de cultures, tels que le taux d'humidité ou la température, et l'éclairage notamment en utilisant des élicitations lumineuses par des lampes LED. Le but est alors d'évaluer l'intérêt d'une culture innovante étudiée dans le projet ValBioCosm' qui permet d'améliorer la production d'actifs d'intérêt concernant les activités anti-vieillesse avec un surcoût apporté à la culture qui pourra alors être justifié par une productivité spécifique et sélective.

Le mémoire de thèse présenté ici s'articulera autour de trois chapitres qui seront présentés comme suit :

Dans le **Chapitre I** nous présenterons tout d'abord les origines de l'utilisation des plantes suivi par un rapport bibliographique sur les principaux groupes des métabolites spécialisés des plantes, qui sont une ressource de molécules actives pour des utilisations en cosmétique. Nous nous intéresserons ensuite à décrire les différents modes de culture traditionnels et innovants mis en place dans ce projet, l'hydroponie passive, l'hydroponie active et la culture de cals et enfin nous nous focaliserons à présenter la plante modèle, qui a été étudiée dans le cadre de ces travaux de thèse, la grande bardane (*Arctium lappa* L.) avec une description phénotypique, une énumération de ces vertus médicinales, une présentation de sa signature phytochimique et quelques généralités.

Le **Chapitre II** sera consacré à la présentation des différentes méthodologies et protocoles mis en œuvre afin de répondre à la problématique de notre étude concernant l'évaluation de l'impact du mode de culture et de l'élicitation lumineuse sur le profil phytochimique et l'activité biologique de nos extraits issus d'une plante modèle, la grande bardane (*Arctium lappa* L.). Nous débuterons par une brève énumération des plantes étudiées dans le projet avant de nous focaliser sur la présentation des différentes méthodes de culture mises en place dans le cadre de cette thèse que sont la culture de cals, la culture en pot ou hydroponie passive et la culture aéroponique ou hydroponie active. Nous parlerons également du mode d'élicitation lumineuse qui a été mis en œuvre en remplacement ou en complément de la lumière naturelle dans ces trois méthodes de culture. Puis nous développerons la méthodologie d'extraction assistée par ultrasons qui a été appliquée pour l'ensemble de nos échantillons suivie par la stratégie métabolomique mise en place afin d'identifier des molécules pouvant montrer une activité biologique d'intérêt cosmétique. Cette stratégie utilisée comprend des analyses par chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse (UHPLC-ESI-QTOF-HRMS) ainsi que l'application d'approche ciblée sur deux molécules d'intérêt de la grande bardane que sont l'arctiine et l'arctigénine et d'approche non ciblée comme le recours à des études différentielles permettant de comparer les profils phytochimiques de nos extraits et de mettre en avant des molécules discriminantes. La fin de ce chapitre traitera des différents tests basés sur des allégations cosmétiques qui ont été réalisés. Nous nous sommes en premier lieu focalisés sur le stress oxydant avec la mise en œuvre d'un test cellulaire *in vitro* sur des cellules de kératinocytes et des tests d'activités antioxydantes *in tubo* tels que l'ABTS, le DPPH et le CUPRAC afin d'identifier les molécules antioxydantes présentes dans les extraits végétaux étudiés. Ces derniers ont été également investigués sur leur action vis-à-vis de trois cibles enzymatiques la tyrosinase, l'élastase et la collagénase qui sont impliquées dans les processus de vieillissement de la peau.

Le **Chapitre III** présentera dans un premier temps les résultats en termes d'activités biologiques *in tubo* des treize extraits de plantes sélectionnées par le consortium dans le projet, à l'aide de tests chimiques d'activité antioxydante et de tests d'activité vis-à-vis des enzymes tyrosinase, élastase et collagénase. Les résultats de ces tests nous ont permis de réaliser une sélection parmi les treize plantes sélectionnées au départ et de choisir la grande bardane comme plante modèle pour répondre à notre objectif d'étude de l'impact du mode de culture et de l'éllicitation lumineuse sur les activités biologiques de nos extraits. Par la suite, une première étude d'éllicitation lumineuse, avec plusieurs lumières d'éllicitation a été menée sur une culture *in vitro* de cals de bardane à l'échelle du laboratoire et des tests chimiques d'activité antioxydante ont été réalisés ainsi qu'un dosage des composés phénoliques totaux. Cette première étude a permis une première évaluation de l'impact de l'éllicitation lumineuse sur une méthode de culture innovante et biotechnologique. La suite du **Chapitre III**, divisée en deux parties, sera consacrée à l'étude de l'impact des différents modes de cultures de la grande bardane, notamment l'hydroponie passive et l'hydroponie active, soumis à différents modes d'éllicitations lumineuses sur la composition moléculaire des extraits de bardane. La Partie 1 sera focalisée sur l'activité anti-tyrosinase de nos différents extraits et sur l'évaluation de l'impact en termes d'activité biologique de l'éllicitation lumineuse et de la méthode de culture utilisée que cela soit la culture de cals, la culture en hydroponie passive ou la culture en hydroponie active. À l'issue de ces tests d'activités nous appliquerons des études différentielles afin de mettre en évidence des molécules discriminantes que nous chercherons à identifier à l'aide de base de données. La Partie 2 traitera de l'impact de l'éllicitation lumineuse sur l'activité antioxydante des extraits de bardane cultivée en hydroponie active. Dans cette partie nous réaliserons l'ensemble des tests d'activités antioxydantes *in tubo* mis en œuvre précédemment l'ABTS, le DPPH et le CUPRAC, mais aussi des tests de criblage cellulaire *in vitro* sur des cellules de kératinocytes permettant de montrer un effet de protection contre les ROS. Les résultats de ces tests de criblages cellulaires ainsi que les études différentielles permettront d'identifier des molécules d'intérêt potentiellement responsables de cette capacité de protection antioxydante.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont été réalisés en collaboration avec le Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) UPR 4301 du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) d'Orléans au sein duquel ont été menés notamment les tests de criblage cellulaire *in vitro* sur des cellules de kératinocytes pour la détermination *in cellulo* de l'activité antioxydante et avec le laboratoire Biomolécules et Biotechnologies Végétales (BBV) EA2106 de l'Université de Tours qui ont poursuivi la mise en place de la culture *in vitro* de cals de bardane étudiée dans la Partie 1 sur l'activité anti-tyrosinase après initiation de la culture au Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC).

Pour conclure, les recherches présentées dans ce mémoire de thèse s'inscrivent dans une démarche de prospection de nouveaux modes de culture pour orienter la bioproduction vers des bioactifs d'intérêt afin de prévenir ou d'atténuer le vieillissement de la peau. Ces recherches entrent en plein dans la valorisation et le maintien de la biodiversité locale en région Centre-Val de Loire par l'utilisation de plantes locales et de cultures cellulaires ciblées comme source naturelle d'extraits et/ou de molécules dont la bioactivité est d'intérêt pour l'industrie cosmétique.

Nos travaux ont consisté à optimiser le sourcing, tant sur l'utilisation des méthodes en sol et hors sol comme l'hydroponie passive et l'hydroponie active, que sur le développement et l'optimisation des méthodes biotechnologiques avec les cals et les suspensions cellulaires, et ce avec ou sans élicitation lumineuse. Des approches analytiques non ciblées robustes et efficaces ont alors permis de mieux appréhender l'impact des conditions de culture sur le contenu métabolique des plantes et ainsi d'estimer le procédé de culture le plus pertinent en ce qui concerne la production ciblée de molécules d'intérêt pour un effet anti-âge. Nous ferons un bilan de cette preuve de concept autour d'une plante sur l'apport, et donc les avantages mais aussi sur les limitations et difficultés de ce type d'étude à travers la présentation des différents outils, unique et circulaire, mis en avant dans cette thèse et à l'interface de compétences de biologie du végétale et de chimie analytique.



# Chapitre I: Évaluation de l'apport de méthodes de culture innovantes sur une plante locale dans le domaine de la cosmétique







# Table des matières

<b>CHAPITRE I: ÉVALUATION DE L'APPORT DE METHODES DE CULTURE INNOVANTES SUR UNE PLANTE LOCALE DANS LE DOMAINE DE LA COSMETIQUE .....</b>	<b>7</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>8</b>
<b>1 LES ORIGINES DE L'UTILISATION DES PLANTES .....</b>	<b>10</b>
<b>2 LES METABOLITES PRIMAIRES ET SPECIALISES DES PLANTES.....</b>	<b>12</b>
2.1 Les terpénoïdes .....	14
2.1.1 Introduction .....	14
2.1.2 Structure générale et classification.....	14
2.1.1 Fonction des terpénoïdes chez les plantes .....	17
2.1.1.1 Fonctions métaboliques primaires .....	17
2.1.1.2 Fonctions métaboliques secondaires.....	17
2.2 Les composés phénoliques.....	17
2.2.1 Introduction .....	17
2.2.2 Classification.....	17
2.2.3 Les lignanes .....	23
2.2.3.1 Définition .....	23
2.2.3.2 Structure chimique et classification.....	23
2.2.3.3 Biosynthèse des lignanes .....	24
2.2.3.4 Intérêt cosmétique et pharmacologique des lignanes .....	25
2.2.4 Les flavonoïdes.....	25
2.2.4.1 Définition .....	25
2.2.4.2 Structure chimique et classification.....	25
2.2.4.3 Biosynthèse des flavonoïdes.....	26
2.2.4.4 Intérêt cosmétique et pharmacologique des flavonoïdes .....	27
2.2.5 Les coumarines.....	27
2.2.5.1 Définition .....	27
2.2.5.2 Structure chimique et classification.....	27
2.2.5.1 Biosynthèse des coumarines.....	29
2.2.5.2 Intérêt cosmétique et pharmacologique des coumarines.....	29
2.2.6 Les stilbènes .....	30
2.2.6.1 Définition .....	30
2.2.6.2 Structure chimique et classification.....	30

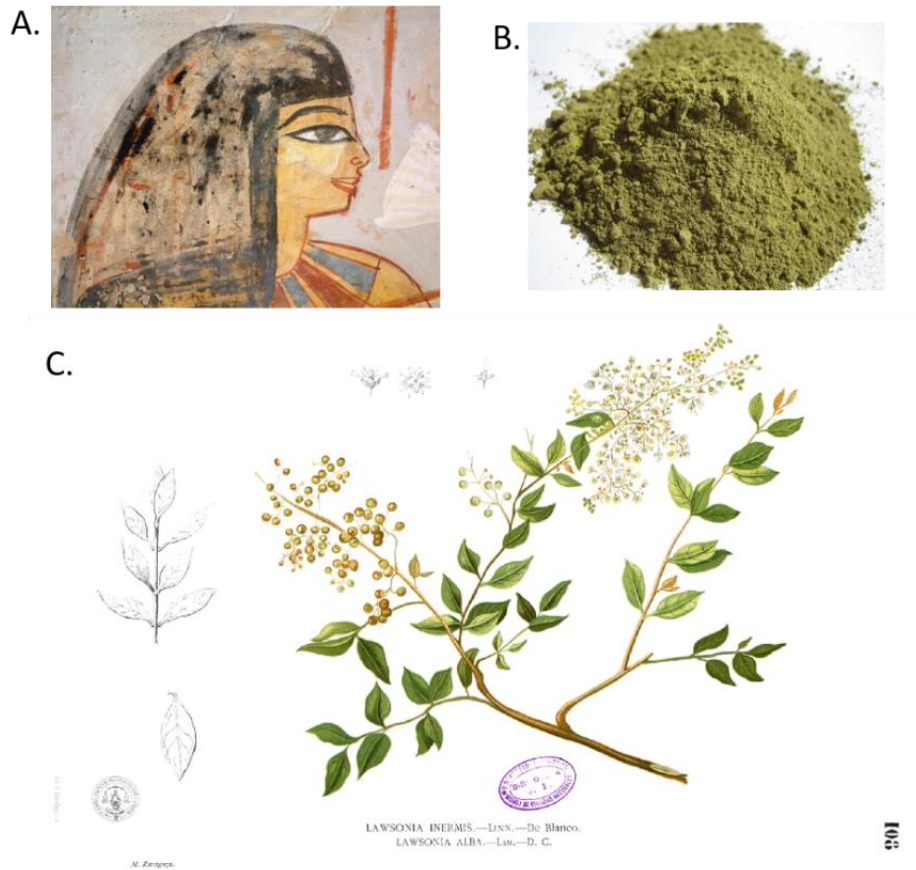
2.2.6.3 Biosynthèse des stilbènes .....	31
2.2.6.4 Intérêt cosmétique et pharmacologique des stilbènes .....	32
2.3 Les alcaloïdes.....	32
2.3.1 Définition.....	32
2.3.1.1 Les alcaloïdes vrais.....	33
2.3.1.2 Les proto-alcaloïdes .....	33
2.3.1.3 Les pseudo-alcaloïdes .....	34
2.3.2 Classification par structure des alcaloïdes .....	34
2.3.3 Origine biosynthétique des alcaloïdes .....	35
2.3.4 Localisation des alcaloïdes .....	35
2.3.5 Fonctions des alcaloïdes .....	36
2.3.6 Propriétés physicochimiques des alcaloïdes.....	36
2.3.7 Usage cosmétique et pharmacologique des alcaloïdes .....	36
<b>3 DIVERSITE D'ACCUMULATION DES METABOLITES SPECIALISES .....</b>	<b>37</b>
<b>4 LES DIFFERENTS MODES DE CULTURE .....</b>	<b>38</b>
4.1 La culture classique .....	41
4.2 La culture aéroponique .....	41
4.3 L'élicitation lumineuse .....	44
<b>5 LA GRANDE BARDANE (<i>ARCTIUM LAPPA</i> L.) .....</b>	<b>47</b>
5.1 Localisation.....	47
5.2 Description phénotypique et généralités.....	47
5.3 Vertus médicinales .....	49
5.4 Signature phytochimique .....	50
<b>6 OBJECTIFS .....</b>	<b>54</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>55</b>

*Dans ce chapitre seront présentés les principaux groupes de métabolites spécialisés des plantes, ressource de molécules actives pour des applications cosmétiques. Puis, nous nous focaliserons sur les différents modes de culture traditionnels et innovants mis en place dans ce projet et sur la plante modèle étudiée, la grande bardane (Arctium lappa L.).*

## **1 Les origines de l'utilisation des plantes**

De tout temps, l'Homme a entretenu une relation particulière et privilégiée avec le monde végétal qui l'entourait. Il s'est d'abord servi de ces innombrables plantes pour se loger, pour se chauffer et surtout pour se nourrir. Puis il a pu découvrir les nombreux atouts de l'utilisation de ces plantes pour se guérir puis plus tard pour s'embellir. On suppose que déjà l'Homme de Néandertal connaissait les bienfaits pour la santé que pouvaient apporter les plantes. En effet la présence d'ADN de peuplier, un arbre faisant parti des sources de l'acide salicylique, qui est un antidouleur naturel et la base du principe actif de l'aspirine a pu être mis en évidence dans un échantillon de tartre dentaire d'un homme de Néandertal retrouvé dans la grotte d'El Sidrón en Espagne (Hardy et *al.* 2012, Weyrich et *al.* 2017). Le premier document médical connu est une tablette d'argile sumérienne vieille de 4000 ans qui répertorie des remèdes à base de plantes pour différentes maladies (Farag et *al.* 2015).

L'utilisation de cosmétiques remonte quant à elle à l'Égypte antique, il y a environ 3000 ans avant J.-C.. Les Égyptiens utilisaient des produits cosmétiques pour le bien-être physique et spirituel. En effet ils utilisaient notamment du *kohl*, un composé d'antimoine de couleur noire utilisé comme fard à paupières (**Figure I-1.A**), du henné, extrait des feuilles d'un arbuste à fleurs d'Afrique du nord, *Lawsonia inermis*, comme colorant capillaire (**Figure I-1.B** et **Figure I-1.C**), ainsi que de nombreux parfums et huiles aussi utilisés pour les rituels religieux et particulièrement l'embaumement des morts (Parish et Crissey 1988, Chaudhri et Jain 2009).



**Figure I-1 :** (A) Extrait d'une peinture murale représentant une égyptienne portant du kohl, Musée du Louvre (<https://collections.louvre.fr/ark:/53355/cl010036097>), (B) Photographie d'une poudre de henné et (C) Planche botanique de *Lawsonia inermis*, adaptation de Blanco 1880-1883

Depuis de nombreuses années, nous pouvons assister à l'émergence d'une préférence des consommateurs pour les produits cosmétiques naturels à base d'extraits ou d'actifs de plantes et notamment de plantes locales. Ces préférences sont en grande partie dues aux préoccupations environnementales qui sont de plus en plus importantes mais aussi à la crainte d'utiliser des molécules de synthèse parfois nocives pour la santé du consommateur et l'environnement. La recherche de nouveaux actifs pour l'industrie cosmétique est alors un réel défi pour les industriels de plus que de nombreuses réglementations encadrent l'utilisation de produits naturels en cosmétique. On peut notamment retrouver le Protocole de Nagoya sur l'accès et le partage des avantages (APA), un accord international sur la biodiversité entré en vigueur en 2014 qui a pour but le partage juste et équitable des avantages pouvant provenir de l'utilisation des ressources génétiques dans un but de recherche ou dans un but commercial. Depuis 2003, une liste regroupant tous les ingrédients approuvés pour leur utilisation en cosmétique sur le marché chinois a été publiée par l'Office chinois de contrôle des médicaments et des produits alimentaires (China Food and Drug Administration, CFDA). Cette liste appelée Inventaire des Ingrédients Cosmétiques Existants en Chine (Inventory of Existing Cosmetic Ingredients in China, IECIC) mise à jour en 2015 contient 8783 ingrédients (Industries Cosmétiques 2016).

Notre projet de recherche s'intègre parfaitement dans cette motivation. Nous présenterons brièvement dans ce chapitre les sources naturelles d'actifs pour l'industrie cosmétique suivies de la description d'une plante et de son patrimoine moléculaire d'intérêt cosmétique avant de présenter les différents moyens de culture traditionnels et innovants pouvant produire de potentiels actifs. Pour cela, nous résumerons les principaux aspects et connaissances actuelles sur les mécanismes mis en jeu lors d'une culture en aéroponie et une élicitation destinée à induire une réaction de défense de la plante dont peut faire partie la production de composés de défense susceptibles d'être utilisés comme actifs cosmétiques. L'objectif de ce chapitre vise à introduire le contexte de notre projet sur la comparaison des signatures phytochimiques des différents modes de culture sur une plante modèle, la grande bardane (*Arctium lappa* L.) et l'identification de ses potentiels actifs par spectrométrie de masse pour mieux comprendre les mécanismes de stress mis en jeu lors d'une élicitation lumineuse chez certaines plantes à travers l'identification de métabolites spécialisés induits. Par conséquent la mise en place d'une approche métabolomique semble présenter des atouts incontestables afin d'identifier les natures des variations phytochimiques. Ces dernières seront associées à un criblage d'activité permettant de faire des corrélations entre l'activité et le patrimoine moléculaire.

## 2 Les métabolites primaires et spécialisés des plantes

La diversité moléculaire des plantes fait d'elles des ingrédients de choix dans les formules cosmétiques que cela soit en tant qu'actifs, gélifiants, émulsifiants, huiles ou tensioactifs naturels. L'ensemble des molécules des plantes se divise en deux groupes : les métabolites dits primaires et les métabolites dits spécialisés. Les métabolites primaires comprenant notamment les lipides, les glucides, les acides nucléiques et aminés interviennent dans la croissance de la plante et font partis des voies métaboliques nécessaires à son développement. Le rôle des métabolites spécialisés, encore appelés métabolites secondaires, reste quant à lui mal connu mais les mécanismes d'adaptation et de défense de la plante leur sont souvent attribués. Alors que les métabolites primaires sont universels et accumulés de façon constitutive dans les cellules végétales, les métabolites spécialisés sont quant à eux exprimés uniquement dans certaines espèces, dans des organes particuliers, à un stade de développement donné ou sous des conditions environnementales spécifiques. Cette différenciation entre ces deux types de métabolites a été décrite pour la première fois à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, en 1891, par Albrecht Kossel biochimiste allemand qui reçut le prix Nobel de Physiologie et Médecine en 1910 pour ses travaux sur la composition chimique des acides nucléiques. On considère que l'étude des métabolites spécialisés de plantes n'a réellement débuté qu'en 1806 avec l'isolement de la morphine du pavot somnifère ou pavot à opium *Papaver somniferum* (Figure I-2) dont la découverte a été publiée

pour la première fois par Friedrich Wilhelm Adam Sertürner, un pharmacien allemand (Hartmann 2007).

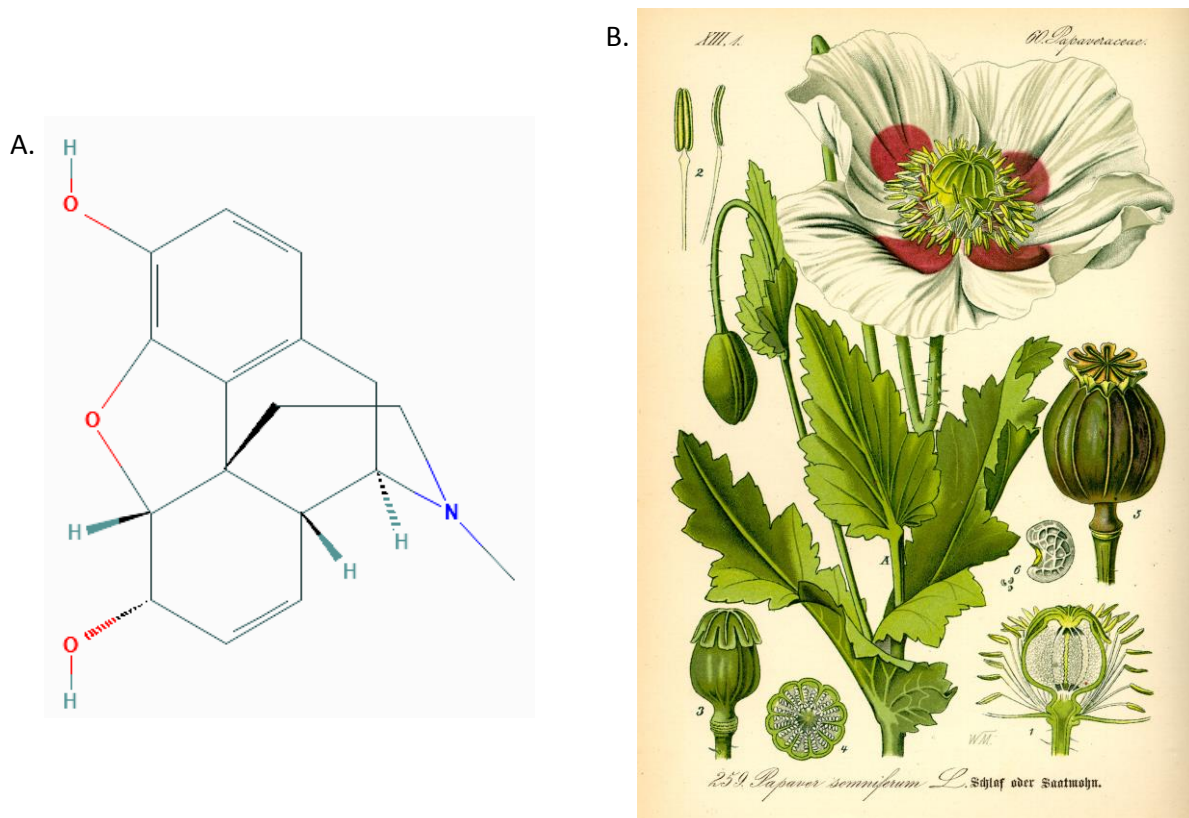


Figure I-2 : (A) Molécule de morphine et (B) Planche botanique de Papaver somniferum L., Thomé 1885

Les métabolites spécialisés se divisent en trois groupes (Figure I-3) : les terpénoïdes, les composés aromatiques phénoliques et les composés azotés ou alcaloïdes (Bruneton 1993).

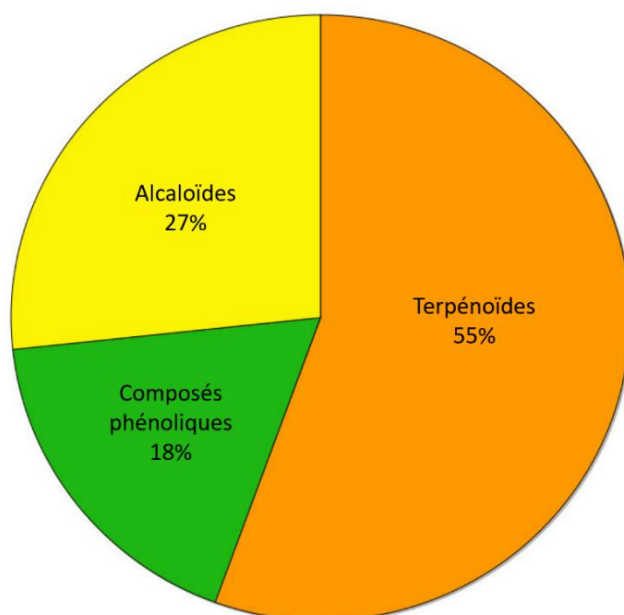


Figure I-3 : Diagramme circulaire représentant les principaux groupes de métabolites spécialisés d'après Croteau et al. 2000, adaptation de Zwenger et Basu 2008

Dans le contexte de ce projet de recherche, la ressource de molécules actives pour des applications cosmétiques se trouve plus particulièrement au sein des métabolites spécialisés. C'est pourquoi nous présenterons brièvement leurs principaux groupes, leurs chimies, leurs origines, leurs rôles et leurs applications.

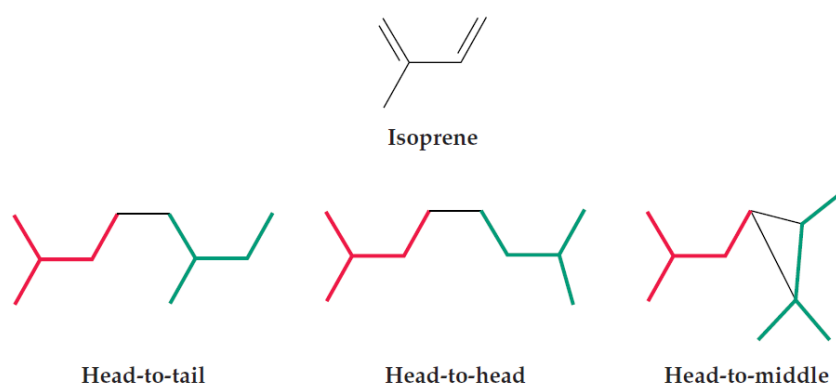
## 2.1 Les terpénoïdes

### 2.1.1 Introduction

Les terpénoïdes constituent la famille de produits naturels la plus diverse que cela soit au niveau structurel, stéréochimique et fonctionnel. Alors que certains terpénoïdes exercent des fonctions métaboliques primaires essentielles chez de nombreux organismes pour la croissance et la reproduction, la majorité fonctionne comme des métabolites spécialisés et contribue à l'adaptation des espèces à leur niche écologique. En effet de nombreux terpénoïdes produits dans les parties végétatives, les fleurs ou les racines de la plante jouent un rôle important dans les interactions plante-plante, plante-insecte ou encore plante-pathogène.

### 2.1.2 Structure générale et classification

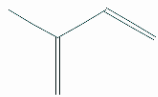
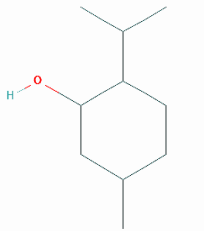
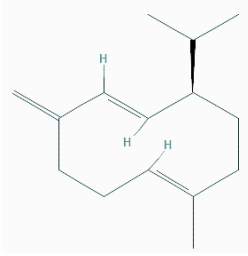
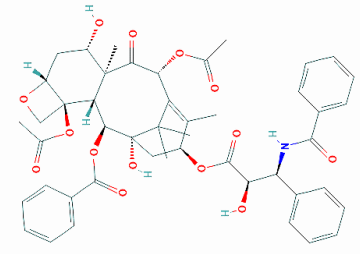
La structure carbonée de base des terpénoïdes est constituée d'un assemblage d'un nombre variable d'unités 2-méthylbutane aussi appelées unités isoprène – C5 (**Figure I-4**). Ces assemblages peuvent être modifiés par ajout ou soustraction de groupes méthyles ou ajout d'atomes d'oxygène. La diversité chimique des terpénoïdes végétaux provient alors de la complexité de leurs voies de biosynthèse.



**Figure I-4** : Unité isoprène et les différents types de liaison utilisées pour la formation des terpénoïdes, adaptation de Croteau et al. 2000

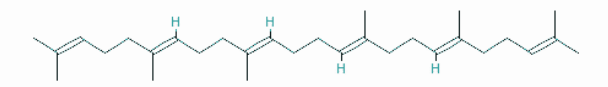
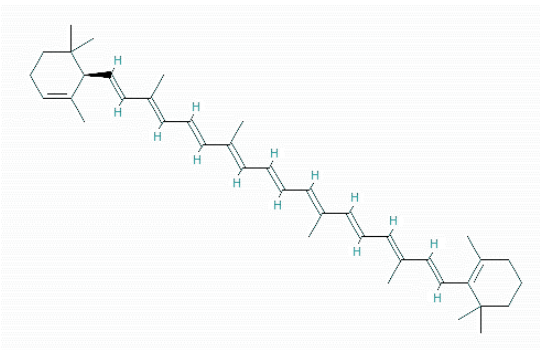
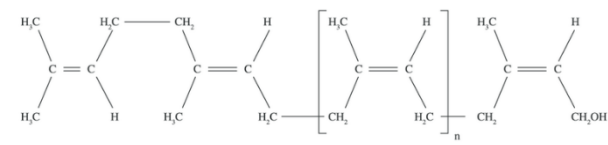
Les terpénoïdes sont classés selon le nombre d'unités isoprène contenu dans leur structure de base comme illustré par le **Tableau I-1**. Ils peuvent également être classés selon le nombre de structures cycliques qu'ils contiennent (cyclique, monocyclique, bicyclique) et l'arrangement des cycles (labdanes par exemple).

Tableau I-1 : Classification des terpénoïdes

Classe	Formule brute	Nombre d'unité isoprène	Exemple de molécule	Exemple de propriété	Exemple de plante	Référence bibliographique
Hémiterpènes	$C_5H_8$	1	Isoprène 	Protège les feuilles de la chaleur lorsqu'il est émis	Tremble ( <i>Populus tremula</i> )	Sharkey et Singsaas 1995
Monoterpènes	$C_{10}H_{16}$	2	Menthol 	Utilisé en pharmacie dans des formulations antiseptique et antiprurigineuse	Menthe poivrée ( <i>Mentha piperita</i> )	Galeotti et al. 2002
Sesquiterpènes	$C_{15}H_{24}$	3	Germacrène 	Insecticide contre les moustiques et répulsif contre les pucerons et les tiques	Copal ( <i>Bursera excelsa</i> )	Noge et Becerra 2009
Diterpènes	$C_{20}H_{32}$	4	Paclitaxel 	Agent anticancéreux	If de l'Ouest ou If du pacifique ( <i>Taxus brevifolia</i> )	Spencer et Faulds 1994



Suite **Tableau I-1**

Classe	Formule brute	Nombre d'unité isoprène	Exemple de molécule	Exemple de propriété	Exemple de plante	Référence bibliographique
Triterpènes	$C_{30}H_{48}$	6	 <p>Squalène</p>	Réduit l'apparence des rides	Amaranthes ( <i>Amaranthus sp.</i> )	Wołosik et al. 2013
Tétraterpènes	$C_{40}H_{64}$	8	<p><math>\alpha</math> – Carotène</p> 	Associé à une diminution des risques de mortalité liés notamment aux maladies cardiovasculaires et aux cancers	Carotte commune ( <i>Daucus carota subsp. sativus</i> )	Li et al. 2011
Polyterpènes	$(C_5H_8)_n$ avec n le nombre d'unité isoprène	Plus de 8	<p>Caoutchouc naturel</p> 	Utilisé dans la fabrication d'articles souples rigide et fins	Hévéa ( <i>Hevea brasiliensis</i> )	Janin 2017

### 2.1.1 Fonction des terpénoïdes chez les plantes

#### 2.1.1.1 Fonctions métaboliques primaires

De nombreux terpénoïdes jouent un rôle au sein du métabolisme primaire par exemple en tant qu'hormones comme les gibbérellines, des diterpènes, ou l'acide abscissique, un sesquiterpène, mais aussi en tant que porteur d'électron tel que la plastoquinone ou l'ubiquinone, ou en tant que composant structurel des membranes comme les phytostérols, des dérivés de terpènes.

#### 2.1.1.2 Fonctions métaboliques secondaires

On peut retrouver parmi les monoterpènes les plus connus le géraniol, le linalol ou encore le myrcène, qui font partis de nombreuses huiles essentielles mais aussi les pyréthrinines. Au sein de la plante ce type de molécule permet d'attirer les insectes pollinisateurs mais aussi d'éloigner les potentiels prédateurs. Certaines de ces molécules et notamment les pyréthrinines font aujourd'hui parties de la composition d'insecticides. On peut aussi trouver le paclitaxel, un diterpène extrait de l'écorce de l'If de l'Ouest aussi appelé If du pacifique, *Taxus brevifolia*, découvert dans les années 70 et qui est utilisé dans de nombreux protocoles de chimiothérapie dans le traitement de cancers. Quant aux tétraterpènes, les principaux sont les caroténoïdes, une famille de pigments de couleur rouge-orange-jaune qui ont également un rôle au sein du métabolisme primaire de par leur implication dans la photosynthèse.

Après avoir brièvement présenté le vaste groupe des terpénoïdes nous allons maintenant nous focaliser sur un autre groupe très important, celui des composés phénoliques.

## 2.2 Les composés phénoliques

### 2.2.1 Introduction

Les composés phénoliques représentent environ 40% du carbone organique circulant dans la biosphère, l'ensemble des organismes vivants et leurs milieux de vie donc la totalité des écosystèmes présents sur la Terre (Croteau et *al.* 2000). Les composés phénoliques sont généralement décrits comme des métabolites aromatiques qui possèdent un ou plusieurs groupement hydroxyle relié à un noyau phényl. Parmi les composés phénoliques on retrouve les lignines, les lignanes, les flavonoïdes, les coumarines et les stilbènes.

### 2.2.2 Classification

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atomes de carbones présents dans leur structure chimique de base (**Tableau I-2**). Ils dérivent principalement de la voie de biosynthèse du shikimate puis de celle des phénylpropanoïdes qui a pour point de départ la phénylalanine et la

tyrosine mais aussi pour certains de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes-acétate (Figure I-5). L'essentiel des composés phénoliques endosse un rôle dans la structure de la paroi cellulaire mais une large gamme de composés phénoliques non structuraux est aussi formée avec divers rôles dans la défense de la plante, la couleur des fleurs, leurs parfums et leurs saveurs. En effet, en réponse à des stress notamment environnementaux des composés phénoliques seront accumulés dans les tissus de la plante sous l'action d'enzymes telles que la phénylalanine ammonia lyase (PAL) ou la chalcone synthase (CHS). L'activité d'autres enzymes sera aussi augmentée en réponse à un stress comme celle de la phosphoénolpyruvate carboxylase mettant en évidence un basculement de la production de saccharose vers les processus de défense et de réparation (Naikoo et al. 2019).

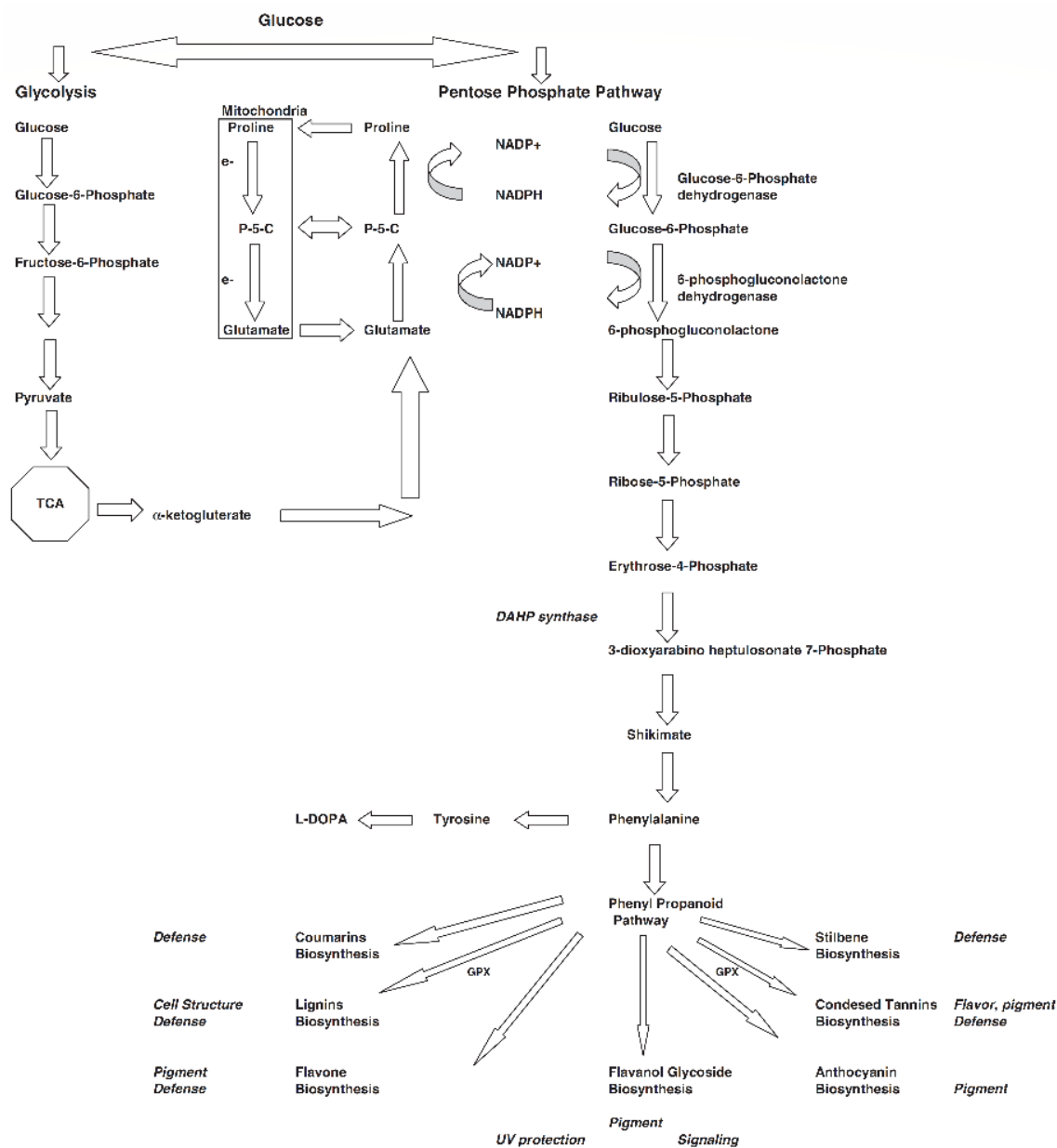
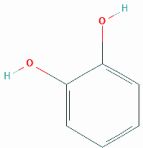
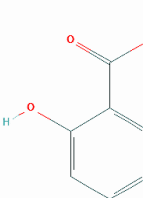
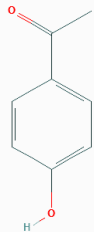
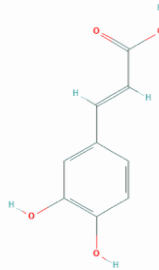


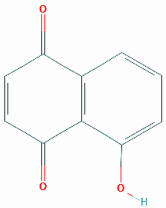
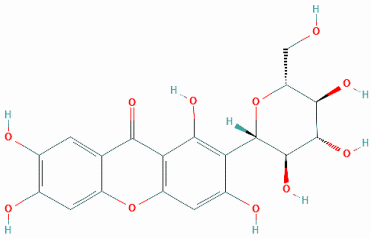
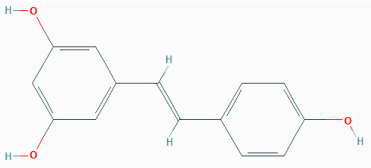
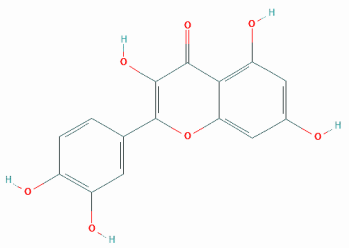
Figure I-5 : Biosynthèse des composés phénoliques au sein des voies du pentose phosphate, du shikimate et des phénylpropanoïdes chez les plantes, Vatter et al. 2005

Le Tableau I-2 illustre avec quelques exemples de structures cette classification.

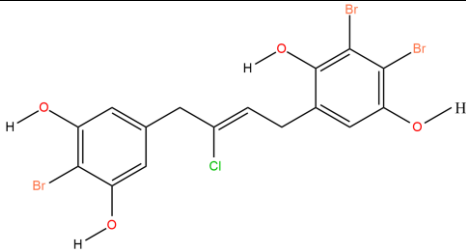
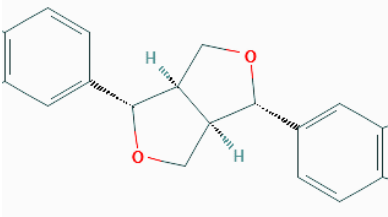
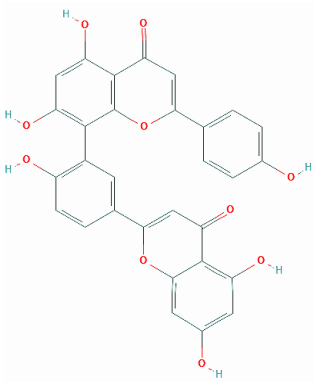
Tableau I-2 : Classification des composés phénoliques

Nombre d'atome de carbone	Formule brute	Classe	Exemple de molécule	Exemple de propriété	Exemple de plante	Référence bibliographique
6	C <sub>6</sub>	Phénol simple, Benzoquinone	Catéchol		Résistance des plants de tomate contre un champignon du genre <i>Fusarium</i>	Bois pissenlit ( <i>Tecomastans</i> ) Retig et Chet 1974
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acide phénolique, Aldéhydes	Acide salicylique		Impliqué dans les réactions de défense aux sites d'infection notamment dû au virus de la mosaïque du tabac	Saule (genre <i>Salix</i> ) Durner et al. 1997
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acétophénone, dérivé de tyrosine et Acide phénylacétique	<i>p</i> -Hydroxyacétophénone		Activité cholérétique, utilisé dans le traitement des ictères en médecine traditionnelle chinoise	Absinthe orientale ( <i>Artemisiae scopariae</i> ) Liu et Ye 1991
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acide hydroxycinnamique, Phénylpropène, Coumarine, Isocoumarine, Chromone	Acide caféique		Inhibition de l'oxydation lipidique lors de tests de stabilité	Tournesol ( <i>Helianthus annuus</i> ) Chen et Ho 1997

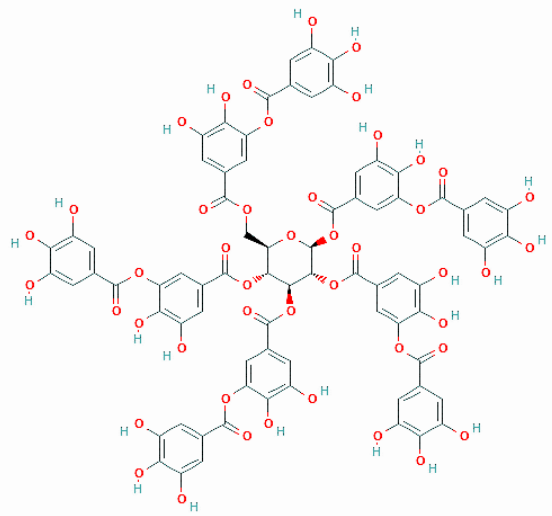
Suite **Tableau I-2**

Nombre d'atome de carbone	Formule brute	Classe	Exemple de molécule	Exemple de propriété	Exemple de plante	Référence bibliographique
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphthoquinone	Juglone 	Activité antifongique contre certaines levures comme <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Noyer noir ( <i>Juglans nigra</i> )	Clark et <i>al.</i> 1990
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthonoïde	Mangiférine 	Activité antidiabétique en diminuant la résistance à l'insuline	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	Miura et <i>al.</i> 2001
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbéoïde, Anthraquinone	Resvératrol 	Nombreux effets bénéfiques sur les maladies cardiovasculaires	Raisin de la vigne cultivée ( <i>Vitis vinifera</i> )	Delmas et <i>al.</i> 2005
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Chalconoïde, Flavonoïde, Isoflavonoïde, Néoflavonoïde	Quercétine 	Utilisé dans le traitement contre les allergies grâce à son efficacité de suppression de l'inflammation éosinophilique	<i>Dimorphandra mollis</i>	Rogerio et <i>al.</i> 2007

Suite **Tableau I-2**

Nombre d'atome de carbone	Formule brute	Classe	Exemple de molécule	Exemple de propriété	Exemple de plante	Référence bibliographique
16	$C_6-C_4-C_6$	Composé phénolique halogéné	 <p>Klaviol A</p>	Inhibition de plusieurs isoformes d'histone désacétylase	Algue vert ( <i>Boodlea sp.</i> )	Simmons 2008
18	$(C_6-C_3)_2$	Lignane, Néolignane	 <p>Sésamine</p>	Effets antinociceptif et anti-inflammatoire	Sésame ( <i>Sesamum indicum</i> )	Monteiro et al. 2014
30	$(C_6-C_3-C_6)_2$	Biflavonoïde	 <p>Amentoflavone</p>	Propriétés anti-inflammatoire et analgésique	Ginkgo ( <i>Ginkgo biloba</i> )	Kim et al. 1998

Suite **Tableau I-2**

Nombre d'atome de carbone	Formule brute	Classe	Exemple de molécule	Exemple de propriété	Exemple de plante	Référence bibliographique
Plusieurs	(C6)n, (C6-C3)n, (C6-C3-C6)n	Lignine, protéine polyphénolique, polyphénol	 <p>Acide tannique</p>	Antioxydant efficace qui peut être utilisé comme agent de conservation naturel ou comme nutraceutique	Poire, fruits du poirier commun ( <i>Pyrus communis</i> )	Gülçin et <i>al.</i> 2010

Après avoir donné dans le tableau ci-dessus quelques exemples de cette classification des composés phénoliques, nous nous intéresserons maintenant plus en détail aux classes de composés phénoliques d'intérêts pour notre projet de recherche que sont les lignanes, les flavonoïdes, les coumarines et les stilbènes.

## 2.2.3 Les lignanes

### 2.2.3.1 Définition

Les lignanes sont des molécules naturelles présentes dans environ soixante-dix familles de végétaux. Chez les Angiospermes, les lignanes sont rencontrés dans l'ensemble des tissus que cela soit les racines, le bois, les feuilles, les fleurs, les fruits ou les graines. En revanche, chez les Gymnospermes ils sont principalement identifiés dans le bois. Certains lignanes ont pu être caractérisés chez les mammifères et résultent de la dégradation par la flore intestinale de lignanes présents dans l'alimentation végétale.

### 2.2.3.2 Structure chimique et classification

Les lignanes dérivent de l'acide aminé essentiel L-phénylalanine. Ce sont des dimères de phénylpropanes liés par leur carbone C8. Il existe une grande variété de lignanes qui diffère par le mode d'incorporation des atomes d'oxygène et le mode de cyclisation de la molécule elle-même. C'est d'après cette diversité structurale que les lignanes ont été classés en 8 sous-groupes par Whiting en 1985 (Whiting, 1985) (Figure I-6).

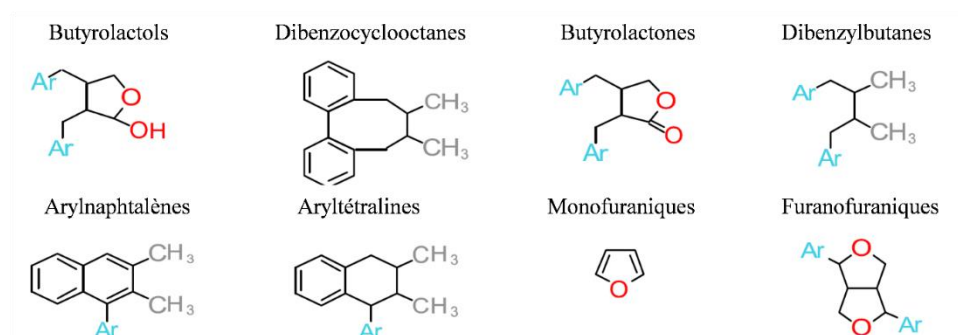


Figure I-6 : Les différents sous-groupes structuraux des lignanes, adaptation de Rodríguez-García et al. 2019

Chez les lignanes, on peut également observer une diversité énantiomérique. Spontanément dans la nature les lignanes sont retrouvés sous forme d'un seul énantiomère ou sous la forme d'un mélange des deux énantiomères en proportion variable. Le type d'énantiomère retrouvé dépend non seulement de la plante mais aussi de sa localisation au sein de la plante elle-même. Par exemple, le sécoisolaricirésinol (Figure I-7) est retrouvé exclusivement sous sa forme lévogyre (-) chez les plantes du genre *Forsythia* tandis que chez les plantes du genre *Phyllanthus* il est retrouvé à 98% sous sa forme dextrogyre (+) (Umezawa, 2003).

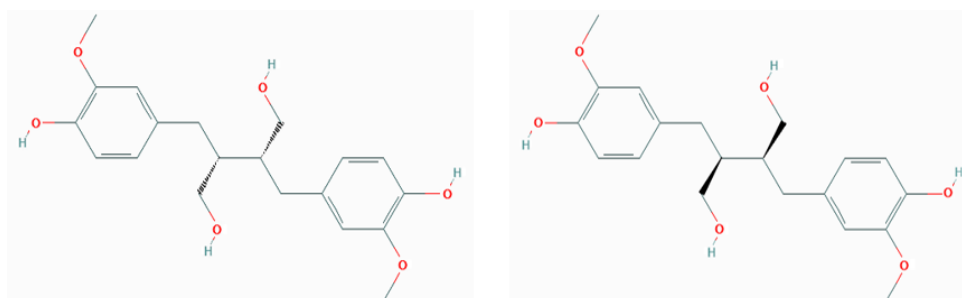
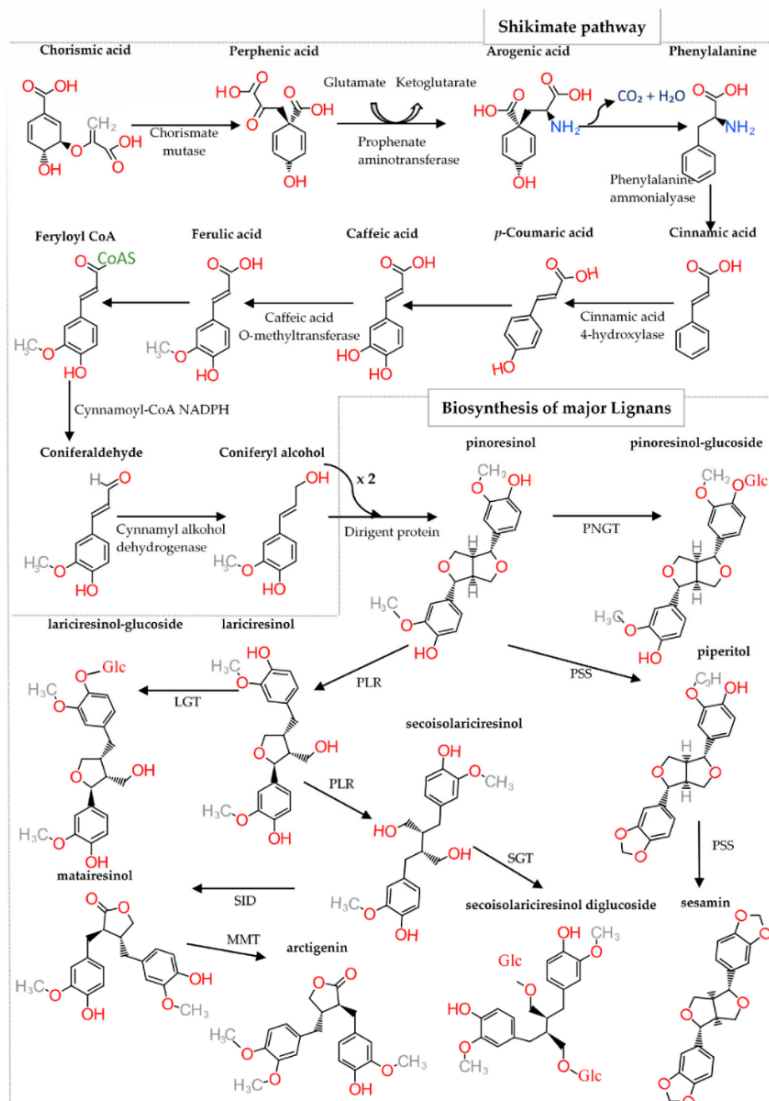


Figure I-7 : Structures du sécoisolaricirésinol sous sa forme lévogyre (-) (à gauche) et dextrogyre (+) (à droite)





**Figure I-8 :** Voie de biosynthèse des principaux lignanes, Rodríguez-García et al. 2019. PNGT : pinoresinol glucosyltransferase, PSS : piperitol/sesamin synthase, PLR : pinoresinol/lariciresinol reductase, LGT : lariciresinol glycosyltransferase, SGT : secoisolariciresinol glycosyltransferase, SID : secoisolariciresinol deshydrogenase, MMT : matairesinol O-methyltransferase, Glc : glucoside

### 2.2.3.4 Intérêt cosmétique et pharmacologique des lignanes

Parmi les lignanes on retrouve le plus connu, la podophyllotoxine. Sa source traditionnelle est une plante en voie de disparition originaire d'Asie plus précisément d'une zone regroupant l'Afghanistan, le Pakistan, le Bhoutan, le Népal, le nord de l'Inde et l'est de la Chine, *Podophyllum hexandrum* ou *Podophyllum emodi*. Ce lignane possède une importante activité de toxicité cellulaire qui est à l'origine de son utilisation en chimiothérapie anticancéreuse sous la forme de dérivés hémi-synthétiques, notamment l'étoposide commercialisé dès 1983 aux États-Unis. De nombreux lignanes possèdent également des propriétés anti-virales, insecticides, anti-fongiques ou anti-bactériennes (Canel et *al.* 2000, Corbin 2015). Certains lignanes sont aussi utilisés comme ingrédient dans la composition de produits cosmétiques grâce à leur activité anti-âge, comme l'arctigénine et sa forme glucoside l'arctiine extraits en particulier de la grande bardane (*Arctium lappa* L.) et utilisés pour leur activité de blanchiment de la peau grâce à leur action anti-tyrosinase (Lee et *al.* 2010).

## 2.2.4 Les flavonoïdes

### 2.2.4.1 Définition

Les flavonoïdes représentent le plus large groupe de composés phénoliques, ils sont les plus étudiés et sont largement retrouvés dans les fruits, les légumes, le thé, le cacao et le vin. Les flavonoïdes sont associés à un large éventail d'effets bénéfiques sur la santé, ils sont des composants indispensables dans une variété d'applications nutraceutique, pharmaceutique, médicale et cosmétique.

### 2.2.4.2 Structure chimique et classification

Les flavonoïdes se divisent en plusieurs sous-groupes en fonction du carbone de l'anneau C sur lequel l'anneau B est attaché et selon le degré d'insaturation et d'oxydation de l'anneau C (Figure I-9).

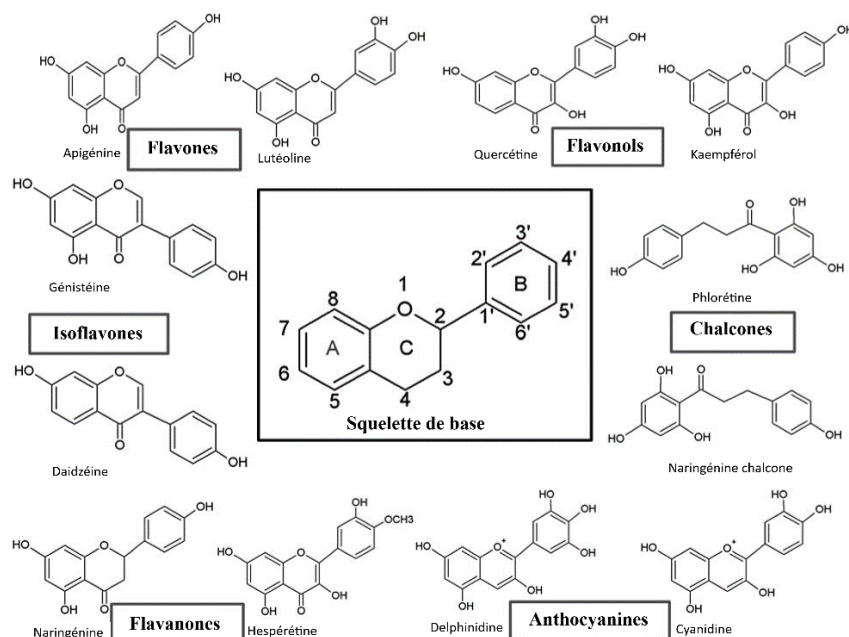
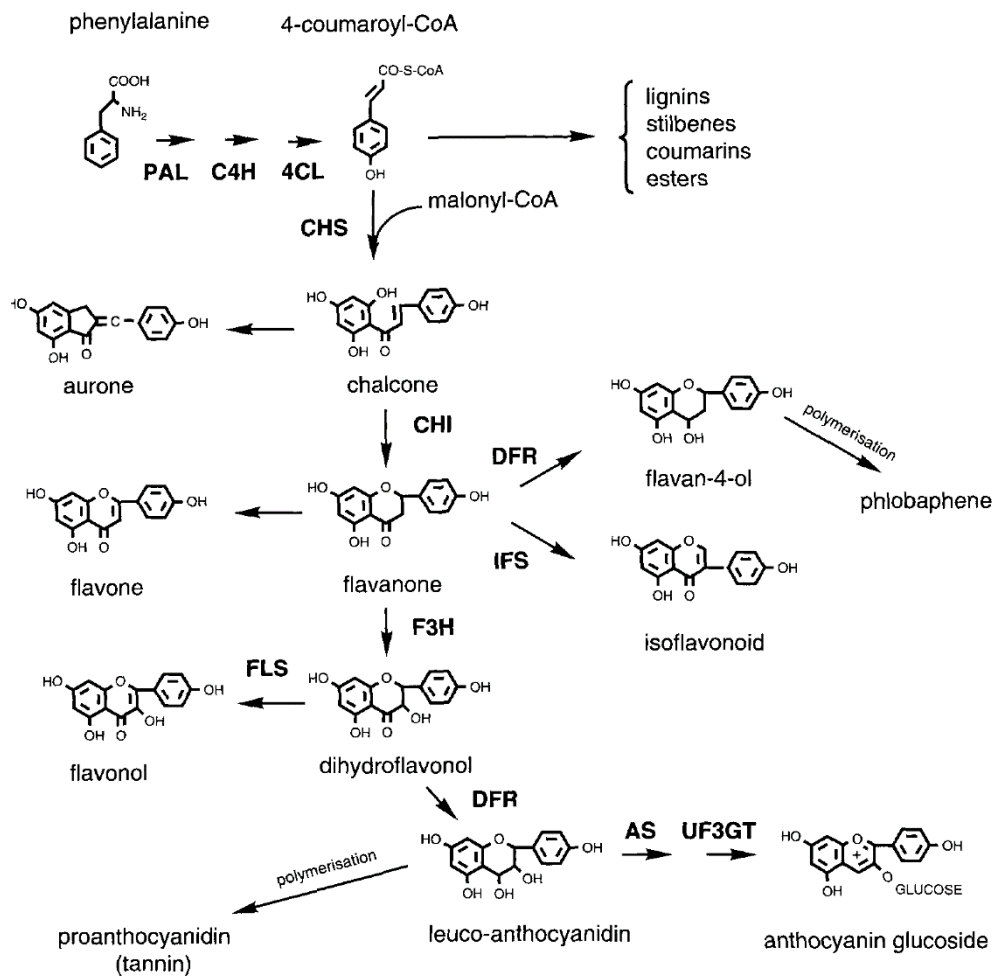


Figure I-9 : Squelette de base des flavonoïdes et les différents sous-groupes, adaptation de Panche et al. 2016

### 2.2.4.3 Biosynthèse des flavonoïdes

La synthèse des flavonoïdes débute par la condensation d'une molécule de *p*-coumaroyl-coenzyme A provenant de la voie des phénylpropanoïdes et de trois molécules de malonyl-coenzyme A produites suite à la carboxylation d'acétyl-coenzyme A du cycle de Krebs. Cette première étape est réalisée par l'enzyme chalcone synthase et mène à la formation de la naringénine chalcone. Celle-ci est ensuite isomérisée en une flavanone par une chalcone flavanone isomérase. À partir de cet intermédiaire la voie de biosynthèse se divise en plusieurs branches, chacune menant à un sous-groupe de flavonoïde (**Figure I-10**).



**Figure I-10 :** Voie de biosynthèse simplifiée des flavonoïdes, Koes et al. 1994. PAL : phénylalanine ammonia-lyase, C4H : cinnamate 4-hydroxylase, 4CL : 4-coumaroyl-coenzyme A ligase, CHS : chalcone synthase, CHI : chalcone flavanone isomérase, F3H : flavanone 3-β-hydroxylase, DFR : dihydroflavonol 4-reductase, FLS : flavonol synthase, IFS : isoflavonoïde synthase, AS : anthocyanin synthase, UF3GT : UDP-glucose/flavonoïde 3-O-glucosyltransferase

#### ***2.2.4.4 Intérêt cosmétique et pharmacologique des flavonoïdes***

On retrouve de nombreux flavonoïdes responsables de la couleur des fleurs et des fruits tels que les anthocyanines (orange, rouge, rose), les cyanidines (magenta, rouge profond) et les delphinidines (violet, mauve et bleu) mais aussi des flavonoïdes ayant des propriétés de protection de la plante contre les agressions extérieures (UV, bactéries, insectes) comme le kaempférol, la lutéoline ou encore l'isoquercétine.

### **2.2.5 Les coumarines**

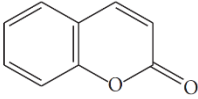
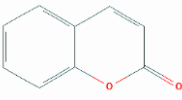
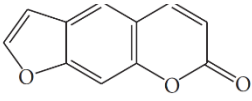
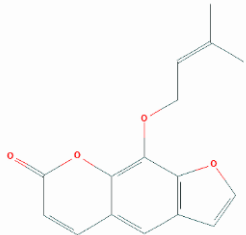
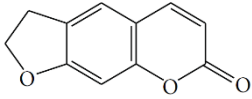
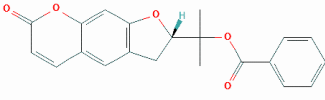
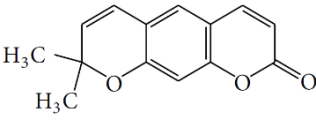
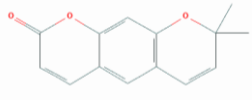
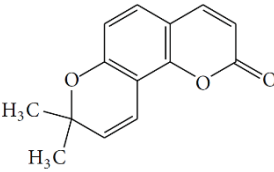
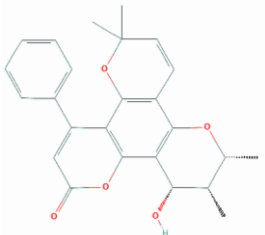
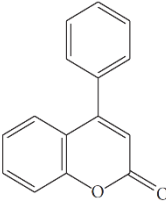
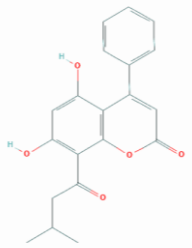
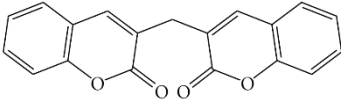
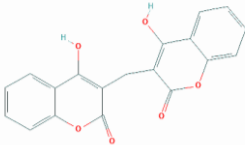
#### ***2.2.5.1 Définition***

Les coumarines dérivent de la molécule benzo- $\alpha$ -pyrone plus connue sous le nom de coumarine qui tient son nom du coumarou ou gaïac de Cayenne, un arbre de la famille des fabacées qui pousse en Amérique centrale et du sud. La graine de cet arbre, la fève de tonka en contient, c'est même au sein de ces fèves qu'elle a été isolée pour la première fois en 1822. Les familles des Rutacées et des Apiacées constituent les sources les plus riches en coumarines.

#### ***2.2.5.2 Structure chimique et classification***

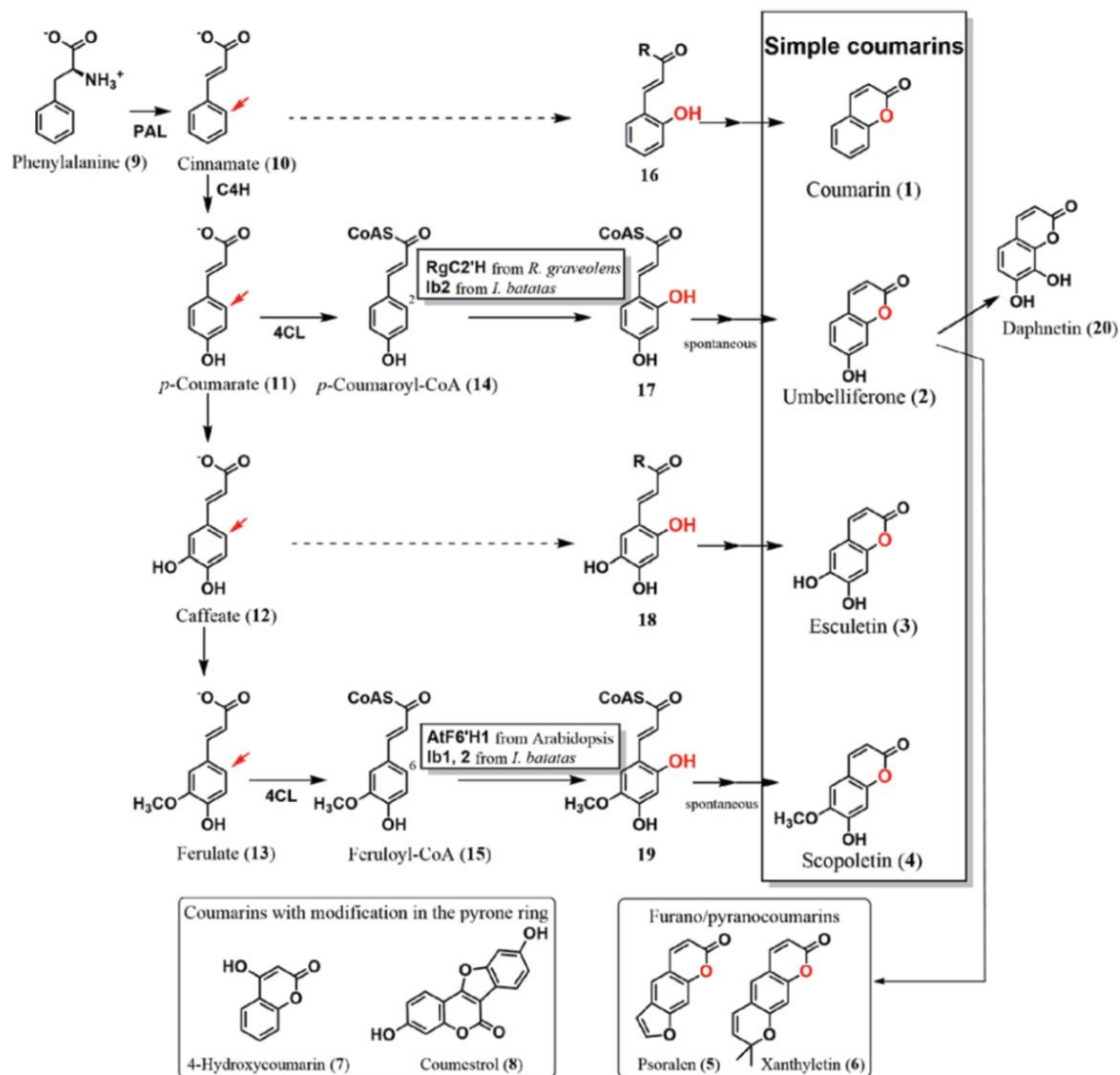
Toutes les coumarines possèdent une structure comprenant un cycle benzène et un noyau lactone formant un noyau coumarine simple. Il existe six principaux sous-groupes de coumarines : les coumarines simples, les furanocoumarines, les dihydrofuranocoumarines, les pyranocoumarines linéaires et angulaires, les phénylcoumarines et les bicoumarines (**Tableau I-3**).

Tableau I-3 : Les différents sous-groupes de coumarines, adaptation de Venugopala et al. 2013

Classe		Structure chimique de base	Exemples
Coumarines simples			Coumarine 
Furanocoumarines			Impératorine 
Dihydrofuranocoumarines			Felamidine 
Pyrannocoumarines	Linéaires		Xanthyletin 
	Angulaires		Inophyllum A 
Phénylcoumarines			Isodispar B 
Bicoumarines			Dicoumarol 

### 2.2.5.1 Biosynthèse des coumarines

La voie de biosynthèse des coumarines débute par l'élimination d'une molécule d'ammoniac  $\text{NH}_3$  d'une phénylalanine à l'aide d'une phénylalanine ammonia-lyase (PAL) pour donner un acide cinnamique aussi appelé cinnamate. Le cinnamate peut ensuite être soit *ortho*-hydroxylé pour aboutir à la coumarine, soit *para*-hydroxylé pour mener à l'umbelliférone et aux autres sous-groupes de coumarines (Figure I-11).



**Figure I-11** : Voie de biosynthèse simplifiée des coumarines, Shimizu 2014. PAL : phénylalanine ammonia-lyase, 4CL : 4-coumaroyl-coenzyme A ligase, les positions ortho sont indiquées par les flèches rouges et les atomes d'oxygène introduits par ortho-hydroxylation sont indiqués en rouge, les flèches en pointillées correspondent à des hydroxylases pas encore décrites.

### 2.2.5.2 Intérêt cosmétique et pharmacologique des coumarines

On attribue aux coumarines de nombreuses propriétés notamment anticoagulante, anti-inflammatoire, anticancéreuse et de protection contre les UV (Jain et Joshi 2012, Venugopala et al. 2013). Les médicaments dits coumariniques sont de façon générale utilisés afin de prévenir la formation de caillots sanguins. En effet à ce jour la molécule de warfarine, un dérivé synthétique de

dicoumarol, également appelée coumaphène est une des plus utilisées comme anticoagulant oral sous le nom de Coumadine®. De façon intéressante les furanocoumarines ont la capacité, lorsqu'elles sont soumises à un rayonnement UV, de se fixer à différentes macromolécules telles que l'ADN, les protéines ou les acides gras. Dans ces conditions, lorsqu'elles se fixent à l'ADN elles modifient sa structure et empêchent alors sa réplication et de ce fait la prolifération des cellules. Cette particularité des furanocoumarines a permis de mettre en place une thérapie dite P-UVA combinant un rayonnement UVA et une application de furanocoumarines afin de traiter des maladies de la peau telles que le psoriasis ou le vitiligo (Pathak et Fitzpatrick 1992).

## 2.2.6 Les stilbènes

### 2.2.6.1 Définition

Les stilbènes sont présents chez les spermatophytes, comprenant l'ensemble des espèces de plantes à graines. Ils jouent un rôle important au sein de ces plantes notamment sur la protection du duramen, aussi appelé « bois de cœur » ou « bois parfait » qui est la partie interne du bois correspondante aux zones les plus anciennement formées. Les stilbènes sont également contenus dans les vins rouges. Les plus connus sont le resvératrol et ses dérivés, le ptérostilbène, l'oxyresvératrol et les viniférines.

### 2.2.6.2 Structure chimique et classification

Les stilbènes comportent deux noyaux benzéniques liés entre eux par un pont éthène pouvant exister sous la forme *trans* (E) ou sous la forme *cis* (Z). La forme *trans* est la forme la plus stable et la plus bioactive, c'est pourquoi elle est retrouvée de façon plus abondante dans l'ensemble des espèces végétales productrices de stilbènes. Chacune de ces formes peut être méthylée, hydroxylée, méthoxylée, conjuguée à des glucosides ou oligomérisée (Figure I-12).

Stilbene	R3	R5	R2'	R3'	R4'
<i>t</i> -resveratrol	OH	OH	H	H	OH
<i>t</i> -pterostilbene	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	OH
<i>t</i> -oxyresveratrol	OH	OH	OH	H	OH
<i>t</i> -piceatannol	OH	OH	H	OH	OH
<i>t</i> -pinosylvin	OH	OH	H	H	H
<i>t</i> -pinosylvin monomethyl ether	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	OH
<i>t</i> -isorhapontigenin	OH	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH
<i>t</i> -isorhapontin	OGlu	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH
<i>t</i> -astringin	OGlu	OH	H	OH	OH
<i>t</i> -polydatin ( <i>t</i> -piceid)	OH	OGlu	H	H	OH
mulberroside A	OGlu	OH	OH	H	OGlu

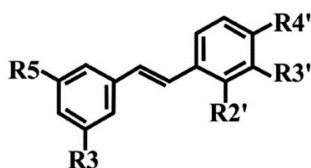
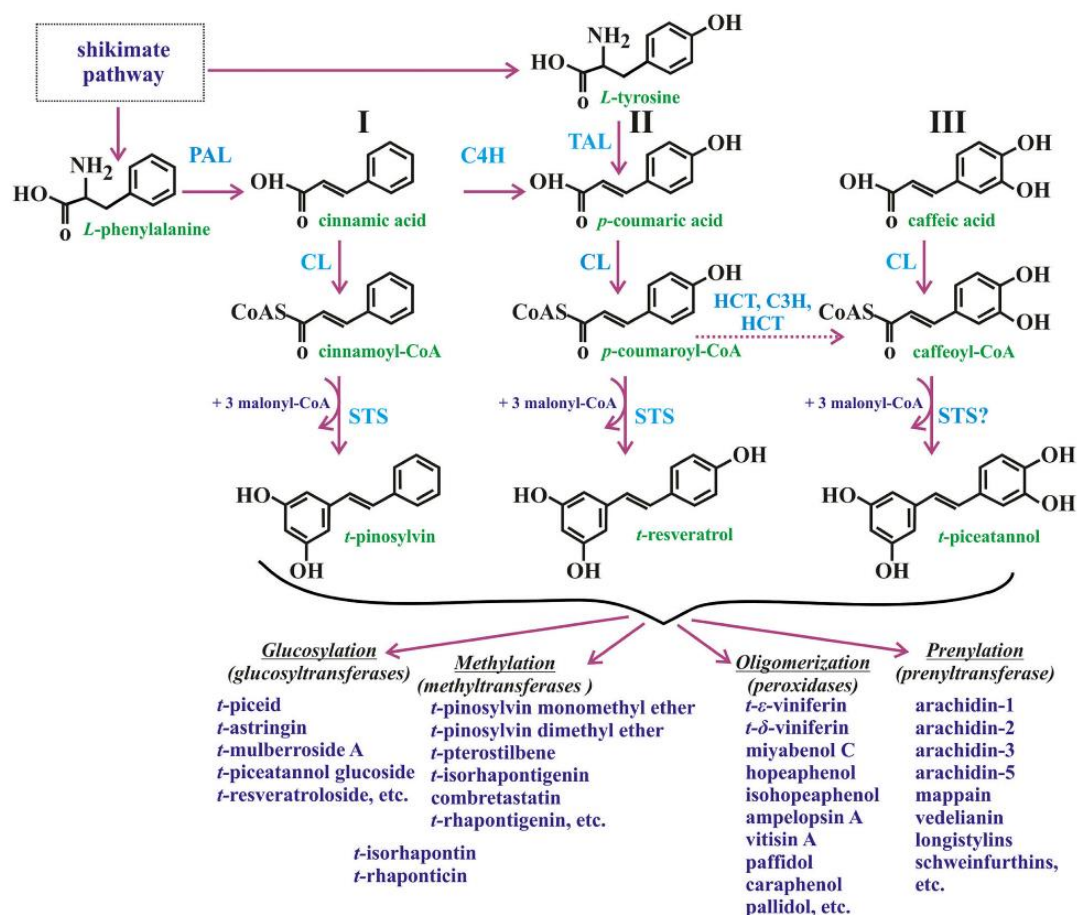


Figure I-12 : Structure chimique de plusieurs stilbènes de plantes, Dubrovina et Kiselev 2017



### 2.2.6.3 Biosynthèse des stilbènes

Les stilbènes résultent de la condensation d'une molécule de *p*-coumaroyl-CoA ou de *p*-cinnamoyl-CoA issue de la voie des phénylpropanoïdes et de trois molécules de malonyl-CoA catalysée par des stilbènes synthases menant respectivement au resvératrol et à la pinosylvine (**Figure I-13**). Les stilbènes synthases synthétisant le resvératrol sont retrouvées principalement chez les Angiospermes tandis que celles synthétisant la pinosylvine sont uniquement présentes chez certains Gymnospermes, particulièrement chez les végétaux du genre *Pinus*. Une autre stilbène synthase peut également mener à la formation du piceatannol à partir d'une molécule de caffeoyl-CoA et de trois molécules de malonyl-CoA mais cette enzyme spécifique n'a pas encore été identifiée. La majorité des stilbènes retrouvés chez les plantes dérivent du resvératrol, de la pinosylvine et du piceatannol.



**Figure I-13** : Voie de biosynthèse des stilbènes chez les plantes, Dubrovina et Kiselev 2017. PAL : phénylalanine ammonia-lyase, C4H : cinnamate 4-hydroxylase, C3H : *p*-coumarate 3-hydroxylase, CL : coumarate :CoA ligase, HCT : hydroxycinnamoyltransferase, STS : stilbène synthase



#### 2.2.6.4 Intérêt cosmétique et pharmacologique des stilbènes

Le resvératrol reste aujourd'hui le stilbène le plus étudié notamment grâce à ces effets cardioprotecteurs et aux études menées par Renaud et De Lorgeril en 1992 sur le French paradox (Renaud et De Lorgeril 1992). Le French paradox est un phénomène observé au sein de la population française, notamment du Sud de la France, mettant en contradiction la richesse en matières grasses saturées et en vin rouge de l'alimentation et le faible taux de mortalité lié aux maladies cardiovasculaire en comparaison des résultats observés aux États-Unis et au Royaume-Uni. De nombreuses études ont alors pu mettre en évidence les effets bénéfiques des stilbènes sur les fonctions vasculaires, l'athérosclérose, le stress oxydatif ou encore sur les accidents vasculaires cérébraux (Akinwumi 2018). Du point de vue cosmétique, les stilbènes et particulièrement le resvératrol et les viniférines sont exploités depuis 1995 pour leurs propriétés antioxydantes par l'entreprise cosmétique Caudalie dans la production de cosmétiques réputés anti-tâches et anti-vieillessement (**Figure I-14**).



**Figure I-14** : Exemples de produits commercialisés par l'entreprise Caudalie, une crème cachemire redensifiante à base de resvératrol (à gauche) et un sérum éclat anti-tâches à base de viniférines (à droite) (<https://fr.caudalie.com>)

## 2.3 Les alcaloïdes

### 2.3.1 Définition

Les alcaloïdes sont une famille de métabolites spécialisés utilisés depuis plus de 3000 ans par l'Homme. Le terme alcaloïde a été inventé en 1819 par un pharmacien allemand Carl Meissner pour désigner des composés contenant de l'azote, d'origine végétale, et pharmacologiquement actifs. La famille des alcaloïdes est généralement divisée en trois principaux types : les alcaloïdes vrais, les proto-alcaloïdes et les pseudo-alcaloïdes.

### 2.3.1.1 Les alcaloïdes vrais

Les alcaloïdes vrais dérivent d'acides aminés et possèdent un atome d'azote sur un noyau hétérocyclique. Ces substances sont très réactives et ont une grande activité biologique même à faible dose. Tous les alcaloïdes vrais sont retrouvés sous la forme d'un solide blanc excepté la nicotine qui est trouvée sous la forme d'un liquide marron. Chez les plantes, ils peuvent être trouvés sous forme libre, sous forme d'un sel ou sous forme d'amine oxyde. Les principaux précurseurs des alcaloïdes vrais sont la L-ornithine, la L-lysine, la L-tyrosine, la L-phénylalanine, le L-tryptophane, la L-histidine, l'acide anthranilique et l'acide nicotinique. Parmi les alcaloïdes vrais les plus connus on retrouve la cocaïne dérivant de la L-ornithine, la morphine dérivant de la L-tyrosine et la chloroquine ou chloroquine dérivant du L-tryptophane (Figure I-15).

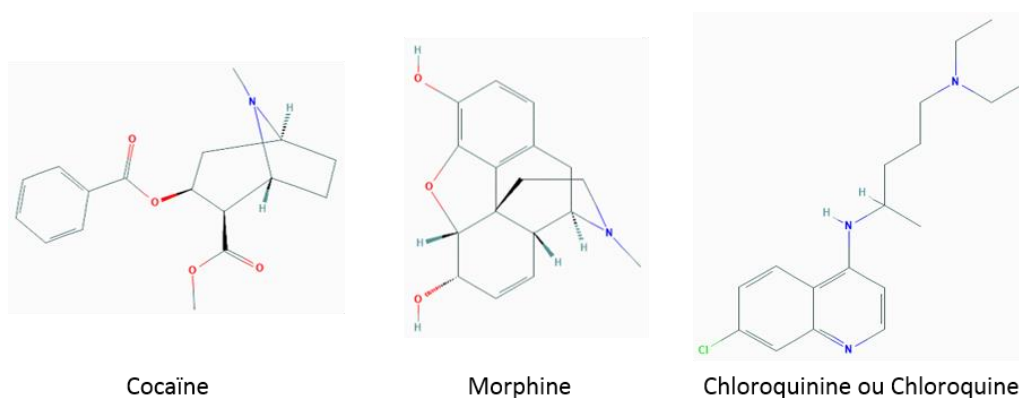


Figure I-15 : Exemples d'alcaloïdes vrais

### 2.3.1.2 Les proto-alcaloïdes

Les proto-alcaloïdes dérivent, comme les alcaloïdes vrais, d'acides aminés mais leur atome d'azote ne fait pas parti du noyau hétérocyclique. Ils représentent une minorité au sein des alcaloïdes. Les proto-alcaloïdes dérivent de la L-tyrosine, du L-tryptophane et de la L-ornithine. On peut retrouver la mescaline dérivant de la L-tyrosine, la yohimbine dérivant du L-tryptophane, et la stachydrine dérivant de la L-ornithine (Figure I-16).

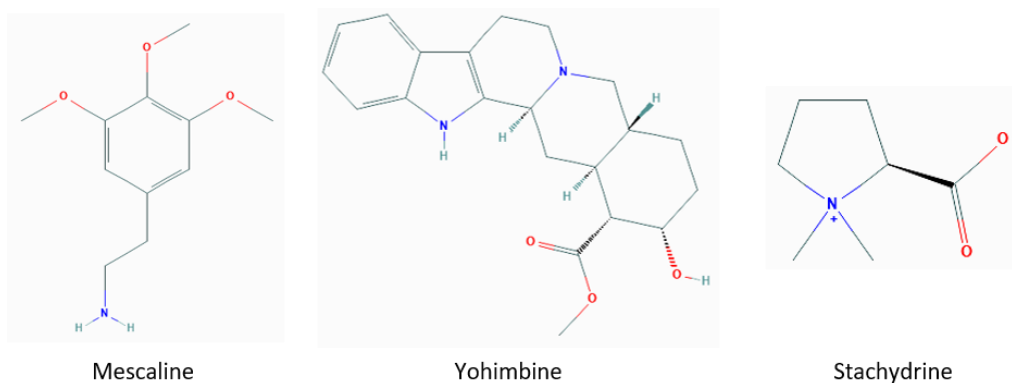
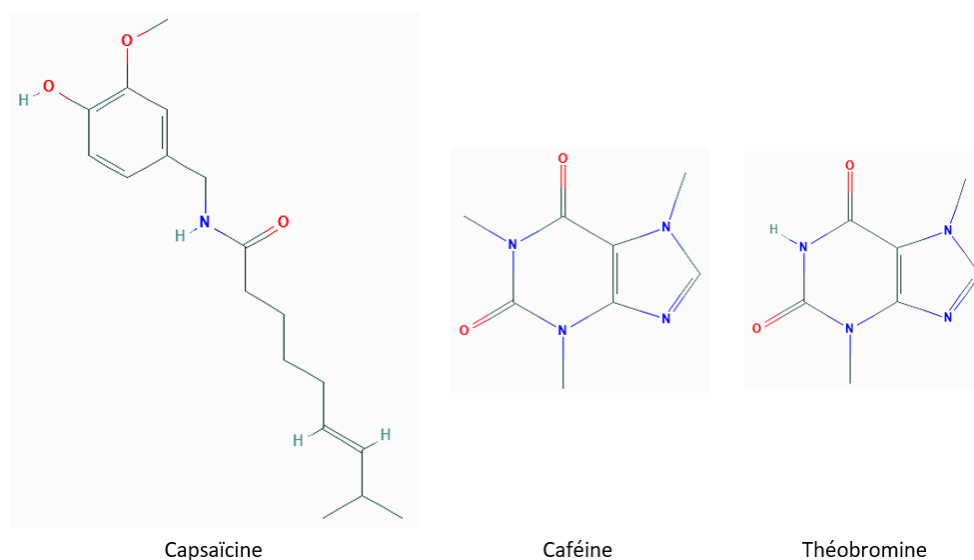


Figure I-16 : Exemples de proto-alcaloïdes

### 2.3.1.3 Les pseudo-alcaloïdes

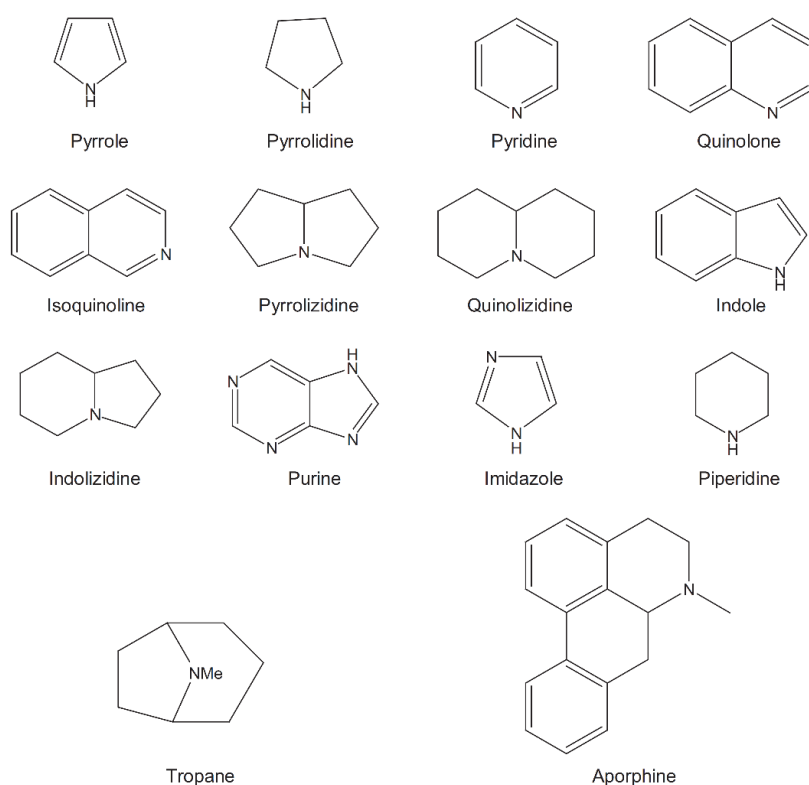
Les pseudo-alcaloïdes sont des composés ne dérivant pas directement d'acides aminés mais de leurs précurseurs ou postcurseurs. Ils peuvent également provenir de réactions d'amination ou de transamination des précurseurs ou postcurseurs des acides aminés. Parmi les pseudo-alcaloïdes on retrouve des composés tels que la capsaïcine dérivant de l'acide férulique, ou la caféine et la théobromine dérivant des bases purines adénine et guanine (**Figure I-17**).



**Figure I-17** : Exemples de pseudo-alcaloïdes

### 2.3.2 Classification par structure des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont généralement classés selon leur structure chimique. D'après cette classification, on peut distinguer 14 groupes : les alcaloïdes indoliques, les alcaloïdes tropaniques, les alcaloïdes quinoléiques, les alcaloïdes isoquinoléiques, les alcaloïdes puriniques, les alcaloïdes pipéridiniques, les alcaloïdes pyridiniques, les alcaloïdes imidazoliqes, les alcaloïdes pyrrolizidiniques, les alcaloïdes pyrrolidiniques, les alcaloïdes quinolizidiniques, les alcaloïdes pyrroliques, les alcaloïdes indolizidiniques et les alcaloïdes aporphiniques (**Figure I-18**).



**Figure I-18 :** Structure chimique de base des différents groupes d'alcaloïdes, Kukula-Koch et Widelski 2017

### 2.3.3 Origine biosynthétique des alcaloïdes

Comme indiqué précédemment les alcaloïdes dérivent majoritairement d'acides aminés, c'est notamment le cas des alcaloïdes vrais et des protoalcaloïdes. Ces alcaloïdes sont principalement synthétisés à partir d'acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine et la tyrosine permettant d'obtenir des alcaloïdes isoquinoléiques ou encore le tryptophane, précurseur des alcaloïdes indoliques. D'autres acides aminés tels que la lysine, précurseur des alcaloïdes pipéridiniques et quinolizidiniques, et l'ornithine, précurseur des alcaloïdes pyrrolidiniques, pyrrolizidiniques et tropaniques, sont également utilisés pour la synthèse des alcaloïdes. Les alcaloïdes peuvent aussi être directement dérivés de précurseurs d'acides aminés tels que l'acide anthranilique, précurseur du tryptophane, et l'acétate, précurseur de la lysine via l'acide  $\alpha$ -kétoadipique ou encore de parties dégradées d'acides aminés comme l'acide nicotinique issu de la dégradation du tryptophane.

### 2.3.4 Localisation des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont présents principalement chez les Angiospermes ou Magnoliophytes, communément appelés plantes à fleurs et sont rares chez les Gymnospermes, qualifiés de plantes à graines nues et les monocotylédones. Au sein d'une même plante, la concentration en alcaloïdes peut varier considérablement d'une partie de la plante à une autre. Les alcaloïdes sont fréquemment accumulés dans la vacuole sous leur forme protonée non diffusible. Il est rare qu'une plante contienne un seul alcaloïde, ils se présentent généralement sous la forme d'un mélange complexe de plusieurs alcaloïdes pouvant contenir un composé majoritaire.

### 2.3.5 Fonctions des alcaloïdes

La question du rôle des alcaloïdes au sein de la plante est longtemps restée sans réponse mais un schéma commence à apparaître concernant leur rôle en tant que molécule de défense. Cette idée est supportée par la large gamme d'effets physiologiques des alcaloïdes sur les animaux. En effet de nombreux alcaloïdes sont toxiques pour les insectes ou fonctionnent comme des anti-appétants, c'est-à-dire qu'après ingestion ils empêchent l'animal de se nourrir momentanément ou indéfiniment. La nicotine du tabac a par exemple été le premier insecticide utilisé par l'Homme et il reste encore aujourd'hui un des plus efficaces. De même, la caféine que l'on peut retrouver dans le cacao, le café, le cola, le maté ou le thé peut tuer en moins de 24 heures presque toutes les larves du Sphinx du tabac (*Manduca sexta*) à des concentrations bien plus faibles que celles que l'on peut mesurer dans les grains de café frais ou dans les feuilles de thé fraîches (Croteau et al 2000).

### 2.3.6 Propriétés physicochimiques des alcaloïdes

De nombreux alcaloïdes sont optiquement actifs et leurs isomères lévogyres (-) sont pharmacologiquement plus actifs que le mélange racémique des deux isomères. Les alcaloïdes ont une propriété physicochimique qui est largement exploitée dans l'industrie pharmaceutique pour faciliter leur purification des matrices végétales complexes et pour la production de produits pharmaceutiques. En effet, la solubilité des alcaloïdes dépend de la forme sous laquelle ils sont retrouvés. Lorsqu'ils sont retrouvés sous leur forme libre, ils sont solubles dans des solvants non polaires tels que le chloroforme ou l'éther alors que leur solubilité dans l'eau est majoritairement faible. Au contraire, lorsqu'ils sont sous forme de sels ils sont solubles dans l'eau et les acides dilués alors qu'ils sont insolubles ou modérément soluble dans les solvants organiques.

### 2.3.7 Usage cosmétique et pharmacologique des alcaloïdes

L'un des alcaloïdes prescrits les plus connus est la codéine, un dérivé de la morphine, utilisée comme antitussif et antalgique. Certains alcaloïdes ont aussi servi de modèles pour la synthèse de médicaments tels que l'atropine et la quinine pour la synthèse respectivement de tropicamide, utilisé pour la dilation des pupilles lors d'examens ophtalmologiques, et la chloroquine, employée en tant que traitement anti-paludique (Croteau et al 2000). Concernant les cosmétiques, les laboratoires Pierre Fabre commercialise sous la marque Klorane depuis les années 80 une gamme de produits capillaires à base d'extrait d'écorces de quinquina rouge (*Cinchona pubescens*), un petit arbre sempervirent de la famille des Rubiacées originaire de la Cordillère des Andes et d'Amérique centrale. Le quinquina rouge est riche en quinine, un alcaloïde utilisé au départ contre le paludisme. Cette gamme de produits est vendue comme ayant des propriétés stimulante et fortifiante pour les cheveux. L'utilisation de l'extrait de cette plante dans des formulations cosmétiques est protégée par un brevet depuis 2004 (Fabre et al. 2004). Certains produits de cette gamme contiennent également, en plus de

la quinine, de la caféine un autre alcaloïde qui agit comme stimulant du système nerveux central et du métabolisme (**Figure I-19**).



**Figure I-19** : Produits Klorane de la gamme à la quinine. De gauche à droite : des compléments alimentaires, un soin anti-chute, un shampooing et un baume après-shampooing (<https://www.klorane.com/fr-fr/cheveux/quinine>)

### 3 Diversité d'accumulation des métabolites spécialisés

Les métabolites spécialisés ne sont pas accumulés au sein du même organe ou du même tissu de par leurs activités diverses au sein de la plante. C'est alors que l'on peut observer une accumulation tissu spécifique de ces composés. Par exemple, les flavonolignanes sont majoritairement accumulés dans le péricarpe du fruit du chardon Marie *Silybum marianum* L. Gaertn (Drouet 2019) et les graines du lin *Linum usitatissimum* L. sont la source la plus riche de sécoisolaricirésinol diglucoside, un lignane dit phyto-oestrogénique ayant des effets bénéfiques sur la santé humaine (Touré et Xueming 2010).

L'inductibilité des voies de biosynthèse par des stimuli externes ne sera donc pas la même en fonction de l'organe dans lequel les métabolites spécialisés sont accumulés. De plus, du fait que les métabolites spécialisés dérivent de molécules issues du métabolisme primaire on observe un antagonisme entre ces deux métabolismes. Des relations étroites existant entre ces deux métabolismes, lors de l'inductibilité des voies de biosynthèse de molécule d'intérêt il sera nécessaire de maintenir un équilibre entre ces deux métabolismes afin de ne pas favoriser par exemple le métabolisme spécialisé au détriment du métabolisme primaire.

De plus, afin de pouvoir accéder à certains organes sans nuire à la plante, des mises en culture spécifiques devront être mises en place pour pallier les difficultés d'approvisionnement. Il est donc nécessaire de trouver des conditions de culture et des stimulations ne présentant pas d'impact trop négatif sur la production de biomasse afin de maintenir un niveau élevé de productivité.

## 4 Les différents modes de culture

Il existe aujourd'hui de nombreuses méthodes de cultures allant des plus traditionnelles aux plus innovantes permettant de produire de potentiels actifs que cela soit pour le domaine des cosmétiques ou pour le domaine pharmaceutique. Parmi les méthodes de cultures traditionnelles on retrouve la culture dite classique en pot ou en terre qui est la méthode de culture la plus utilisée. C'est cette méthode qui est utilisée en agriculture traditionnelle qui consiste à cultiver les plantes directement en terre. Cependant cette agriculture traditionnelle peut avoir de nombreux impacts négatifs sur l'environnement notamment à cause d'une utilisation élevée en eau, d'une consommation élevée en nutriments, d'un besoin de grandes surfaces d'exploitation et de la dégradation du sol (AlShrouf 2017).

De nouvelles méthodes de culture dites innovantes ont ainsi été développées dans le but de minimiser ces impacts sur l'environnement. Au sein de ces méthodes de cultures innovantes on rencontre par exemple les cultures hydroponiques, aéroponiques et aquaponiques mais aussi les cultures biotechnologiques comme la culture de cals ou les suspensions cellulaires ou encore les stress lumineux et salins.

Les cultures hydroponiques, aéroponiques et aquaponiques sont trois méthodes de culture dites hors sol c'est-à-dire que les plants sont placés dans des pots contenant un substrat inerte tel que des billes d'argile ou de la laine de roche. Ces méthodes permettent une économie d'eau utilisée de 80 à 95 % en comparaison à l'agriculture traditionnelle en fonction de la méthode de culture employée (AlShrouf 2017). Dans une culture hydroponique les plants poussent dans un substrat inerte qui est irrigué par un courant de solution nutritive, les racines sont alors en contact constant avec cette solution nutritive (**Figure I-20**). Ce type de système peut être utilisé en circuit ouvert ou fermé. En circuit ouvert, la solution nutritive est renouvelée à chaque cycle d'irrigation tandis qu'en circuit fermé la solution nutritive déjà utilisée est ré-introduite dans le circuit après contrôle et ajustement de la concentration en nutriments (AlShrouf 2017). Les cultures aéroponiques et aquaponiques sont des variantes de cette méthode de culture. En effet, la culture aéroponique fonctionne sur le même principe que la culture hydroponique à la différence que les racines des plants sont en suspension dans l'air à l'intérieur d'un bac de rétention fermé et que les plants sont irrigués par pulvérisations de la solution nutritive sur les racines à intervalles réguliers (**Figure I-20**). Ce type de système permet un meilleur apport d'oxygène aux racines et une meilleure absorption des minéraux et des vitamines par la plante (AlShrouf 2017). La culture aquaponique se base également sur le même principe que la culture hydroponique cependant dans cette méthode de culture, la solution nutritive apportée aux plantes provient de bassins dans lesquels sont élevés des poissons (**Figure I-20**). Ce système permet de faire croître des poissons et des plantes dans un même environnement aquatique stable. Dans ce système de culture, les poissons apportent une source de nutriments biologiques pour les plantes et

les plantes forment un filtre naturel pour purifier l'eau dans laquelle les poissons vivent. Dans ce système aquaponique interviennent également des bactéries nitrifiantes qui vont convertir l'ammoniac des déchets des poissons en nitrites puis en nitrates qui seront assimilés par les plantes (AlShrouf 2017).

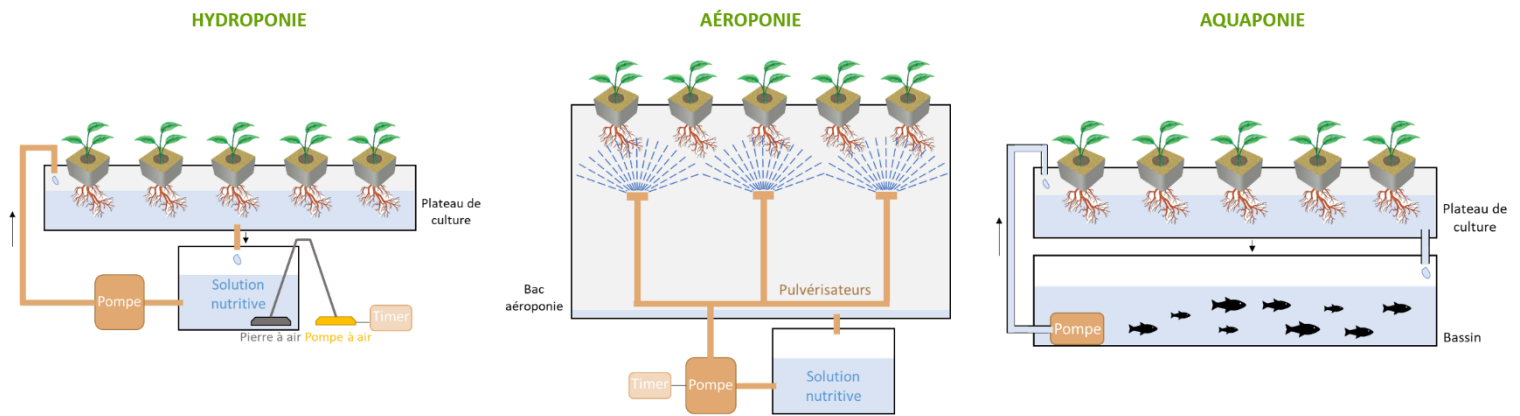


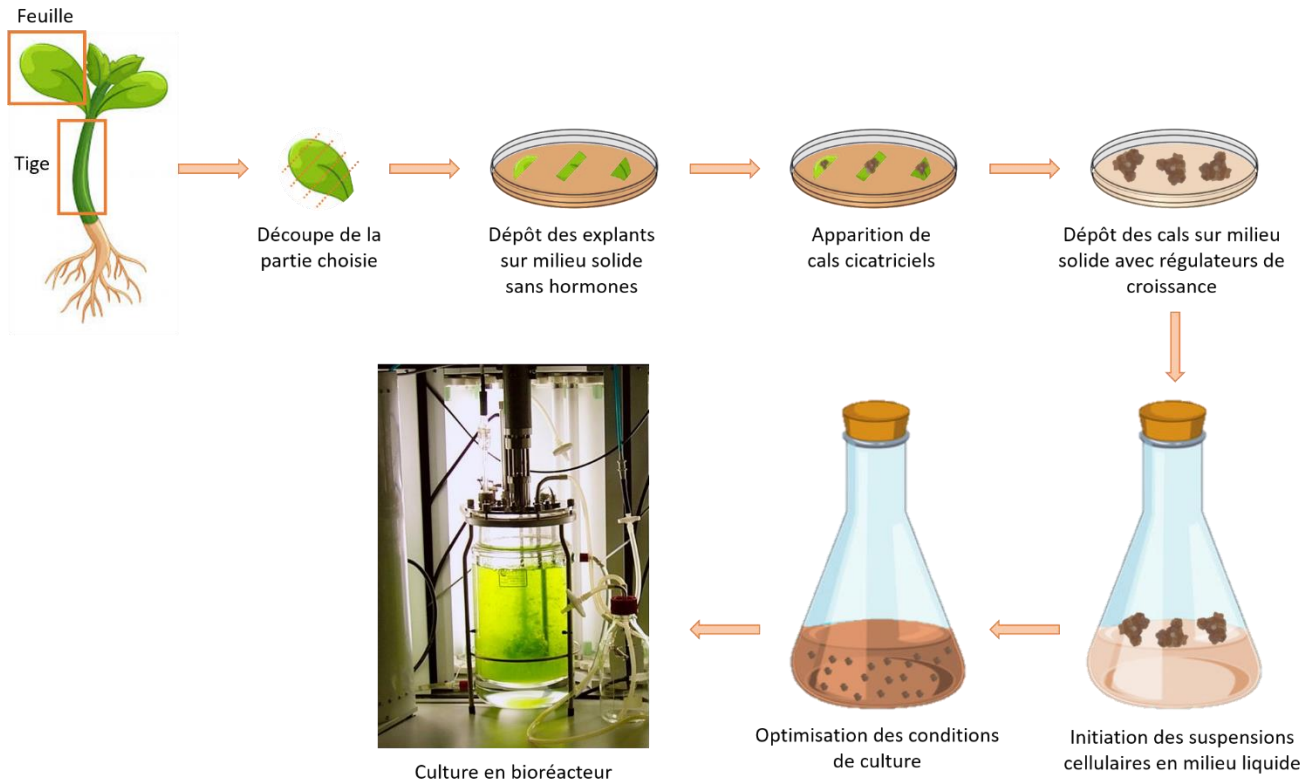
Figure I-20 : Représentation schématique des systèmes de culture (de gauche à droite) hydroponiques, aéropoiques et aquaponiques

Ces méthodes de cultures sont utilisées sur des plantes entières mais il existe aussi d'autres méthodes de culture innovantes qui permettent non pas la croissance de plantes entières mais le développement de cellules végétales. Ces cultures de cellules végétales sont des cultures de biotechnologies végétales comme la culture de cals ou les suspensions cellulaires et sont des méthodes de culture *in vitro*.

La culture de cals est basée sur une particularité des plantes, la totipotence végétale qui est la capacité des cellules végétales à pouvoir régénérer un individu complet identique à la plante mère. Ce concept de totipotence végétale a été évoqué pour la première fois en 1902 par le célèbre botaniste et biologiste autrichien Gottlieb Haberlandt (Haberlandt 1969) mais les preuves expérimentales démontrant cette hypothèse ne sont apparues qu'en 1958 avec les travaux de Steward et *al.* sur la carotte (Steward et *al.* 1958). La culture de cals peut être réalisée à partir d'explants de différentes parties de la plante. Ces explants peuvent provenir de plantes ayant été cultivées *in vitro* en conditions stériles et si ce n'est pas le cas les explants seront stérilisés avant d'être placés sur un milieu synthétique favorisant le développement des cals dans des conditions stériles. Les cals, des amas de cellules végétales indifférenciées et totipotentes vont alors se développer sur les explants. Ce phénomène de développement de cals est une réaction naturelle, observable dans la nature suite à une blessure ou à une infection de la plante. Après l'apparition des cals, ceux-ci sont placés toujours en conditions stériles sur un nouveau milieu de culture synthétique contenant des régulateurs de croissance de type auxine et cytokine favorisant leur développement. L'avantage de la culture de cals est de pouvoir pallier aux contraintes de croissance de la plante mais aussi d'avoir accès à une



production de biomasse indéfinie sans avoir à tenir compte du climat ou de la saison. Les cals peuvent être utilisés comme précurseurs pour l'obtention de suspensions cellulaires (Georgiev et *al.* 2018) en les plaçant dans un milieu de culture stérile liquide et sous agitation constante. Les suspensions cellulaires pourront par la suite être cultivées dans des bioréacteurs dans le but d'une production industrielle (**Figure I-21**).



**Figure I-21** : Représentation schématique des différentes étapes d'obtention des cals et des suspensions cellulaires jusqu'à la culture en bioréacteur, d'après Georgiev et al. 2018

Ces cultures cellulaires végétales *in vitro* sous forme de cals ou de suspensions cellulaires présentent l'avantage de permettre l'application d'une élicitation plus aisée. Ces élicitations peuvent se présenter sous la forme d'un stress lumineux ou salin par exemple.

Le stress lumineux peut être réalisé par un apport de lumière en supplément ou en remplacement de la lumière naturelle. Cette lumière peut être apportée grâce à des systèmes de lampes à LED qui permettent de choisir parmi une sélection la longueur d'onde souhaitée. Les premières expérimentations sur l'élicitation lumineuse ont été réalisées en développant des systèmes de croissance végétale pour des missions spatiales dans le but d'apporter un rayonnement énergétique adéquate (Barta et *al.* 1992). Le stress salin est un phénomène observable dans la nature en particulier dans les zones arides ou semi-arides comme les régions tropicales ou méditerranéennes ce qui limite les rendements agricoles (Khaless et Baaziz 2006). Il peut être réalisé en laboratoire par ajout d'une grande quantité de sel dans le milieu. Le stress salin déclenche à la fois un stress osmotique qui diminue

l'absorption de l'eau par la plante et un stress ionique lié à la toxicité des ions présents en trop grande quantité dans le milieu (Levigneron et *al.* 1995). Certaines plantes peuvent s'épanouir sur un sol riche en sels, ces plantes sont dites halophytes comme la salicorne (*Salicornia*) par opposition aux plantes glycophytes qui ne tolèrent pas les milieux riches en sel.

L'application d'élicitation est perçue comme un stress par la plante qui va mettre en place des mécanismes de défense menant à l'augmentation de la production de métabolites spécialisés potentiellement intéressante pour des applications pharmacologiques ou cosmétiques (Thakur et *al.* 2019).

À l'issue de ces généralités, nous allons présenter plus précisément les méthodes de culture étudiées dans notre projet de recherche, soit la culture en pot et la culture aéroponique avec ou sans élicitation lumineuse. Pour ce faire, nous résumerons les principaux aspects et connaissances actuelles sur les mécanismes mis en jeu lors d'une culture en aéroponie et une élicitation en vue d'une défense de la plante pour une production d'actifs cosmétiques.

#### 4.1 La culture classique

Comme décrit précédemment, la culture classique en pleine terre ou en pot est la méthode de culture la plus utilisée et la plus simple à mettre en œuvre car nécessitant peu de matériel. Cependant ce type de culture présente de nombreux impacts négatifs sur l'environnement à cause d'une trop grande utilisation des ressources comme l'eau, les nutriments et les surfaces exploitées menant à la dégradation des sols (AlShrouf 2017). De plus, cette méthode de culture n'est pas un avantage si la partie de la plante sur laquelle se porte notre intérêt est la racine. En effet avec cette méthode de culture la racine n'est pas accessible et il faudra donc déterrer la plante et éliminer la terre avant de pouvoir utiliser la racine. Dans ce cas, il faudra donc sacrifier la plante pour accéder à sa racine.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la culture aéroponique qui présente l'avantage d'un libre accès aux racines.

#### 4.2 La culture aéroponique

La culture aéroponique ou aéroponie est l'une des nouvelles méthodes de culture dites hors sol dérivée de la culture hydroponique. Cette méthode de culture consiste à faire pousser les plantes dans un substrat comme de la laine de roche ou des billes d'argile, les racines de la plante se retrouvent donc à l'air libre dans la pénombre à l'intérieur d'un bac et sont irriguées par l'aspersion d'eau et d'engrais. Ces cultures restent donc accessibles toute l'année et leurs conditions de culture peuvent

être contrôlées et modulées à façon. L'accès aux racines est facilité et tout obstacle à leur développement est supprimé. Dans ce type de culture, il n'existe pas de concurrence avec les plantes de grandes cultures pour les parcelles cultivables ce qui peut avoir son importance dans le contexte actuel de demande accrue d'alimentation avec l'augmentation de la population mondiale.

Cette méthode de culture a d'abord été développée dans les années 1920 par Barker dans le but d'étudier la structure racinaire des plantes (Barker 1922). Depuis, cette méthode de culture a été utilisée avec succès pour la production de nombreuses espèces horticoles ou ornementales comme la laitue, la tomate, le concombre ou encore les chrysanthèmes et les poinsettias (Buckseth et *al.* 2016). De nombreuses études ont montré l'avantage de la culture aéroponique en comparaison à d'autres méthodes de culture notamment pour la laitue ou la pomme de terre. Pour la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), la culture aéroponique permet un meilleur rendement de production avec la production d'un plus grand nombre de tubercules par plants, plus de 100 mini-tubercules à partir d'un seul plant en culture aéroponique au lieu de 8 tubercules en agriculture traditionnel (Otazù 2010) (Figure I-22).



**Figure I-22** : Photographie du développement de mini-tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* cultivar péruvien "Canchan") en culture aéroponique au Centre International de la Pomme de Terre (International Potato Center, CIP), Otazù 2010

Concernant la laitue, une étude a été effectuée pour comparer la culture aéroponique, la culture hydroponique et la culture en pot dans du sable (El-Helaly et Darwish 2019). Cette comparaison a permis de mettre en évidence des différences significatives après six semaines de culture entre les laitues cultivées d'une part en pot dans du sable et d'autre part en culture hors-sol, aéroponie et

hydroponie. Ces différences concernent des caractéristiques phénotypiques telles que le nombre de feuilles, la taille et le poids du plant ou encore la longueur des racines (**Figure I-23**). Pour les laitues cultivées en aéroponie et en hydroponie la seule différence significative observée dans le phénotype des plants concerne la longueur des racines qui est en moyenne de 58,7 cm pour les laitues provenant de l'aéroponie contre 36,2 cm pour celles cultivées en hydroponie (**Figure I-23**).



**Figure I-23** : Photographies de laitues cultivées en système aéroponique (A), en système hydroponique (B) et en pot dans du sable (C), El-Helaly et Darwish 2019

Au sein de cette étude sur la laitue, les auteurs se sont également intéressés à la teneur en chlorophylles (a, b et totales) et en caroténoïdes totaux des laitues cultivées avec ces trois méthodes de culture pendant six semaines. Pour les teneurs en chlorophylles a, b ou totales aucune différence significative n'a été observée entre les trois méthodes de culture après six semaines de culture. En revanche concernant les caroténoïdes totaux, la teneur était la plus élevée dans les laitues cultivées en aéroponie avec 0,067 mg/g de poids frais contre environ 0,050 mg/g de poids frais pour les cultures en pot et en hydroponie (El-Helaly et Darwish 2019).

Ces études ont pu nous montrer des avantages de la culture aéroponique notamment sur le développement du système racinaire ou sur la production de métabolites spécialisés comme les caroténoïdes. Nous allons maintenant présenter l'élucitation lumineuse, technique de culture qui sera appliquée sur les deux méthodes de culture déjà présentées.

### 4.3 L'élicitation lumineuse

L'élicitation lumineuse est une technique de culture permettant un apport supplémentaire de lumière ou venant en remplacement de la lumière naturelle. Cette supplémentation de lumière permet de promouvoir la croissance de la plante et/ou une ou plusieurs de ses voies métaboliques. Cette élicitation lumineuse peut être réalisée grâce à des systèmes de lampes à LED permettant de moduler à volonté l'intensité lumineuse et la longueur d'onde de la lumière souhaitée parmi une sélection. Cette technique de culture a été développée dans un premier temps pour des missions spatiales afin d'apporter un rayonnement énergétique adéquate à des systèmes de croissances végétales (Barta et *al.* 1992). L'avantage de cette technique est de pouvoir contrôler étroitement la quantité de lumière et le type de lumière reçue par la plante. Cependant l'utilisation de cette technique pour une culture ajoute un coût supplémentaire à celle-ci quel que soit le mode de culture utilisé.

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence les bénéfices d'une élicitation lumineuse sur la production de métabolites spécialisés chez différentes plantes. Une première étude menée sur des cultures de cals de gingembre (*Zingiber officinale* Roscoe) a montré que l'exposition à la lumière de ces cultures de cals, en comparaison à l'obscurité, a stimulé la production de métabolites spécialisés tels que le gingérol, un composé phénolique de la famille des vanilloïdes chimiquement proche de la capsaïcine et le zingibérène, un sesquiterpène (Figure I-24) (Anasori et Asghari 2008).

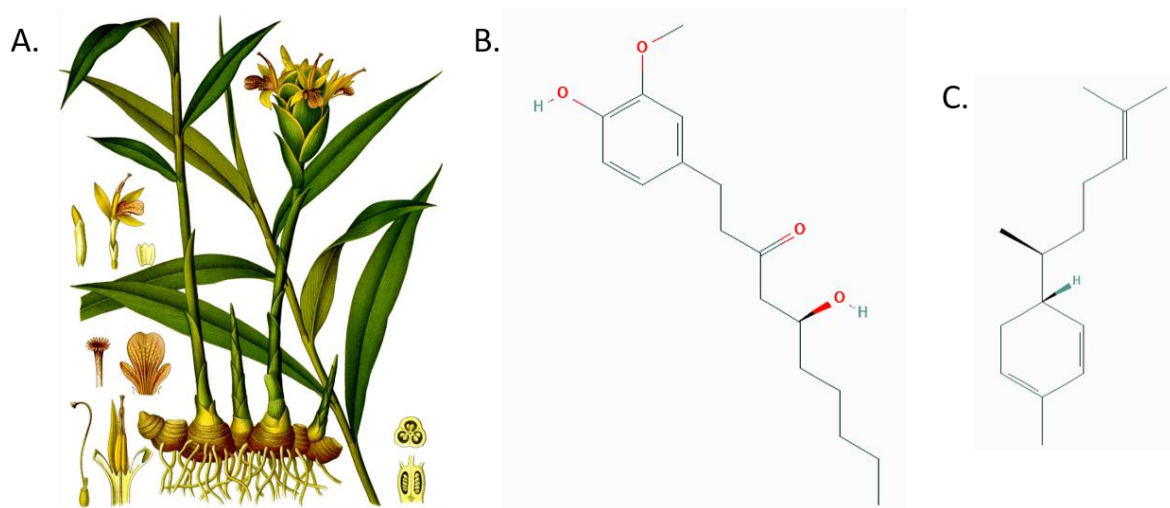
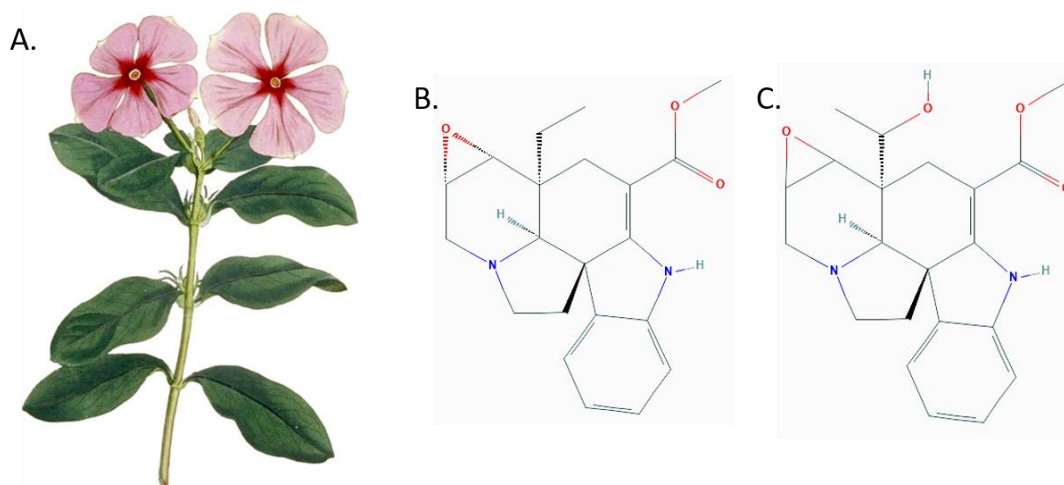


Figure I-24 : (A) Planche botanique de gingembre (*Zingiber officinale* Roscoe), (B) Molécule de gingérol et (C) Molécule de zingibérène



Une seconde étude réalisée sur des cultures de chevelus racinaires (hairy roots) de pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) a pu montrer qu'une exposition aux UV-B de 20 minutes augmente pendant 48 heures après exposition la teneur en lochnericine mais diminue la concentration en hörhammericine, deux alcaloïdes indoles terpéniques (**Figure I-25**) (Binder et *al.* 2009).



**Figure I-25** : (A) Planche botanique de pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*), (B) Molécules de lochnericine et (C) Molécule de hörhammericine

Une autre étude encore a été menée sur des micropousses, aussi appelées graines germées, de deux cultivars de basilic (*Ocimum basilicum* L.). Un premier cultivar « Sweet Genovese » vert acyanique, c'est-à-dire dépourvu d'anthocyanes et un second cultivar « Red Rubin » rouge possédant des anthocyanes (**Figure I-26**).



**Figure I-26** : Phénotype des deux cultivars de basilic (*Ocimum basilicum* L.) "Sweet Genovese" à gauche et "Red Rubin" à droite

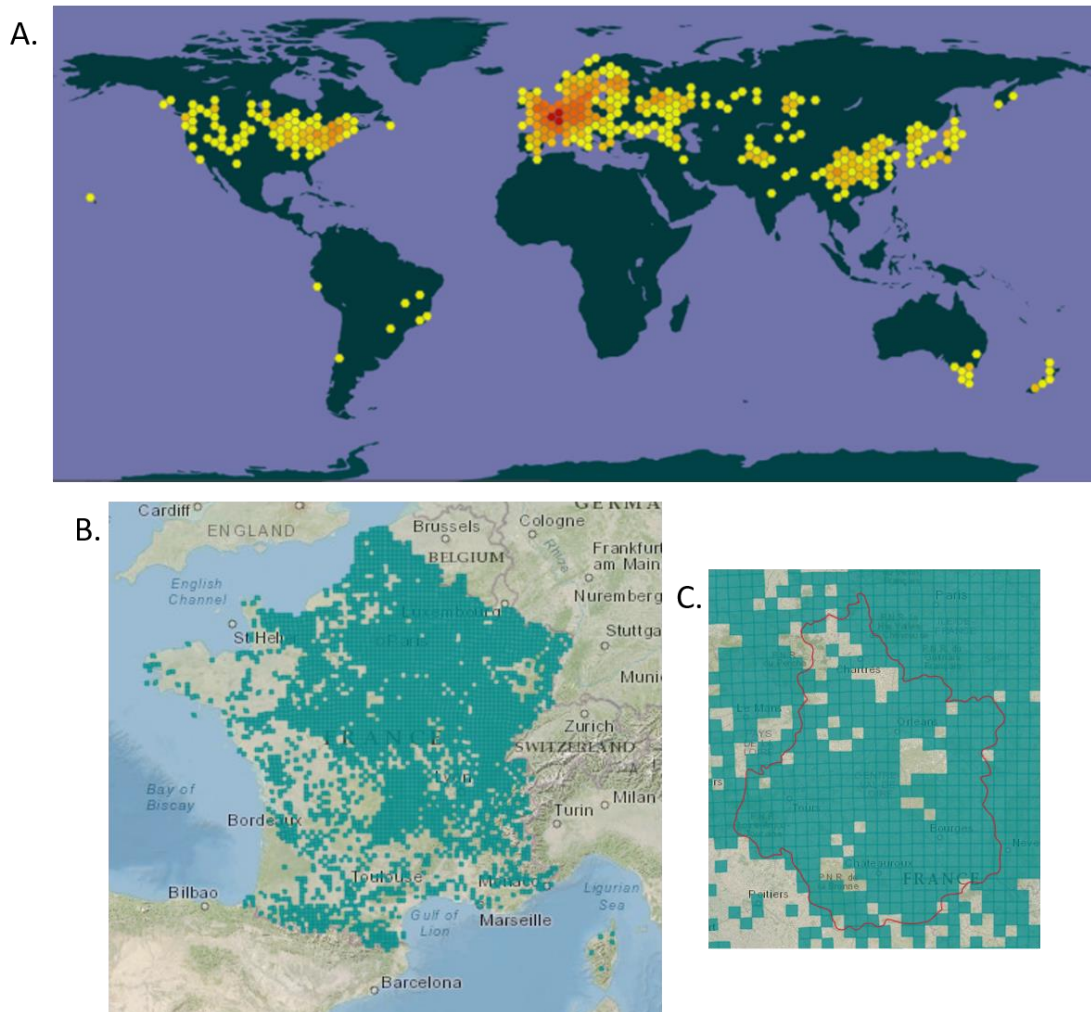
Différentes élicitations ont été réalisées dans cette étude, tout d'abord une élicitation avec de la lumière blanche puis des élicitations avec des combinaisons de lumière rouge et de lumière bleue avec différents ratios d'intensité (1 rouge : 1 bleue, 2 rouge : 1 bleue et 1 rouge : 2 bleue). Lors de cette étude, les fortes proportions de lumière bleue favorisent le développement des cotylédons et l'accumulation de la biomasse dans le cultivar vert (Lobiuc et *al.* 2017). Ces effets de la lumière bleue peuvent être attribués à une meilleure fixation du CO<sub>2</sub> qui est le résultat de l'ouverture des stomates contrôlée par la lumière bleue (Darko et *al.* 2014) ou à une teneur plus élevée en azote dans les feuilles exposées à cette lumière bleue due à l'amélioration de l'activité de la nitrate réductase (Chen et *al.* 2014). La lumière bleue a également permis d'augmenter la synthèse des chlorophylles dans les deux cultivars de basilic étudiés ce qui est concordant avec d'autres études. En effet, la lumière bleue est considérée comme un facteur déterminant dans la production des chlorophylles car elle améliore l'expression de gènes et l'activité d'enzymes, comme la phosphoénolpyruvate kinase, impliqués dans la synthèse des chlorophylles (Ruyters 1982, Fan et *al.* 2013) au contraire de la lumière rouge qui à haute intensité réduit la concentration en acide  $\delta$ -aminolévulinique, un précurseur des tétrapyrroles nécessaire à la synthèse des chlorophylles (Fan et *al.* 2013). La synthèse des composés phénoliques a aussi été stimulée dans les deux cultivars de basilic mais pour le cultivar vert avec les proportions élevées en lumière rouge et pour le cultivar rouge avec des fortes proportions en lumière bleue.

Ces études nous ont montrées les avantages que peut présenter l'élicitation lumineuse sur la stimulation de la production de métabolites comme des terpènes, des alcaloïdes, des composés phénoliques ou les chlorophylles. Après ces présentations nous allons nous attarder sur la plante qui sera cultivée selon ces différentes méthodes de culture présentées, la grande bardane *Arctium lappa* L..

## 5 La grande bardane (*Arctium lappa* L.)

### 5.1 Localisation

La grande bardane plus communément appelée bardane est très répandue dans les régions tempérées d'Asie, d'Amérique et d'Europe même si elle reste peu commune dans la région méditerranéenne (**Figure I-27**). C'est une plante dite rudérale c'est-à-dire qui pousse spontanément dans un milieu modifié de façon involontaire par l'activité ou la présence humaine. De ce fait, la bardane peuple les bords des chemins et les terrains en friche de préférence calcaires. Elle peut se développer jusqu'à 1800 mètres d'altitude.



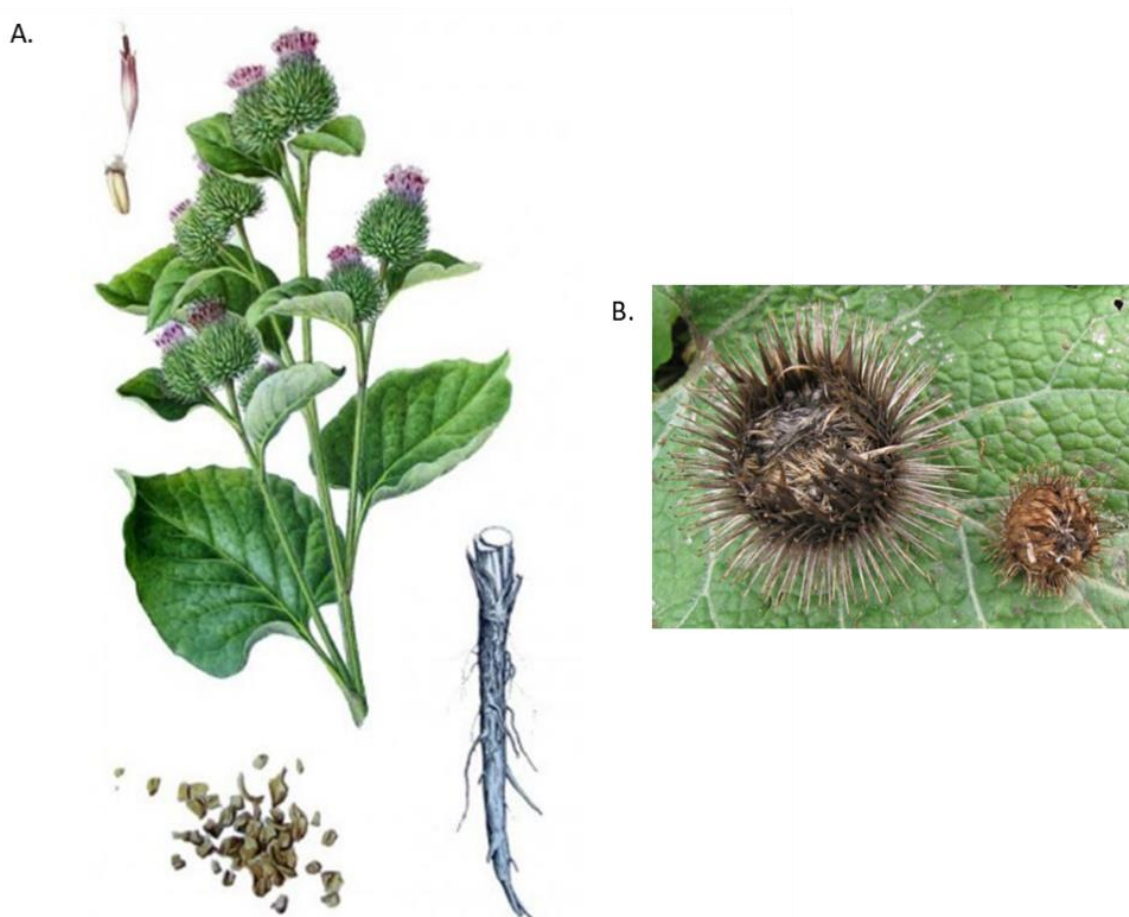
**Figure I-27** : Cartes (A) de la distribution mondiale d'*Arctium lappa* avec les abondances de la plus élevée en rouge à la plus faible en jaune, GBIF Secretariat 2019 et de la présence d'*Arctium lappa* en bleu en France métropolitaine (B) et en région Centre-Val de Loire (C), Muséum national d'Histoire naturelle site web : <https://inpn.mnhn.fr>

### 5.2 Description phénotypique et généralités

La bardane, *Arctium lappa* L. est une plante herbacée bisannuelle de la famille des Astéracées. Elle peut atteindre 2,50 mètres de haut et présente une tige dressée portant un bouquet de grandes

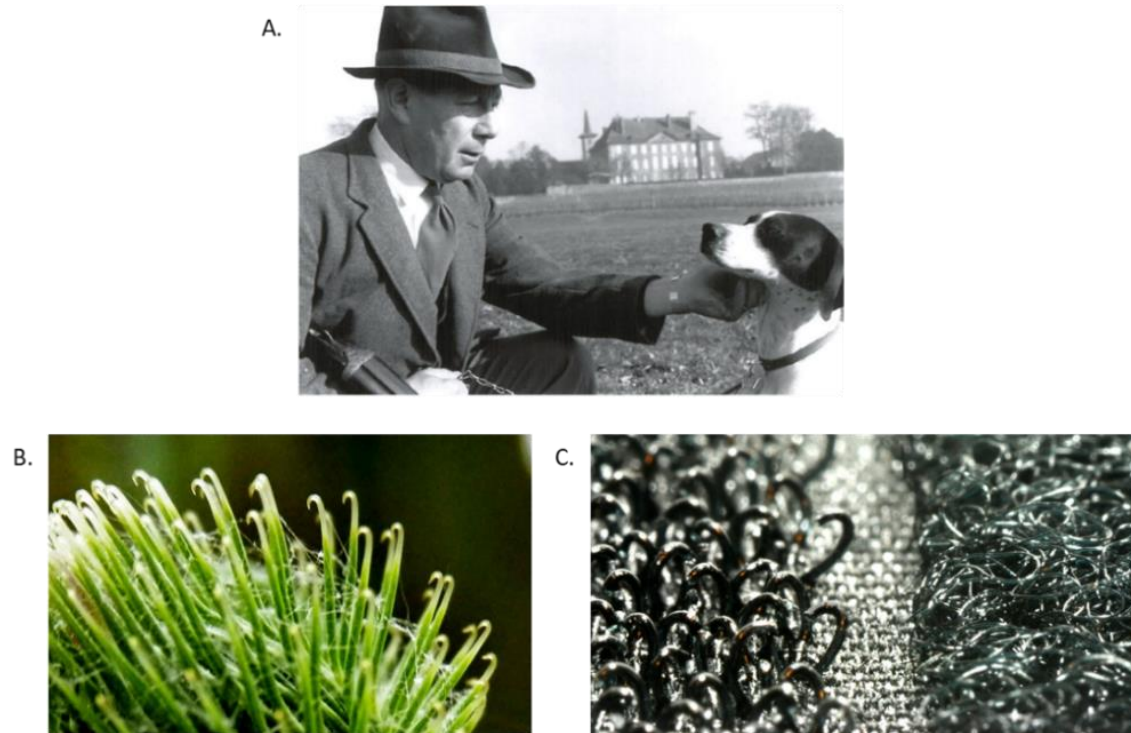


feuilles ovoïdes et acuminées recouvertes de poils blanchâtre sur leur face inférieure. La grande bardane possède des racines longues et pivotantes ainsi que des capitules floraux terminaux globuleux mesurant environ 4 cm et composés de fleurs tubulaires purpurines (Ghedira et Goetz 2013). Il ne faut pas la confondre avec la petite bardane, *Arctium minus* (Hill) Bernh. Les deux espèces se différencient tout d'abord par leur taille, la petite bardane mesure au maximum 1,50 mètres mais aussi par la taille de leur capitule, ceux de la petite bardane mesurent entre 15 et 25 mm et ceux de la grande bardane entre 30 et 45 mm (Figure I-28).



**Figure I-28 :** (A) Planche botanique d'*Arctium lappa* et (B) Photographies des capitules d'*Arctium lappa* (à gauche) et d'*Arctium minus* (à droite), Répertoire Québec Nature site web : <http://www.repertoirequebecnature.com>

Ce sont ses capitules qui ont fait sa célébrité. En effet, la bardane est à l'origine de l'invention en 1948 d'un système de fixation à crochets et boucles communément appelé Velcro® par George de Mestral, un ingénieur suisse (Delattre et al. 2017). L'histoire raconte que de retour chez lui avec son chien Milka après une partie de chasse George de Mestral a laborieusement retiré de nombreuses boules végétales qui s'étaient accrochées à ses vêtements et au pelage de son chien. Intrigué par leur surprenante résistance, il décide de les observer au microscope et c'est alors qu'il découvre leurs extrémités formées de petits crochets (Figure I-29). Il s'inspirera de ces crochets pour créer son invention acronyme des mots VELours et CROchet.



**Figure I-29** : (A) George de Mestral et son chien (photo : Charles de Mestral), (B) Crochets à l'extrémité des capitules d'*Arctium lappa* L. (photo : Jean M. Ollivier), (C) Système Velcro® avec la partie crochet (à gauche) et la partie velours (à droite) (photo : Hadley Paul Garlan)

Outre cette incroyable propriété, *Arctium lappa* L. est traditionnellement utilisée dans la pharmacopée chinoise et européenne pour traiter des pathologies comme les irritations de la gorge, les éruptions cutanées ainsi que différents problèmes de peau (Chan et *al.* 2011) et est appréciée comme plante comestible.

### 5.3 Vertus médicinales

Selon la Pharmacopée française, la partie de la bardane la plus utilisée est sa racine séchée (Pharmacopée française 1989). On note également quelques utilisations pour ses feuilles. La bardane possède de nombreuses vertus, elle est utilisée pour le traitement de maladies telles que le diabète (Tousch et *al.* 2014), la polyarthrite rhumatoïde (Saleem et *al.* 2019) ou encore l'acné (Miglani et Manchanda 2014). On peut retrouver la bardane dans plusieurs spécialités officinales telles que la tisane Bardane racine Vitaflor® ainsi que les gélules Arkogélule® Bardane et Elusane® Bardane (**Figure I-30**).



Figure I-30 : Spécialités officinales à base de bardane

Très récemment, la marque Nivea a créé une gamme de produits cosmétiques nommée « Naturally Good » composée de minimum 95% d'ingrédients d'origine naturelle. Parmi cette gamme de produits, la marque a développée deux produits de soin anti-âge contenant de l'extrait de graines de bardane bio revendiqué comme stimulant la production naturelle de collagène (Figure I-31).

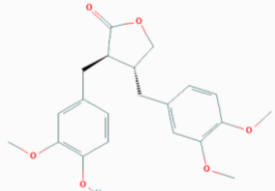
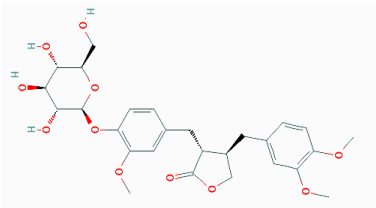
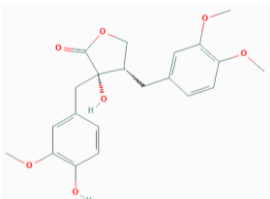
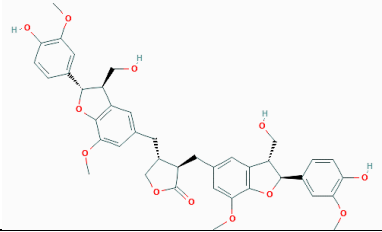
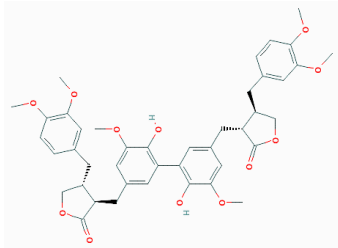


Figure I-31 : Produits cosmétiques de la marque Nivea à base d'extraits de bardane bio (site web : <https://www.nivea.fr/actualites-nivea/naturallygood-visage>)

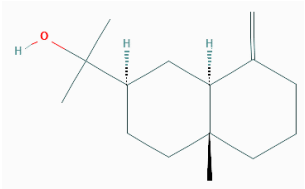
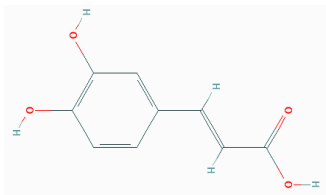
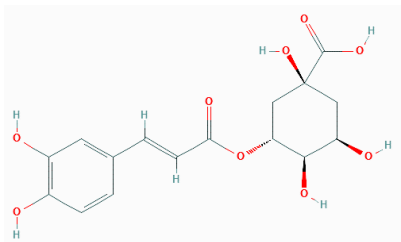
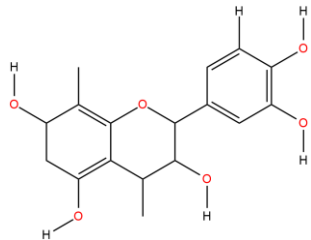
#### 5.4 Signature phytochimique

Les principales molécules actives retrouvées dans cette plante sont l'arctigénine, l'arctiine, le bêta-eudesmol, l'acide caféique, l'acide chlorogénique, l'inuline, la trachélogénine, le lappaol, la diarctigénine, le daucostérol et des tanins. L'ensemble de ces molécules ainsi que leur localisation au sein de la plante et les effets qui leur sont associés sont résumés dans le **Tableau I-4**.

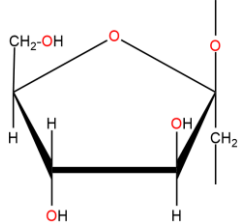
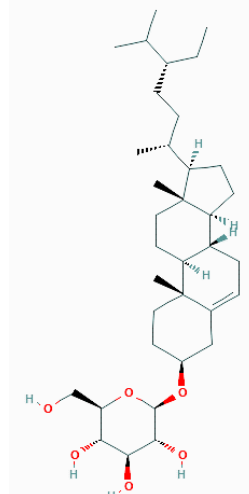
Tableau I-4 : Principaux composés de la bardane et leurs effets, d'après Chan et al. 2011

Classification	Composé	Formule chimique	Parties de la plante	Effets	Références bibliographiques
Lignanes	Arctigénine	 <chem>C12H24O7</chem>	Feuilles, fruits, graines et racines	Suppresseur de choc thermique, activité antitumorale, activité contre les virus grippaux	Ishihara et al. 2006 Awale et al. 2006 Gao et al. 2002
	Arctiine	 <chem>C27H34O11</chem>	Feuilles, fruits et racines	Activité antitumorale, activité chimiopréventive, activité antiproliférative contre les cellules d'hydridome à cellules B	Takasaki et al. 2000 Hirose et al. 2000 Matsumoto et al. 2006
	Trachélogénine	 <chem>C21H24O7</chem>	Fruits	Activité antagoniste de l'ion calcium, propriétés anti-VIH	Ichikawa et al. 1986 Xia et al. 2001
	Lappaol F	 <chem>C40H42O12</chem>	Fruits et graines	Inhibiteur de la production de monoxyde d'azote	Park et al. 2007
	Diarctigénine	 <chem>C42H46O12</chem>	Fruits, racines et graines	Inhibiteur de la production de monoxyde d'azote	Park et al. 2007

Suite **Tableau I-4**

Classification	Composé	Formule chimique	Parties de la plante	Effets	Références bibliographiques
Terpénoïdes	Béta-eudesmol 	$C_{15}H_{26}O$	Fruits	Anti-bactérien, anti-angiogénique	Yayli et <i>al.</i> 2005 Tsuneki et <i>al.</i> 2005
Polyphénols	Acide caféique 	$C_9H_8O_4$	Tiges, feuilles et écorces des racines	Antioxydant, activité de piégeage des radicaux libres	Pari et Prasath 2008 Bhat et <i>al.</i> 2007
	Acide chlorogénique 	$C_{16}H_{18}O_9$	Feuilles et écorces des racines	Neuroprotecteur, antioxydant, anti-anaphylaxie et anti-VIH	Li et <i>al.</i> 2008 Bouayed et <i>al.</i> 2007 Chen et <i>al.</i> 2004
	Tannin 	$C_{76}H_{52}O_{46}$	Racines	Antitumoral, immunomodulateur, inhibition de la hyaluronidase	Miyamoto et <i>al.</i> 1993 Bralley et <i>al.</i> 2008

Suite **Tableau I-4**

Classification	Composé	Formule chimique	Parties de la plante	Effets	Références bibliographiques
Fructose	Inuline 	$(C_6H_{10}O_5)_n$	Racines	Efficacité prébiotique, anti-hypertension, anti-diabète	Li et <i>al.</i> 2008 Rault-Nania et <i>al.</i> 2008 Silver et Krantz 1931
Stérols	Daucostérol 	$C_{35}H_{60}O_6$	Racines	Inhibiteur de l'ADN polymérase $\lambda$ de mammifère, anti-diabète et anti-obésité	Mizushina et <i>al.</i> 2006 Silver et Krantz 1931

Dans une revue de 2019, Wang et *al.* ont également listé les composés connus d'*Arctium lappa* L.. Dans cette revue, 190 composés non-volatils sont listés parmi lesquels des lignanes, des terpénoïdes, des flavonoïdes et des acides gras entre autres ainsi que 101 composés volatils dont des aldéhydes, des acides carboxyliques et des méthoxypyrazines par exemple.



La compréhension et l'identification des conditions de cultures adéquates pour une valorisation à la fois de la filière horticole et de l'industrie cosmétique nécessitent de s'appuyer sur des connaissances et des techniques développées en chimie analytique et en biochimie. C'est dans ce contexte d'étude de mélanges complexes comme des extraits végétaux que l'utilisation de techniques telles que la spectrométrie de masse, qui a depuis de nombreuses années présentée de nombreux atouts comme une détection rapide, sensible, précise et spécifique, nous intéresse pour permettre l'identification et la caractérisation d'extraits ainsi que la mise en place d'approches statistiques de métabolomique.

## 6 Objectifs

Lors de ce projet de recherche de nombreuses approches méthodologiques seront mises en place avec comme point de départ la mise en place des cultures innovantes décrites précédemment. Par la suite un suivi de la signature phytochimique des différents extraits issus de ces cultures innovantes sera effectué en s'appuyant sur la spectrométrie de masse. Ce suivi par spectrométrie de masse nous permettra grâce à une étude différentielle de mettre en évidence des molécules différenciantes entre les différentes conditions de cultures ce qui rendra éventuellement possible la compréhension de l'influence de ces modes de cultures sur la signature phytochimique dans le but d'optimiser ces derniers en vue d'une approche de culture à échelle industrielle.





# Références bibliographiques

**Akinwumi B., Bordun K.-A., & Anderson H. (2018).** Biological Activities of Stilbenoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 792. <https://doi.org/10.3390/ijms19030792>

**AlShrouf A. (2017).** *Hydroponics, Aeroponic and Aquaponic as Compared with Conventional Farming*. 27(1), 9

**Anasori P. & Asghari G. (2008).** Effects of light and differentiation on gingerol and zingiberene production in callus culture of *Zingiber officinale* Rosc. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 59-63

**Awale S., Lu J., Kalauni S. K., Kurashima Y., Tezuka Y., Kadota S., & Esumi H. (2006).** Identification of Arctigenin as an Antitumor Agent Having the Ability to Eliminate the Tolerance of Cancer Cells to Nutrient Starvation. *Cancer Research*, 66(3), 1751-1757. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3143>

**Barta D. J., Tibbitts T. W., Bula R. J., & Morrow R. C. (1992).** Evaluation of light emitting diode characteristics for a space-based plant irradiation source. *Advances in Space Research*, 12(5), 141-149. [https://doi.org/10.1016/0273-1177\(92\)90020-X](https://doi.org/10.1016/0273-1177(92)90020-X)

**Bhat S. H., Azmi A. S., & Hadi S. M. (2007).** Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes : Involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218(3), 249-255. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.11.022>

**Binder B. Y. K., Peebles C. A. M., Shanks J. V., & San K.-Y. (2009).** The effects of UV-B stress on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnology Progress*, 25(3), 861-865. <https://doi.org/10.1002/btpr.97>

**Blanco F. M. (1880).** *Flora de Filipinas—Gran edicion: Vol. Atlas 1* (Establecimiento tipográfico de Plana y C.)

**Bouayed J., Rammal H., Dicko A., Younos C., & Soulimani R. (2007).** Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *Journal of the Neurological Sciences*, 262(1-2), 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.06.028>

**Bralley E., Greenspan P., Hargrove J. L., & Hartle D. K. (2008).** Inhibition of hyaluronidase activity by select sorghum brans. *Journal of Medicinal Food*, 11, 307-312. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.547>

**Bruneton J. (1993).** *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. Lavoisier Tec&Doc.

- Buckseth T., Sharma A. K., Pandey K. K., Singh B. P., & Muthuraj R. (2016).** Methods of pre-basic seed potato production with special reference to aeroponics—A review. *Scientia Horticulturae*, 204, 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.041>
- Canel C., Moraes R. M., Dayan F. E., & Ferreira D. (2000).** Podophyllotoxin. *Phytochemistry*, 54, 115-120. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00094-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00094-7)
- Chan Y.-S., Cheng L.-N., Wu J.-H., Chan E., Kwan Y.-W., Lee S. M.-Y., Leung G. P.-H., Yu P. H.-F., & Chan S.-W. (2011).** A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock). *Inflammopharmacology*, 19(5), 245-254. <https://doi.org/10.1007/s10787-010-0062-4>
- Chaudhri S. K. & Jain N. K. (2009).** History of cosmetics. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 3(3), 164. <https://doi.org/10.4103/0973-8398.56292>
- Chen C.-C., Huang M.-Y., Lin K.-H., Wong S.-L., Huang W.-D., & Yang C.-M. (2014).** Effects of Light Quality on the Growth, Development and Metabolism of Rice Seedlings (*Oryza sativa* L.). *Research Journal of Biotechnology*, 9, 11
- Chen F.-A., Wu A.-B., & Chen C.-Y. (2004).** The influence of different treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active components. *Food Chemistry*, 86(4), 479-484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.020>
- Chen J. H. & Ho C.-T. (1997).** Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2374-2378. <https://doi.org/10.1021/jf970055t>
- Clark A. M., Jurgens T. M., & Hufford C. (1990).** Antimicrobial activity of juglone. *Phytotherapy Research*, 4(1), 11-14. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650040104>
- Croteau R., Kutchan T. M., & Lewis N .G. (2000).** Natural Products (Secondary Metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Vol. 24, p. 1250-1319). B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones
- Darko E., Heydarizadeh P., Schoefs B., & Sabzalian M. R. (2014).** Photosynthesis under artificial light : The shift in primary and secondary metabolism. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1640), 20130243. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0243>
- Delattre C., Pierre G., Michaud P., & Dussap C.-G. (2017).** De l'homme bio-inspiré aux matériaux du futur. *Biofutur*, 36(386), 44-49

- Delmas D., Jannin B., & Latruffe N. (2005).** Resveratrol : Preventing properties against vascular alterations and ageing. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(5), 377-395. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400098>
- Drouet S. (2019).** *Du Chardon Marie et des flavonolignanes (MARILINE) : Valorisation de la biodiversité structurale issue de populations sauvages et cultivées pour des applications cosmétiques* [Thèse de doctorat]. Université d'Orléans
- Dubrovina A. S. & Kiselev K. V. (2017).** Regulation of stilbene biosynthesis in plants. *Planta*, 246(4), 597-623. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2730-8>
- Durner J., Shah J., & Klessig D. F. (1997).** Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in plant science*, 2, 266-274. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)86349-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)86349-2)
- Fabre B., Fort-Lacoste L., & Jean-Jean M. (2004).** *Utilisation du quinquina pour la préparation d'un médicament stimulant l'angiogenèse* (Patent N° WO 2004/089390 A2)
- Fan X. X., Zang J., Xu Z. G., Guo S. R., Jiao X. L., Liu X. Y., & Gao Y. (2013).** Effects of different light quality on growth, chlorophyll concentration and chlorophyll biosynthesis precursors of non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(9), 2721-2726. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1304-z>
- Farag M., Mohammed M. S., Foud I., Ahmed W. J., & Mohamed M. S. (2015).** The role of natural products in drug discovery and development. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(3), 13
- Galeotti N., Di Cesare Mannelli L., Mazzanti G., Bartolini A., & Ghelardini C. (2002).** Menthol : A natural analgesic compound. *Neuroscience Letters*, 4
- Gao Y., Dong X., Kang T. G., Zhao C. Z., Huang Z., & Zhang X. Y. (2002).** Activity of in vitro antiinfluenza virus of arctigenine. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 33, 724-726
- GBIF Secretariat. (2019).** *GBIF Backbone Taxonomy : Checklist dataset*. <https://doi.org/10.15468/39omei>
- Georgiev V., Slavov A., Vasileva I., & Pavlov A. (2018).** Plant cell culture as emerging technology for production of active cosmetic ingredients. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 779-798. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800066>
- Ghedira K. & Goetz P. (2013).** *Arctium lappa* L. (Asteraceae) : Bardane. *Phytothérapie*, 11(6), 376-380. <https://doi.org/10.1007/s10298-013-0827-1>

- Gülçin İ., Huyut Z., Elmastaş M., & Aboul-Enein H. Y. (2010).** Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(1), 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2009.12.008>
- Haberlandt G. (1969).** Experiments on the culture of isolated plant cells. *The Botanical Review*, 35(1), 68-88. <https://doi.org/10.1007/BF02859889>
- Hardy K., Buckley S., Collins M. J., Estalrich A., Brothwell D., Copeland L., García-Tabernero A., García-Vargas S., Rasilla M., Lalueza-Fox C., Huguet R., Bastir M., Santamaría D., Madella M., Wilson J., ernández Cortés A., & Rosas A. (2012).** Neanderthal medics : Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften*, 99(8), 617-626. <https://doi.org/10.1007/s00114-012-0942-0>
- Hartmann T. (2007).** From waste products to ecochemicals : Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-2846. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>
- Hirose M., Yamaguchi T., Lin C., Kimoto N., Futakuchi M., Kono T., Nishibe S., & Shirai T. (2000).** Effects of arctiin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female Sprague–Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Letters*, 155(1), 79-88. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(00\)00411-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00411-0)
- Ichikawa K., Kinoshita T., Nishibe S., & Sankawa U. (1986).** The Ca<sup>2+</sup> antagonist activity of lignans. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 24(8), 3514-3517
- Ishihara K., Yamagishi N., Saito Y., Takasaki M., Konoshima T., & Hatayama T. (2006).** Arctigenin from *Fructus Arctii* is a novel suppressor of heat shock response in mammalian cells. *Cell Stress*, 8
- Jain P. K. & Joshi H. (2012).** Coumarin : Chemical and Pharmacological Profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(6), 236-240. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2643>
- Janin C. (2017).** Caoutchouc naturel. *Techniques de l'ingénieur*, 11
- Khales A. & Baaziz M. (2006).** Etude des peroxydases d'écotypes d'opuntia ficus indica L. en relation avec le développement dans des conditions de stress salin. Deuxième Congrès International de Biochimie, Agadir (Maroc)
- Kim H. K., Son K. H., Chang H. W., Kang S. S., & Kim H. P. (1998).** Amentoflavone, a Plant Biflavone : A New Potential Anti-inflammatory Agent. *Archives of Pharmacal Research*, 22(4), 406-430

- Koes R. E., Quattrocchio F., & Mol J. N. M. (1994).** The flavonoid biosynthetic pathway in plants : Function and evolution. *BioEssays*, 16(2), 123-132. <https://doi.org/10.1002/bies.950160209>
- Kukula-Koch W. A. & Widelski J. (2017).** Alkaloids. In *Pharmacognosy* (p. 163-198). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00009-3>
- Lee J. N., Choi J. E., Kim S. W., Lee K. T., & Lee K. K. (2010).** *Cosmetic composition for skin whitening comprising arctiin, arctigenin or the mixture thereof as active* (Patent N° US 2010/0104524 A1)
- Levigneron A., Lopez F., Vansuyt G., Berthomieu P., Fourcroy P., & Casse-Delbart F. (1995).** Les plantes face au stress salin. *Cahiers Agricultures*, 4, 263-273
- Li C., Ford E. S., Zhao G., Balluz L. S., Giles W. H., & Liu S. (2011).** Serum  $\alpha$ -Carotene Concentrations and Risk of Death Among US Adults : The Third National Health and Nutrition Examination Survey Follow-up Study. *Archives of Internal Medicine*, 171(6). <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2010.440>
- Li Y., Shi W., Li Y., Zhou Y., Hu X., Song C., Ma H., Wang C., & Li Y. (2008).** Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26(1), 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.12.008>
- Liu C.-X. & Ye G.-Z. (1991).** Choleretic activity of p-hydroxyacetophenone isolated from *Artemisia scoparia* Waldst. Et Kit. In the rat. *Phytotherapy Research*, 5(4), 182-184. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650050410>
- Lobiuc A., Vasilache V., Oroian M., Stoleru T., Burducea M., Pintilie O., & Zamfirache M.-M. (2017).** Blue and Red LED Illumination Improves Growth and Bioactive Compounds Contents in Cyanic and Cyanic *Ocimum basilicum* L. Microgreens. *Molecules*, 22(12), 2111. <https://doi.org/10.3390/molecules22122111>
- Matsumoto T., Hosono-Nishiyama K., & Yamada H. (2006).** Antiproliferative and apoptotic effects of butyrolactone lignans from *Arctium lappa* on leukemic cells. *Planta Medica*, 72, 276-278. <https://doi.org/10.1055/s-2005-916174>
- Miglani A. & Manchanda R. K. (2014).** Observational study of *Arctium lappa* in the treatment of acne vulgaris. *Homeopathy*, 103(3), 203-207. <https://doi.org/10.1016/j.homp.2013.12.002>
- Miura T., Ichiki H., Hashimoto I., Iwamoto N., Kao M., Kubo M., Ishihara E., Komatsu Y., Okada M., Ishida T., & Tanigawa K. (2001).** Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin. *Phytomedicine*, 8(2), 85-87. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00009>

- Miyamoto K., Nomura M., Sasakura M., Matsui E., Koshiura R., Murayama T., Furukawa T., Hatano T., Yoshida T., & Okuda T. (1993).** Antitumor activity of oenothien B, a unique macrocyclic ellagitannin. *Japanese Journal of Cancer Research*, 84, 99-103
- Mizushima Y., Nakanishi R., Kuriyama I., Kamiya K., Satake T., Shimazaki N., Koiwai O., Uchiyama Y., Yonezawa Y., Takemura M., Sakaguchi K., & Yoshida H. (2006).**  $\beta$ -Sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside : A eukaryotic DNA polymerase  $\lambda$  inhibitor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 99(2-3), 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2005.12.007>
- Monteiro É., Chibli L., Yamamoto C., Pereira M., Vilela F., Rodarte M., De Oliveira Pinto M., Da Penha Henriques do Amaral M., Silvério M., De Matos Araújo A., Da Luz André de Araújo A., Del-Vechio-Vieira G., & De Sousa O. (2014).** Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Sesame Oil and Sesamin. *Nutrients*, 6(5), 1931-1944. <https://doi.org/10.3390/nu6051931>
- Muséum national d'Histoire naturelle. (2003, 2021).** *Inventaire National du Patrimoine Naturelle*. <https://inpn.mnhn.fr>
- Naikoo M. I., Dar M. I., Raghib F., Jaleel H., Ahmad B., Raina A., Khan F. A., & Naushin F. (2019).** Role and Regulation of Plants Phenolics in Abiotic Stress Tolerance. In *Plant Signaling Molecules* (p. 157-168). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00009-5>
- Noge K. (2009).** *Germacrene D, A Common Sesquiterpene in the Genus Bursera (Burseraceae)*. 9
- Otazù V. (2010).** *Manual on Quality Seed Potato Production Using Aeroponics*. International Potato Center (CIP)
- Panche A. N., Diwan A. D., & Chandra S. R. (2016).** Flavonoids : An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pari L. & Prasath A. (2008).** Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats. *Chemico-Biological Interactions*, 173(2), 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.02.010>
- Parish L. C. & Crissey J. T. (1988).** Cosmetics : A historical review. *Clinics in Dermatology*, 6(3), 1-4. [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(88\)90024-7](https://doi.org/10.1016/0738-081X(88)90024-7)
- Park S. Y., Hong S. S., Han X. H., Hwang J. S., Lee D., Ro J. S., & Hwang B. Y. (2007).** Lignans from *Arctium lappa* and Their Inhibition of LPS-Induced Nitric Oxide Production. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(1), 150-152. <https://doi.org/10.1248/cpb.55.150>

**Pathak M. A. & Fitzpatrick T. B. (1992).** The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA) : 2000 BC to 1992 AD. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 14(1-2), 3-22. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(92\)85080-E](https://doi.org/10.1016/1011-1344(92)85080-E)

**Pharmacopée française (Éd.). (1989).** *Bardane (Grande)*

**Rault-Nania M.-H., Demougeot C., Gueux E., Berthelot A., Dzimira S., Rayssiguier Y., Rock E., & Mazur A. (2008).** Inulin supplementation prevents high fructose diet-induced hypertension in rats. *Clinical Nutrition*, 27(2), 276-282. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2008.01.015>

**Renaud S. & de Lorgeril M. (1992).** Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339(8808), 1523-1526. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91277-F](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91277-F)

**Retig N. & Chet I. (1974).** Catechol-induced resistance of tomato plants to *Fusarium* wilt. *Physiological Plant Pathology*, 4(4), 469-475. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(74\)90032-0](https://doi.org/10.1016/0048-4059(74)90032-0)

**Rodríguez-García C., Sánchez-Quesada C., Toledo E., Delgado-Rodríguez M., & Gaforio J. (2019).** Naturally Lignan-Rich Foods : A Dietary Tool for Health Promotion? *Molecules*, 24(5), 917. <https://doi.org/10.3390/molecules24050917>

**Rogério A. P., Kanashiro A., Fontanari C., da Silva E. V. G., Lucisano-Valim Y. M., Soares E. G., & Faccioli L. H. (2007).** Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation Research*, 56(10), 402-408. <https://doi.org/10.1007/s00011-007-7005-6>

**Ruyters G. (1982).** Effects of blue-light on pyruvate kinase activity during chloroplasts development of unicellular green algae. *Photochemistry and Photobiology*, 35(2), 229-231. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1982.tb03837.x>

**Saleem S., Khan R., Kazmi I., & Afzal M. (2019).** Medicinal Plants in the Treatment of Arthritis. In Ozturk M. & Hakeem K. R. (Éds.), *Plant and Human Health* (Vol. 3, p. 101-137). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-04408-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-04408-4_6)

**Sharkey T. D. & Singas E. L. (1995).** Why plants emit isoprene. *Nature*, 374(6525), 769-769. <https://doi.org/10.1038/374769a0>

**Shimizu B.-I. (2014).** 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases in the biosynthesis of simple coumarins. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00549>

**Silver A. A. & Krantz J. C. Jr. (1931).** The effect of the ingestion of burdock root on normal and diabetic individuals : A preliminary report. *Annals of Internal Medicine*, 5, 274. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-5-3-274>



- Simmons T. L. (2008).** *Characterization of New Marine Secondary Metabolites for the Treatment of Cancer and Neglected Tropical Diseases* [Thèse de doctorat]. University of California, San Diego
- Spencer C. M. & Faulds D. (1994).** Paclitaxel : A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Potential in the Treatment of Cancer. *Drugs*, 48, 794-847
- Steward F. C., Mapes M. O., & Mears K. (1958).** Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. *American Journal of Botany*, 45(10), 705. <https://doi.org/10.2307/2439728>
- Takasaki M., Konoshima T., Komatsu K., Tokuda H., & Nishino H. (2000).** Anti-tumor-promoting activity of lignans from the aerial part of *Saussurea medusa*. *Cancer Letters*, 158(1), 53-59. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(00\)00499-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00499-7)
- Thakur M., Bhattacharya S., Khosla P. K., & Puri S. (2019).** Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.11.004>
- Thomé O. W. (1885).** *Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz*
- Touré A. & Xueming X. (2010).** Flaxseed Lignans : Source, Biosynthesis, Metabolism, Antioxidant Activity, Bio-Active Components, and Health Benefits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 261-269. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00105.x>
- Tousch D., Bidel L. P. R., Cazals G., Ferrare K., Leroy J., Faucanié M., Chevassus H., Tournier M., Lajoix A.-D., & Azay-Milhau J. (2014).** Chemical Analysis and Antihyperglycemic Activity of an Original Extract from Burdock Root ( *Arctium lappa* ). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(31), 7738-7745. <https://doi.org/10.1021/jf500926v>
- Tsuneki H., Ma E.-L., Kobayashi S., Sekizaki N., Maekawa K., Sasaoka T., Wang M.-W., & Kimura I. (2005).** Antiangiogenic activity of  $\beta$ -eudesmol in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmacology*, 512(2-3), 105-115. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.02.035>
- Umezawa T. (2003).** Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, 2(3), 371-390. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000045487.02836.32>
- Vattem D. A., R. Randhir, & Shetty K. (2005).** Cranberry phenolics-mediated elicitation of antioxidant enzyme response in fava bean (*Vicia faba*) sprouts. *Journal of Food Biochemistry*, 29(1), 41-70. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2005.00007.x>



- Venugopala K. N., Rashmi V., & Odhav B. (2013).** Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. *BioMed Research International*, 2013, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2013/963248>
- Wang D., Bădărau A. S., Swamy M. K., Shaw S., Maggi F., da Silva L. E., López V., Yeung A. W. K., Mocan A., & Atanasov A. G. (2019).** *Arctium* Species Secondary Metabolites Chemodiversity and Bioactivities. *Frontiers in Plant Science*, 10, 834. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00834>
- Weyrich L. S., Duchene S., Soubrier J., Arriola L., Llamas B., Breen J., Morris A. G., Alt K. W., Caramelli D., Dresely V., Farrell M., Farrer A. G., Francken M., Gully N., Haak W., Hardy K., Harvati K., Held P., Holmes E. C., Kaidonis J., Lalueza-Fox C., de la Rasilla M., Rosas A., Semal P., Soltysiak A., Townsend G., Usai D., Wahl J., Huson D. H., Dobney K., Cooper A. (2017).** Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus. *Nature*, 544(7650), 357-361. <https://doi.org/10.1038/nature21674>
- Whiting D. A. (1985).** Lignans and neolignans. *Natural Products Reports*, 191-211
- Wołosik K., Knaś M., Zalewska A., Niczyporuk M., & Wojciech Przystupa A. (2013).** The importance and perspective of plant-based squalene in cosmetology. *JOURNAL OF COSMETIC SCIENCE*, 64, 59-65
- Xia Z.-Q., Costa M. A., Pélissier H. C., Davin L. B., & Lewis N. G. (2001).** Secoisolariciresinol Dehydrogenase Purification, Cloning, and Functional Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12614-12623. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008622200>
- Yayli N., Yaşar A., Güleç C., Usta A., Kolaylı A., Coşkunçelebi K., & Karaoğlu Ş. (2005).** Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. *Phytochemistry*, 66(14), 1741-1745. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.006>
- Zwenger S. & Basu C. (2008).** *Plant terpenoids : Applications and future potentials*. 7



# Chapitre II: Stratégies mises en place pour la valorisation de plantes locales – Approches de cultures innovantes et caractérisation métabolomique





# Table des matières

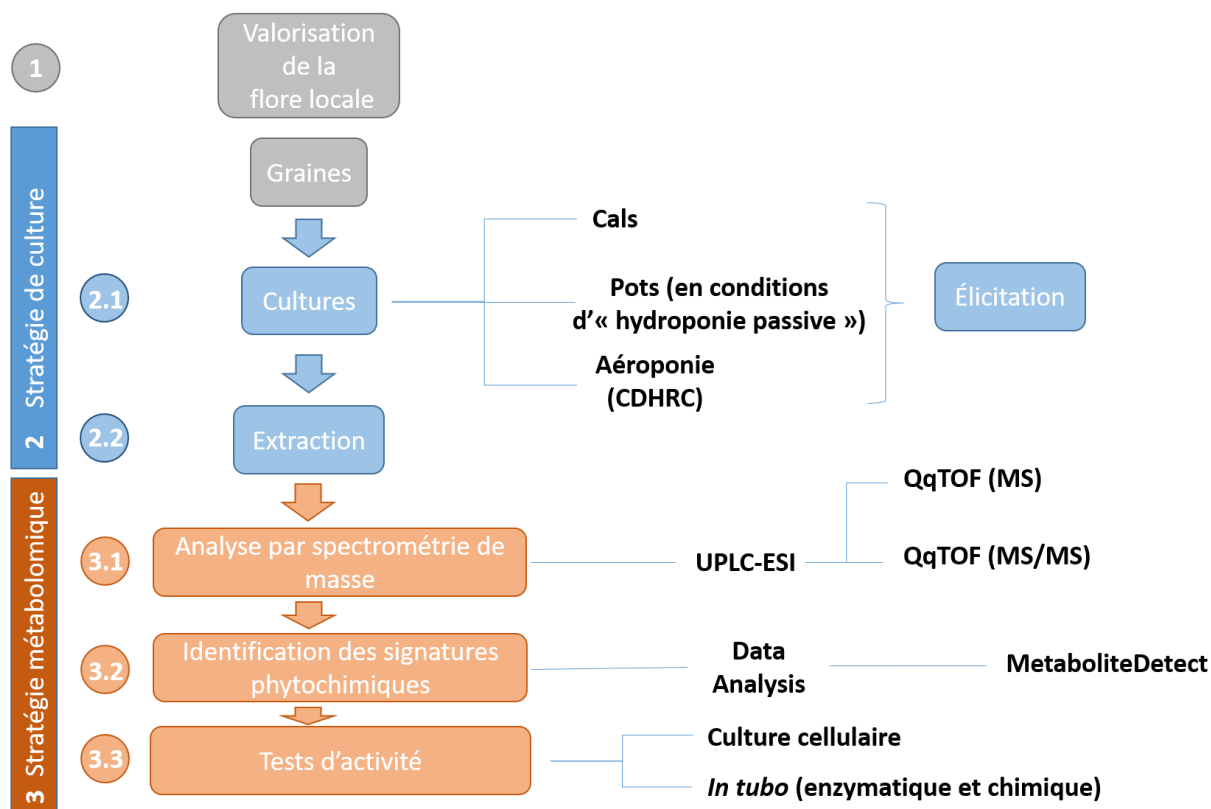
<b>CHAPITRE II: STRATEGIES MISES EN PLACE POUR LA VALORISATION DE PLANTES LOCALES – APPROCHES DE CULTURES INNOVANTES ET CARACTERISATION METABOLOMIQUE.....</b>	<b>64</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>65</b>
<b>1 VALORISATION DE LA FLORE LOCALE : CHOIX DES PLANTES ETUDIEES .....</b>	<b>68</b>
<b>2 LES DIFFERENTS MODES DE CULTURE MIS EN ŒUVRE .....</b>	<b>69</b>
2.1 Mise en culture des plantes et élicitation lumineuse .....	69
2.1.1 La culture de cals.....	69
2.1.2 La culture en pot ou hydroponie passive.....	72
2.1.3 La culture aéroponique ou hydroponie active.....	73
2.1.4 Le mode d'élicitation lumineuse .....	75
2.1.4.1 Protocole d'élicitation lumineuse appliqué sur les cals.....	75
2.1.4.2 Protocole d'élicitation lumineuse appliqué aux plantes cultivées en hydroponie passive. ....	76
2.1.4.3 Protocole d'élicitation lumineuse appliqué aux plantes cultivées en hydroponie active .....	76
<b>3 METHODOLOGIE D'EXTRACTION .....</b>	<b>77</b>
3.1 Les ultrasons.....	77
3.2 L'extraction assistée par ultrasons.....	78
<b>4 STRATEGIE METABOLOMIQUE.....</b>	<b>79</b>
4.1 Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse .....	79
4.1.1 La chromatographie liquide de haute performance .....	79
4.1.2 Caractéristiques du spectromètre de masse utilisé pour cette étude.....	81
4.1.2.1 La source d'ionisation .....	81
i) Formation des gouttelettes .....	82
ii) Fission des gouttelettes .....	82
iii) Émission des ions en phase gazeuse.....	83
iv) Ionisation en mode positif .....	84
v) Ionisation en mode négatif.....	84
4.1.2.2 L'analyseur .....	85
4.2 Identification des signatures phytochimiques – Traitement statistique des données .....	86
4.3 Tests basés sur des allégations cosmétiques .....	89
4.3.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) : acteurs du stress oxydatif cellulaire .....	90

4.3.1.1 Les antioxydants enzymatiques .....	91
4.3.1.2 Les antioxydants non-enzymatiques.....	91
4.3.1.3 Test cellulaire in vitro.....	93
4.3.1.4 Test de dosage des composés phénoliques totaux : méthode de Folin-Ciocalteu.....	96
4.3.1.5 Tests d'activités antioxydantes in tubo .....	97
i) Méthode TEAC ou ABTS .....	97
ii) Test DPPH.....	99
iii) Test CUPRAC.....	99
4.3.2 La tyrosinase : cible pour le traitement de l'hyperpigmentation .....	101
4.3.3 Deux autres enzymes impliquées dans les processus de vieillissement cellulaire, l'élastase et la collagénase.....	108
4.3.3.1 L'élastine et l'élastase .....	108
4.3.3.2 Le collagène et la collagénase.....	111
<b>5 EN RESUME .....</b>	<b>114</b>
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u></b>	<b><u>115</u></b>

Avant d'exposer l'optimisation des différentes méthodes effectuées au cours de ces recherches portant sur l'évaluation de l'apport de culture innovante sur la production d'actifs pour la cosmétique, il convient de présenter les stratégies employées et les techniques choisies pour répondre à la problématique de notre étude. Ainsi ce chapitre abordera les connaissances actuelles et les principes des différentes techniques employées dans le cadre de la thèse. Tout au long de ce chapitre, des encadrés afficheront les conditions expérimentales appliquées dans le cadre de cette thèse.

Dans le contexte de la recherche de nouveaux actifs ou bien d'une production bioguidée, des techniques de cultures innovantes sont apparues telles que les cultures dites biotechnologiques de cals ou de suspensions cellulaires, les cultures hors sol telles que l'aéroponie ou l'hydroponie, ou bien encore l'utilisation de système d'élicitation lumineuse. Parallèlement, l'évolution des techniques séparatives couplées à la spectrométrie de masse et des outils bio-informatiques a contribué ces dernières décennies au développement de l'approche métabolomique permettant l'interprétation de nombreux échantillons complexes de type biologique ou végétal.

C'est dans ce contexte que nous avons présenté de façon schématisée à la **Figure II-1** les deux stratégies au cœur de cette thèse sur l'évaluation de l'apport de méthodes de culture innovantes sur des plantes locales dans le domaine de la cosmétique.



**Figure II-1** : Présentation des différentes étapes mises en jeu lors de l'approche de valorisation du végétal dans le cadre de notre étude

Avant de présenter les différentes étapes de ces stratégies qui ont été mises en place, il est primordial d'exposer le contexte donnant lieu à la sélection des plantes effectuée par l'ensemble des partenaires du projet ValBioCosm'.

## 1 Valorisation de la flore locale : choix des plantes étudiées

Dans le cadre de la valorisation du patrimoine végétal local, le programme ValBioCosm' et ses partenaires industriels ont mis en avant trois catégories de plantes : 1) des plantes d'intérêt pour la filière horticole, 2) des plantes issues de la biodiversité locale et 3) des plantes dont le ou les co-produits issus de l'agriculture locale ne sont pas exploités. C'est ainsi que treize plantes (**Tableau II-1**) ont été sélectionnées à partir de ces critères et au regard de leurs activités potentielles.

**Tableau II-1** : Liste des 13 plantes sélectionnées au départ du projet

Nom commun	Nom anglais	Nom latin
Alchémille vulgaire	Lady's mantle	<i>Alchemilla vulgaris</i> L.
Grande bardane	Great burdock	<i>Arctium lappa</i> L.
Cerise	Cherry	<i>Prunus cerasus</i> L.
Chardon Marie	Milk thistle	<i>Silybum marianum</i> L. Gaertn
Chicorée	Chicory	<i>Cichorium intybus</i> L.
Coleus	Dragon coleus	<i>Plectranthus scutellarioides</i> , le plus employé <i>Coleus blumei</i> Benth.
Echinacée pourpre	Purple coneflower	<i>Echinacea purpurea</i> L. Moench
Gentiane	Yellow gentian	<i>Gentiana lutea</i> L.
Lin	Flax	<i>Linum usitatissimum</i> L.
Ortie	Stinging nettle	<i>Urtica dioica</i> L.
Pensées sauvages	Heartsease	<i>Viola tricolor</i> L.
Trèfle rouge	Red clover	<i>Trifolium pratense</i> L.
Vigne	Grapevine	<i>Vitis vinifera</i> L.

Dans ce travail de thèse, il a été décidé dans le consortium de nous focaliser sur une plante des treize plantes à savoir la grande bardane en raison des résultats obtenus lors de tests d'activités qui seront discutés dans le **Chapitre III**.



Les graines de cette plante ont été achetées soit sur le site [www.rareplants.de](http://www.rareplants.de) pour la bardane cultivée en pot, soit sur le site [www.comptoir-des-graines.fr](http://www.comptoir-des-graines.fr) pour les plants de bardane cultivés sous serre.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai participé à la mise en place de différentes cultures telles que les cals, l'aéroponie et l'élicitation dans ce programme avec un transfert de compétences entre les partenaires académiques. C'est ainsi que je présenterais brièvement le principe de ces modes de culture avant de présenter plus en détails ceux utilisés dans mon sujet propre d'élicitation de plantes en culture pot, en conditions d'« hydroponie passive », et en aéroponie.

## 2 Les différents modes de culture mis en œuvre

### 2.1 Mise en culture des plantes et élicitation lumineuse

Comme décrits dans le **Chapitre I**, de nombreuses méthodes de cultures biotechnologiques, traditionnelles ou innovantes sont mises en œuvre pour améliorer la production de molécules d'origine naturelle potentiellement actives dans le domaine de la santé et de la cosmétique.

#### 2.1.1 La culture de cals

Dans le cadre de nos travaux, la culture biotechnologique de cals a été utilisée en première intention pour vérifier la mise en place d'un système d'élicitation lumineuse sur un modèle simple de culture *in vitro* de plante. Ce mode de culture végétale consiste en la culture d'explants de plantes, sur un milieu synthétique, dans des conditions stériles, dans un environnement contrôlé et dans un espace réduit. On parlera alors d'organogénèse indirecte qui conduit à la formation d'organes végétaux à partir de tissus de cals provenant d'explants. Un cal est défini comme étant un amas de cellules végétales indifférenciées et totipotentes obtenu par culture *in vitro* ou par réaction naturelle de la plante suite à une blessure ou à une infection. Ce stade de cals est une étape importante notamment dans la mise au point de suspensions cellulaires et dans la constitution d'un matériel végétal indifférencié et en division (Georgiev et *al.* 2018). L'intérêt des cals est de pallier les contraintes de croissance de la plante et permet d'avoir une production de biomasse indéfinie indépendamment du climat ou de la saison. Un autre avantage de la culture *in vitro* de cals est de pouvoir modifier l'expression d'un ou plusieurs gènes et/ou de permettre une élicitation plus aisée qu'elle soit chimique ou lumineuse.

La callogenèse, dans un contexte général, peut être réalisée à partir de différentes parties d'une plante, en général ce sont les tiges et les feuilles qui sont le plus utilisées. La partie de la plante choisie est découpée en morceaux de quelques centimètres en milieu stérile après avoir été stérilisée si elle ne provenait pas de plante issue de culture stérile *in vitro* puis placée sur un milieu solide de type

Murashige et Skoog (Murashige et Skoog 1962) dépourvu d'hormones, en boîte de pétri, à l'obscurité pendant plusieurs semaines. Après l'apparition de cals cicatriciels, ceux-ci sont transférés sur un second milieu contenant des régulateurs de croissance de type auxine et cytokine permettant de favoriser le développement des cals. Les cals sont ensuite entretenus et/ou multipliés régulièrement sur leur milieu de croissance. L'ensemble des étapes de la callogenèse est schématisé dans la **Figure II-2**.

Les cals de bardane ont été initiés à partir de tissus foliaires, provenant d'explants cultivés en milieu stérile, sur un milieu solide MS0 dépourvu d'hormones (**Tableau II-2**) (Murashige et Skoog, 1962). Lorsque des cals cicatriciels se forment un milieu solide dérivé du milieu MS0 est utilisé, le milieu M2 (**Tableau II-2, Tableau II-3, Tableau II-4, Tableau II-5**). Le milieu M2 est un milieu contenant des régulateurs de croissance, des hormones végétales, qui dans notre cas sont l'auxine acide 1-naphtalène acétique (ANA, 0.5 mg/L final) et la cytokine 6-benzylaminopurine (BAP, 2 mg/L final), permettant le développement des cals. Les cals obtenus forment des amas cellulaires et sont multipliés et repiqués en boîte de Pétri sur milieu solide M2 tous les 14 jours.

**Tableau II-3** : Composition du Fe-EDTA d'après Murashige et Skoog, 1962. \*Les composés sont dissouts séparément dans 500 mL avant l'addition lente de la solution de sulfate de fer dans la solution de sulfate di-sodique

Sel	Concentration finale MS1x (mg/L)	Solution mère concentrée 100x (g/L)
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O*	27,8	2,78
Na <sub>2</sub> -EDTA*	37,3	3,73

**Tableau II-4** : Composition des vitamines de Morel et Wetmore d'après Morel et Wetmore 1951. Les vitamines sont filtrées sur une membrane de 0,20 µm après stérilisation du milieu à l'autoclave à partir d'une solution concentrée 200x

**Tableau II-2** : Composition des milieux de culture des cals pour 1 L, <sup>1</sup>Murashige et Skoog, 1962 ; <sup>2</sup>Ajouté stérilement après autoclave

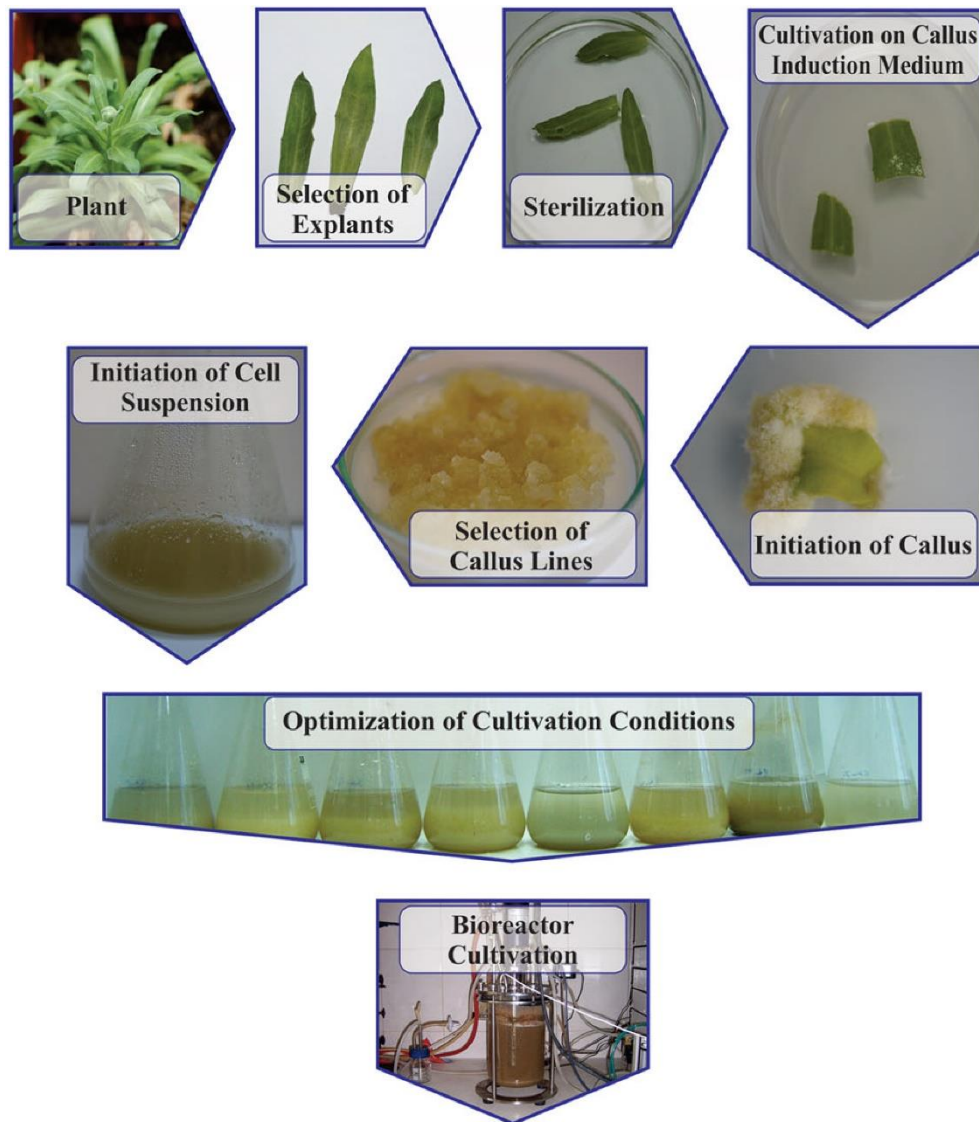
	Concentration finale	Solution mère
Thiamine-HCl	1,0	M2,2
Acide nicotinique	1,0	0,2
Pyridoxine-HCl	1,0	0,1
Ca-pantothenate	1,0	0,1
Biotine	0,01	3,0
MES	0,63g	0,63g
Vitamines <sup>2</sup>	Morel et Wetmore, 1951	Morel et Wetmore, 1951
pH	5,7	5,7
Régulateurs de croissance <sup>2</sup>	-	ANA : 0,5mg/L BAP : 2mg/L
Agent gélifiant	Gelrite : 3g	Gelrite : 3g

Ce type d'approche de culture a été initié dans le cadre de ma thèse au sein du laboratoire LBLGC de Chartres et a fait l'objet d'un transfert de compétences au sein du laboratoire Biomolécules et Biotechnologie Végétale (BBV EA 2106) de Tours, partenaire du projet ValBioCosm', en vue d'une élicitation de ces dernières et pour une production de suspension cellulaires. Cette collaboration a fait l'objet de valorisation (Bose et *al.* 2020).

**Tableau II-5 :** Composition des macroéléments (à gauche) et des microéléments (à droite) d'après Murashige et Skoog, 1962

Sel macroélément	Concentration finale MS1x (mg/L)	Solution mère concentrée 10x (g/L)	Sel microélément	Concentration finale MS1x (mg/L)	Solution mère concentrée 100x (mg/L)
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	370	3,7	MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	16,9	1690
KNO <sub>3</sub>	1900	19,0	ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	8,6	860
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	440	4,4	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	620
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	16,5	KI	0,83	83
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,7	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,25	25

Une fois que les cals de bardane ont atteints une taille comprise entre un centimètre et un centimètre et demi de diamètre, ils sont placés au nombre de 6 dans des boîtes de Pétri contenant du milieu solide M2 pour subir une élicitation lumineuse ou chimique dont les modes d'applications seront explicités plus tard dans ce chapitre. Cette technique de culture de tissus *in vitro* offre ainsi la possibilité d'obtenir un nombre considérable de cellules végétales à partir d'un fragment de tissu de quelques millimètres, dans un espace plus réduit, pendant une durée plus courte et donc à moindre coût. De plus, les cals peuvent également servir comme précurseurs à l'obtention de suspensions cellulaires (**Figure II-3**), il suffira alors d'introduire les cals dans un milieu de culture liquide stérile et d'appliquer une agitation constante afin de séparer les cellules des amas. Les suspensions pourront ensuite être cultivées en bioréacteur afin d'envisager une production à l'échelle industrielle.



**Figure II-2 :** Représentation schématique des étapes de développement de suspensions cellulaires à partir de culture de cals, Georgiev et al. 2018

Néanmoins, des connaissances encore mal définies sur les mécanismes physiologiques et biochimiques du déclenchement de la callogenèse ou de l'embryogenèse peuvent limiter l'application de ces techniques à toutes les plantes.

Outre la culture de cals issus de feuille ou de tige, j'ai été amené à faire une culture plus classique en pot placée en conditions d'hydroponie passive afin de faciliter le passage vers l'aéroponie à l'échelle semi-pilote des conditions d'élucation lumineuse.

### 2.1.2 La culture en pot ou hydroponie passive

La culture de plante en pot est une méthode de culture classique des plantes qui nécessite néanmoins un minimum de connaissances notamment sur la taille et la matière des pots, sur les substrats, sur la gestion de la fertilité optimisée par l'utilisation d'engrais, sur la gestion de l'éclairage, de l'ombrage, de l'humidité, de la température et sur la lutte contre les maladies et les ravageurs. La culture en pot est simple à mettre en œuvre, les plantes peuvent ainsi être cultivées à l'abri des

intempéries extérieurs sous abri, sous serre ou à l'intérieur. Cependant, cette méthode de culture présente des inconvénients particulièrement si la partie de la plante sur laquelle se porte notre intérêt est la racine, comme pour la bardane. En effet avec cette méthode de culture la racine n'est pas accessible et il faudra donc déterrer la plante, ce qui conduira à sa mort, et ensuite nettoyer la racine avant de pouvoir l'utiliser, ce qui engendre donc un coût supplémentaire dans la chaîne de production.

La culture en pot est réalisée à partir de graines qui sont semées dans des pots pouvant être en plastique, en terre cuite ou encore biodégradable comme par exemple des pots en tourbe. Le semis peut être effectué dans différentes terres tels que de la terre de jardin, du terreau ou encore de la terre végétale, terre de jardin supplémentée en amendement et en matière organique.

Pour la bardane (*Arctium lappa* L.), les graines sont directement semées dans des pots en plastique noir (dimensions : 7 cm x 7 cm x 6,5 cm, contenance 0,24 L) contenant du terreau universel (contenant N : 90 g/m<sup>3</sup>, K : 60 g/m<sup>3</sup>, P : 60 g/m<sup>3</sup>). Les pots sont placés dans une pièce de culture à 22°C et exposés à une photopériode de 16 heures avec un éclairage en lumière blanche de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  PAR (Photosynthetically Active Radiations) et dans un bac contenant de l'eau, c'est l'hydroponie passive.

Ici les pots étant placés dans un bac contenant constamment de l'eau, la plante est irriguée par capillarité au sein du substrat, on peut alors parler d'hydroponie passive. Lorsque les plants possèdent environ 5 feuilles, ils sont utilisés pour subir une élicitation lumineuse en chambre noire, sous des systèmes de lampes à LED et avec différentes lumières, qui sera expliquée plus en détails dans la suite de ce chapitre.

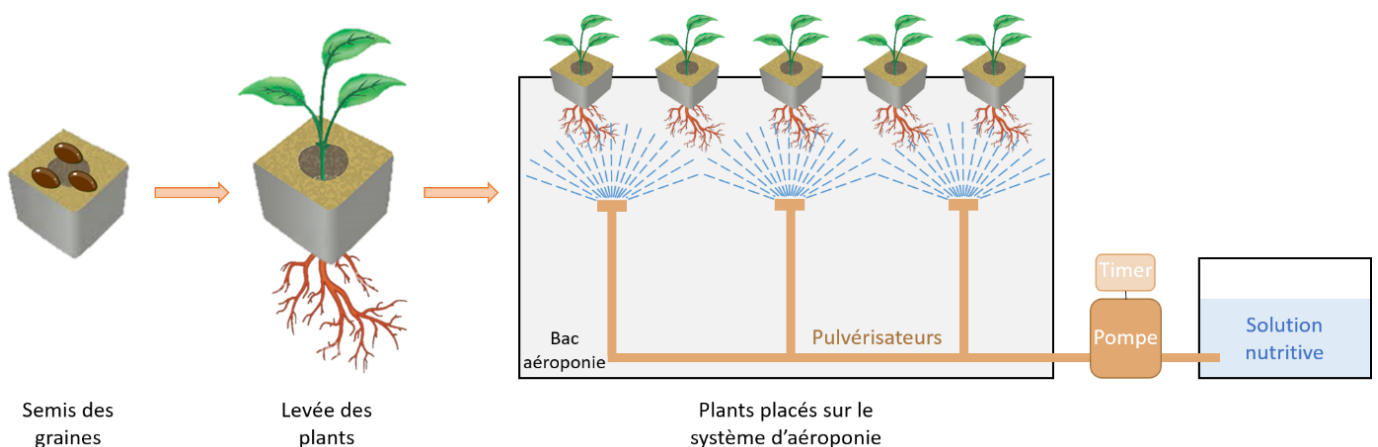
Comme nous venons de le voir la culture en hydroponie passive réduit l'accès aux racines, qui est un organe pouvant être d'intérêt. Afin de palier à cet inconvénient la culture par aéroponie représente une bonne alternative. C'est dans ce contexte que nous avons envisagé ce type de culture pour un transfert en serre avec le Comité de Développement Horticole de la Région Centre-Val de Loire (CDHRC), un autre partenaire du projet.

### 2.1.3 La culture aéroponique ou hydroponie active

La culture aéroponique ou en aéroponie est une technique de culture innovante qui fait partie des méthodes de culture dites hors sol avec l'hydroponie. Ce concept s'inspire des systèmes hydroponiques où les racines de la plante sont en général contenues dans un substrat inerte comme les billes d'argiles. En aéroponie, ces racines sont en suspension dans un espace rempli d'air. L'accès aux racines est donc facilité et tout obstacle physique à leur développement est supprimé. Cette nouvelle méthode de culture compte pour avantage le fait d'éliminer le substrat de culture qui permet ainsi au système racinaire de se développer plus rapidement grâce à une bonne oxygénation. Les

systèmes aéroponiques consomment aussi moins d'eau que d'autres systèmes traditionnels et les plants sont dans un environnement contrôlé avec une quantité d'insecticide et de pesticide drastiquement diminuée durant la culture. À noter que la solution nutritive doit être strictement contrôlée afin de garder des niveaux de nutriments stables selon les besoins de la plante. Ces systèmes aéroponiques se rencontrent le plus souvent dans des serres ou laboratoires utilisant des éclairages horticoles artificiels afin de compléter ou remplacer la lumière du soleil.

Une culture aéroponique commence par le semis de graines dans des pots contenant le substrat qui peut être de la laine de roche ou des billes d'argile. Lorsque les racines de la plante commencent à percer sous le pot, les pots sont surélevés et sub-irrigués. Dès que les racines sortant du pot atteignent une certaine taille, les pots sont placés sur le système d'aéroponie. Les racines sont ainsi maintenues à l'obscurité en suspension dans le vide à l'intérieur du bac d'aéroponie. Une solution nutritive est aspergée à intervalles réguliers sur les racines à l'aide d'une pompe et d'aspergeurs rotatifs (**Figure II-4**), on peut alors parler d'hydroponie active.



**Figure II-3** : Illustration de la mise en place d'une culture aéroponique

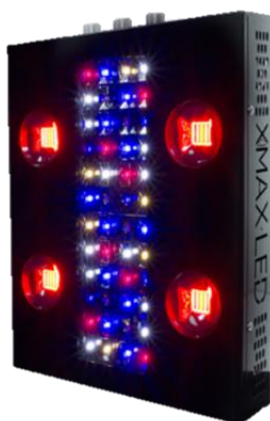
La culture en aéroponie de la bardane a été réalisée au Comité de Développement Horticole de la Région Centre-Val de Loire (CDHRC, Saint-Cyr-en-Val). Les graines ont été semées dans des cubes de laines de roche à raison de trois graines par pot après scarification avec du papier de verre et recouvertes d'une fine couche de vermiculite, un minéral naturel riche en fer et en magnésium utilisé pour la germination. Les pots sont ensuite placés sous serre dans l'attente de la levée des plants. Dès que les racines dépassent de 2 à 3 cm sous le cube, les quarante-huit plants sont placés dans un bac d'aéroponie. La solution nutritive utilisée par le CDHRC est pulvérisée à intervalles réguliers à l'aide d'asperseurs reliés à un programmeur et à une pompe. Les paramètres de la solution nutritive sont vérifiés régulièrement. La température au sein de la serre est maintenue entre 8°C et 20°C grâce à des systèmes de chauffage aérien et d'aération.

Lorsque les plants ont atteint un développement qui leur permettent de posséder au moins 3 ou 4 feuilles, ils sont répartis uniformément sur le bac d'aéroponie et pourront alors subir une élicitation lumineuse dont le principe est décrit ci-après.

Comme nous venons de le voir, nous avons été en mesure de réaliser de nombreuses techniques de culture dans le cadre de ce projet avec un objectif commun qui est d'évaluer l'apport d'une élicitation sur la réponse phytochimique de la plante.

#### 2.1.4 Le mode d'élicitation lumineuse

Lors de nos travaux de recherche, les élicitations lumineuses ont été réalisées sur les cals, les plantes cultivés en pot et en aéroponie. Un système de lampe LED XMAX 4 V4 (Horticoled®, puissance maximale : 600 Watts) (Figure II-5) a été utilisé, il possède des LEDs bleues (430 et 460 nm), rouges (630 et 660 nm), infrarouges (740 nm) et blanches (2700 et 10000 Kelvins) pouvant être sélectionnées séparément.



**Figure II-4 :** Système de lampe LED XMAX 4 V4 utilisé pour les élicitations des cultures de bardane en hydroponie active et en hydroponie passive (Horticoled)

Nous allons ici décrire le protocole d'élicitation lumineuse pour chaque mode de culture.

##### 2.1.4.1 Protocole d'élicitation lumineuse appliqué sur les cals

L'élicitation des cals a été réalisée par notre partenaire BBV. Les cals qui ont été transférés dans des erlenmeyers contenant le milieu de croissance M2 sont maintenus sous deux conditions d'illumination. Une première condition à l'obscurité totale à raison de 24 heures par jour et une seconde condition à la lumière avec une photopériode de 12 heures d'éclairage  $25 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et 12 heures d'obscurité. L'élicitation lumineuse est assurée par des ampoules LED rouge foncé et blanches (GreenPower TLED DR/W, Philips). Les cals sont alors échantillonnés et placés au congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'étape de lyophilisation.



#### 2.1.4.2 Protocole d'élucitation lumineuse appliqué aux plantes cultivées en hydroponie passive

Les plants sont placés dans une chambre noire DARK ROOM R3.00 (dimensions : 150 cm x 150 cm x 235 cm) sous un système de lampe LED positionné à 30 cm au-dessus des feuilles les plus hautes pour délivrer un éclairage à 5000 LUX soit  $125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . L'élucitation est effectuée avec les LEDs émettant dans le bleu, ou dans le rouge ou en lumière blanche avec une photopériode de 18 heures d'éclairage LED et 6 heures d'obscurité pendant 5 jours. Les conditions de culture dans la chambre de culture noire sont identiques à celles de la pièce de culture décrite précédemment. Les plantes sont alors dépotées et les racines sont rincées à l'eau claire. Les différentes parties de la plante, feuilles, pétioles et racines sont alors séparées, échantillonnées et placées au congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'étape de lyophilisation.

#### 2.1.4.3 Protocole d'élucitation lumineuse appliqué aux plantes cultivées en hydroponie active

Deux modalités d'éclairage ont été appliquées sur les plants cultivés en hydroponie active au sein du CDHRC. Pour cela, les plants ont été séparés à l'aide d'une bâche verticale en deux surfaces correspondant à deux modalités d'élucitation : du côté sud de la bâche, 24 plants qui se développeront à la lumière du jour et du côté nord de la bâche, deux modules de lampe LED ont été positionnés au-dessus de 24 plants à 30 cm au-dessus du feuillage avec un éclairage de 5000 LUX soit  $125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Figure II-6). Ces plants ont alors été élicités avec de la lumière bleue pendant 21 jours en complément de la lumière naturelle selon une photopériode de 18 heures d'éclairage (de 6 h du matin à minuit) et 6 heures d'obscurité. Au cours de cette période d'élucitation sous lumière bleue, 6 prélèvements ont été réalisés à T0, T0 + 3 jours, T0 + 5 jours, T0 + 7 jours, T0 + 14 jours, T0 + 21 jours. Quatre plants sont alors prélevés pour chacune des modalités d'éclairage, lumière du jour versus élucitation lumière bleue, soit 8 plants au total pour un prélèvement. Sur chaque plant, les racines sont taillées à la moitié de leur longueur et 2 à 3 feuilles sont prélevées. Les échantillons sont placés au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant une à deux semaines puis à  $-80^{\circ}\text{C}$  juste avant lyophilisation.

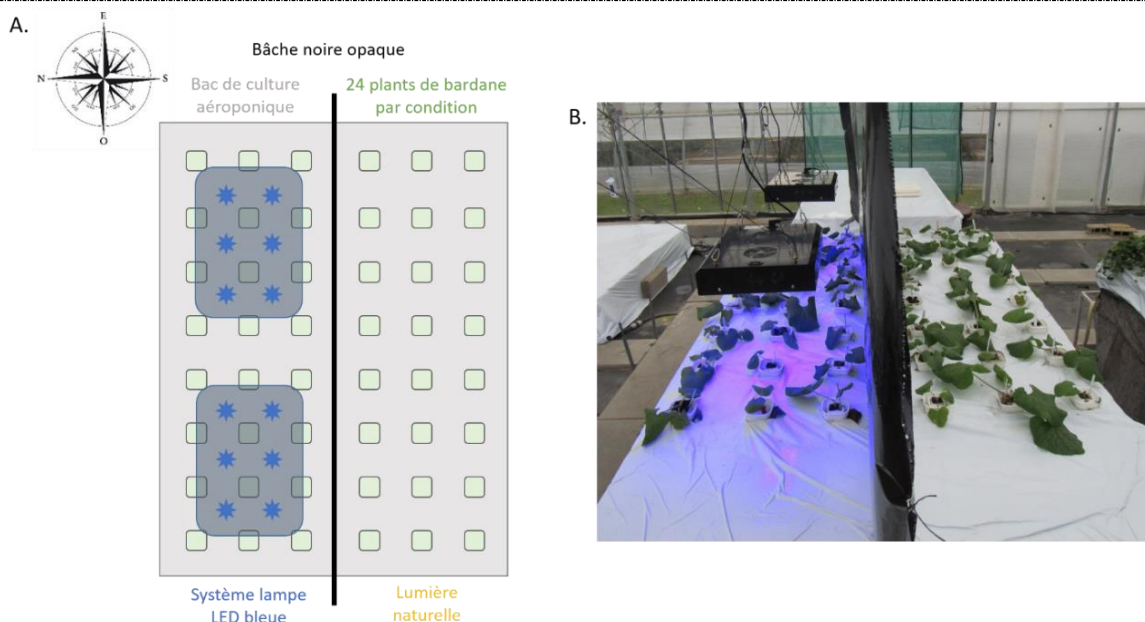


Figure II-5 : (A) Schéma du dispositif mis en place pour l'élucitation de la bardane en culture d'hydroponie active et (B) Photographie du dispositif



À l'aide de ces différents modes de culture et d'élicitation, une meilleure compréhension des effets d'une élicitation sur le patrimoine moléculaire pourra être faite ainsi que l'étude d'une activité positive en vue d'un nouvel ingrédient cosmétique. C'est ainsi que chaque échantillon récolté a été préparé, soit lyophilisé puis extrait en vue d'une analyse métabolomique et biologique. La méthode d'extraction utilisée dans ce projet sera présentée dans la partie suivante.

### 3 Méthodologie d'extraction

Avant toute extraction, les différents échantillons récoltés lors des différentes méthodes de culture vont être lyophilisés (CHRIST Alpha 1-2, mode dessiccation primaire) jusqu'à une dessiccation complète. Les échantillons sont ensuite broyés à l'aide d'un broyeur à couteaux (KINEMATICA POLYMIX PX-MFC 90 D, tamis 2 mm, 6000 tour/minute) avant d'être extraits, excepté les cals qui eux sont broyés à l'aide d'un pilon directement dans un tube Eppendorf.

Différentes méthodes d'extraction existent pour l'extraction du végétal telles que la macération-infusion, l'extraction au Soxhlet, l'extraction assistée par micro-ondes (microwave assisted extraction, MAE), l'extraction assistée par ultrasons (ultrasound assisted extraction, UAE), l'extraction par liquide pressurisé (pressurized liquid extraction, PLE) plus communément connue sous le nom d'extraction accélérée par solvants (accelerated solvent extraction, ASE) ou encore l'extraction par fluide supercritique (supercritical fluid extraction, SFE) (Azwanida 2015).

Dans le cadre de ce projet, l'ensemble des partenaires ont décidé de choisir l'extraction assistée par ultrasons afin d'obtenir les différents extraits sur lesquels ont été faits les analyses au cours de ces travaux de thèse.

#### 3.1 Les ultrasons

Les ultrasons aussi appelés ondes ultrasonores sont des ondes vibrationnelles mécaniques allant de 16 KHz à 1 GHz de fréquence et pouvant se propager dans les solides, les liquides ou encore les gaz. En milieu liquide, la propagation de ces ondes ultrasonores va induire des cycles successifs de compression à haute pression et de raréfaction à basse pression (Wang et Weller 2006). Cette différence de pression générée par les ultrasons va provoquer des mouvements moléculaires dans le milieu. Lors du cycle de raréfaction, la distance entre les molécules est augmentée et au-delà d'une certaine distance, dépendante de chaque milieu, des bulles de cavitation vont se former. Ces bulles de cavitation vont se développer pendant les phases de raréfaction et diminuer lors des phases de compression (**Figure II-7**). La répétition de cette succession de cycle de compression et de raréfaction va mener à l'implosion des bulles de cavitation ce qui libérera une grande quantité d'énergie (Pétrier et al. 2008).

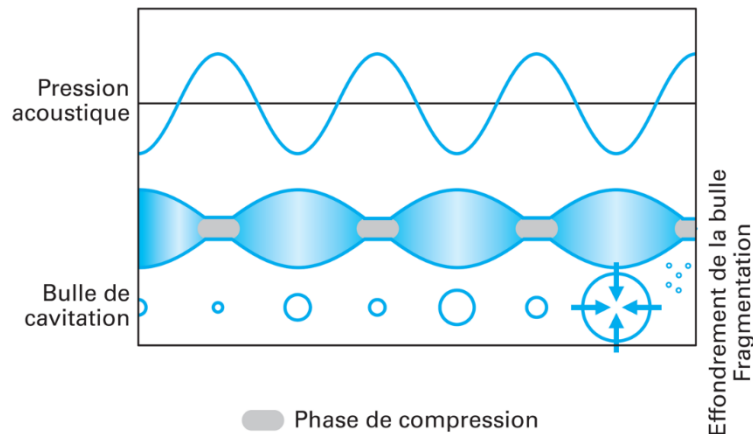


Figure II-6 : Représentation de la croissance et de l'implosion de la bulle de cavitation, Pétrier et al. 2008

Lorsque des bulles de cavitation sont formées à proximité d'une surface solide, ces bulles deviennent asymétriques et leur implosion produira des jets de liquide qui seront projetés à très grande vitesse vers la surface solide (Figure II-8). Une augmentation locale de la température et de la pression est également observée.

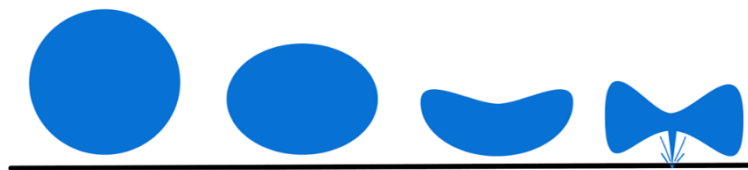


Figure II-7 : Représentation schématique de l'évolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide, Michel 2011, adaptation de Pétrier et al. 2008

Cette surface solide peut par exemple être une matrice végétale, dans ce cas les jets de liquides projetés à très grande vitesse vont percer les parois végétales et permettre la libération de molécules dans le milieu liquide (Wang et Weller 2006).

### 3.2 L'extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons est une technique peu onéreuse, simple à mettre en œuvre et qui peut être utilisée avec n'importe quel type de solvant. Cette extraction peut être effectuée en utilisant un bain à ultrasons qui permet de réaliser plusieurs extractions en simultanée ou à l'aide d'une sonde ultrasonore couplée à un agitateur (Vinatoru et al. 1997, Wang et Weller 2006). L'effet mécanique des ondes ultrasonores sur la matrice végétale va induire une meilleure pénétration du solvant dans les cellules, ce qui améliorera le transfert de masse et augmentera le rendement et la cinétique d'extraction. En revanche une dispersion non homogénéisée de la phase solide contribue à l'atténuation des ultrasons, la zone subissant l'effet des ultrasons est alors restreinte à une zone proche de l'émetteur ce qui pourrait réduire le rendement d'extraction (Wang et Weller 2006).

Dans le cadre de nos travaux, l'extraction est réalisée en utilisant 1 g d'échantillon pour 10 mL de solvant d'extraction. Le solvant choisi est un mélange éthanol/eau 70:30 (v/v). L'extraction est effectuée dans un bain à ultrasons USC1200TH (Prolabo ; dimensions internes : 300 mm x 240 mm x 200 mm) pendant 1 heure à température ambiante. Après extraction, l'extrait est filtré puis divisé en deux. L'ensemble des extraits est évaporé sous flux azote pendant environ 16 heures. Pour une même extraction, une partie de l'échantillon est reprise à 1 mg/mL dans le solvant d'extraction et l'autre à 100 mg/mL dans du DMSO. Les extraits éthanol/eau seront utilisés pour les analyses par spectrométrie de masse, les analyses statistiques, les tests d'activités *in tubo*. Les extraits DMSO sont utilisés pour les tests de criblage cellulaire au Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) d'Orléans, un autre partenaire du projet.

## 4 Stratégie métabolomique

### 4.1 Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

La découverte de nouvelles techniques d'ionisations douces à la fin des années 80 telles que l'ionisation/désorption laser assistée par matrice (MALDI) et l'électronébulisation (ESI) ont rendu possible l'analyse par spectrométrie de masse de petites et macromolécules. De nombreuses avancées technologiques ont de manière générale amélioré les trois éléments constituant le spectromètre de masse : la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur.

Les extraits obtenus avec les différentes méthodes de culture ont été analysés en spectrométrie de masse haute résolution (ESI-QTOF-HRMS) couplée à une chromatographie en phase liquide ultra haute performance (UHPLC). Le principe et les conditions opératoires mis en place dans cette thèse ont été présentés ci-dessous.

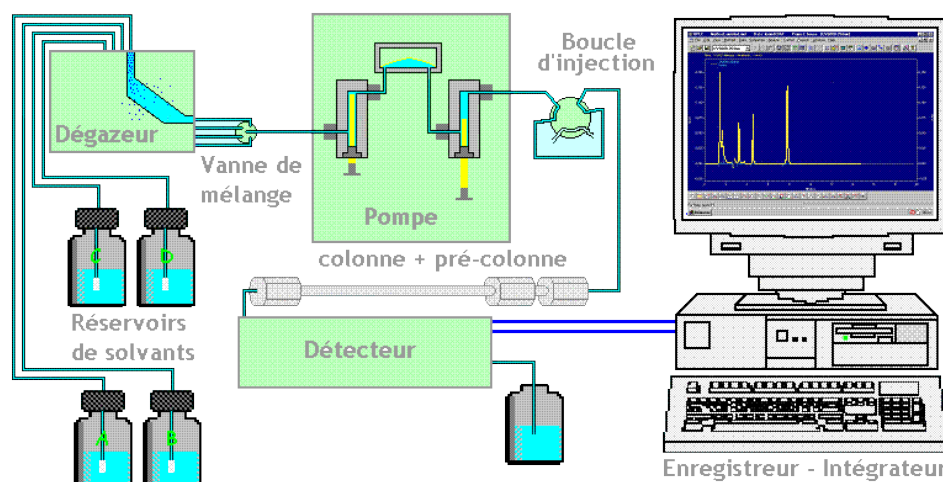
#### 4.1.1 La chromatographie liquide de haute performance

La chromatographie liquide de haute performance (HPLC) est une technique analytique permettant la séparation de constituants d'un mélange liquide homogène. Son principe est basé sur l'équilibre des concentrations des composés à séparer entre deux phases : la phase stationnaire, la colonne chromatographique, et la phase mobile qui se déplace. La séparation des composés est réalisée grâce à la rétention qui est différente pour chacun des constituants présents dans la colonne. Ces derniers parcourent la colonne avec des temps variables dépendants de leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, polarité, ...) et de leurs affinités respectives pour la phase mobile et la phase stationnaire. Au bout de la colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chaque constituant du mélange.

Cette technique est largement utilisée pour la séparation des constituants de mélanges complexes et est considérée comme une approche universelle capable de couvrir une large gamme de molécules, de tailles et de propriétés différentes, grâce au large choix de colonne et aux possibilités de modification des phases mobiles.

Cette analyse est réalisée grâce à un système constitué de quatre principaux modules, schématisés **Figure II-9**, que sont :

- Le système de pompage permettant de prélever l'éluant, de réguler le débit et de maintenir la pression de l'ensemble du système en mode isocratique ou en mode gradient d'élution.
- Le système d'injection de l'échantillon dans la colonne chromatographique.
- La colonne chromatographique assurant la séparation chromatographique des constituants de l'échantillon injecté.
- Le détecteur permettant la visualisation des solutés élués de la colonne chromatographique.

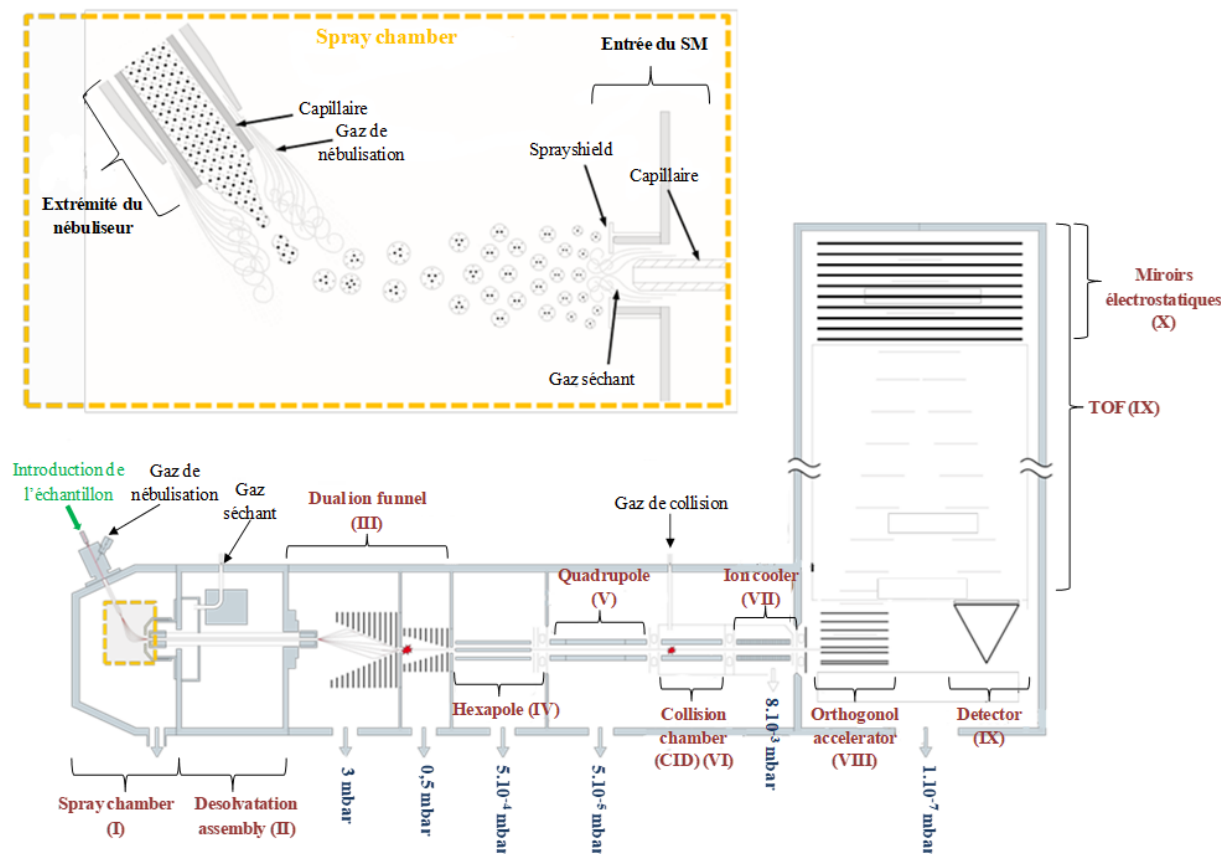


**Figure II-8** : Schéma simplifiée d'une chaîne chromatographique HPLC, Le 2020

La chromatographie liquide apporte un fort potentiel de sélectivité de par le large éventail de phases stationnaires permettant ainsi de mettre en œuvre différents types de mécanismes d'interactions comme : l'échange d'ions (IEC), la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) et la chromatographie à polarité de phase inversée (RP, Reversed Phase). Cette dernière est le mode chromatographique le plus employé dans l'analyse de soluté. Les phases stationnaires à polarité de phase inversée sont la plupart du temps constituées de particules de silice greffées par des chaînes alkyles ( $C_{18}$ ,  $C_8$ , ...) ce qui permet l'utilisation de phases mobiles hydro-organiques adaptées à l'ionisation des molécules lors d'un couplage LC-ESI/MS. L'ensemble des paramètres clés de la spectrométrie de masse qui seront décrits ci-dessous sont en constante évolution et amélioration. C'est pourquoi, la technique ESI-MS est devenue un outil adapté à l'analyse de molécules dans des milieux complexes tels que les extraits végétaux.

### 4.1.2 Caractéristiques du spectromètre de masse utilisé pour cette étude

La **Figure II-10** montre le schéma du spectromètre de masse maXis UHR-QTOF (Bruker, Germany) utilisé dans le cadre de cette thèse. Les principaux modules constitutifs (indiqués de **I** à **IX**) du spectromètre de masse utilisé ont été précédemment décrit par notre équipe (Ferey 2017).



**Figure II-9** : Schéma du spectromètre de masse maXis UHR-QTOF et la source ESI utilisé, adaptation de Ferey 2017

#### 4.1.2.1 La source d'ionisation

La source d'ionisation utilisée dans ce projet est une source d'ionisation par électronébulisation ou électrospray (ESI). Cette source a été proposée en 1984 par Masamichi Yamashita et John Fenn (Yamashita et Fenn 1984). De nos jours, ce type de source est l'une des plus utilisées en couplage avec la chromatographie en phase liquide pour l'analyse de molécules polaires à moyennement polaires.

L'ESI est une technique d'ionisation se déroulant à pression atmosphérique et permettant la formation d'ions en phase gazeuse par des mécanismes de désolvatation peu énergétiques qui n'induisent pas de fragmentation.

La formation des ions se fait en trois étapes différentes comme décrites par Ferey et schématisées

**Figure II-11** (Ferey 2017) :

- Formation de gouttelettes chargées à l'extrémité d'un capillaire.
- Fission des gouttelettes par évaporation du solvant et explosions coulombiennes.
- Émission des ions en phase gazeuse.

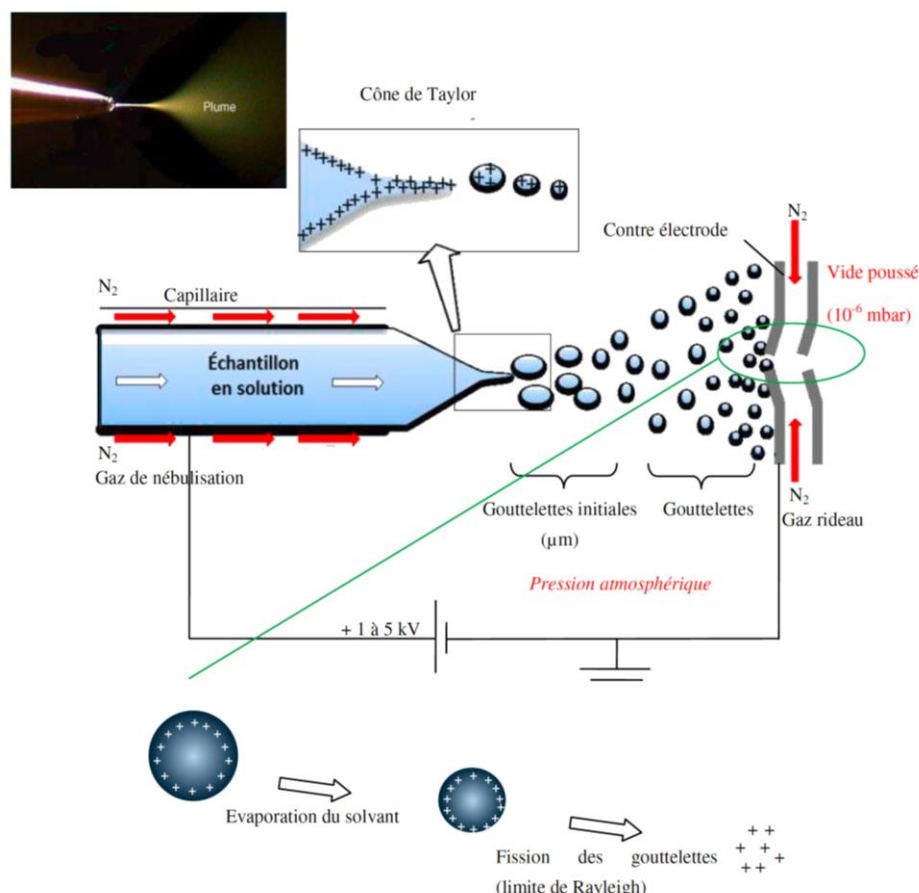


Figure II-10 : Représentation schématique du principe de fonctionnement d'une source électro-nébulisation ou électrospray, Ferey 2017

### i) Formation des gouttelettes

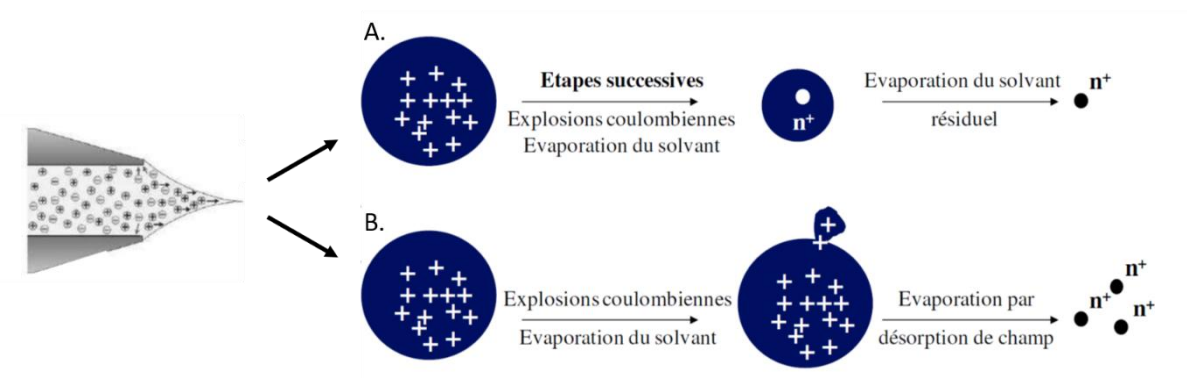
La formation de gouttelettes chargées à l'extrémité du capillaire est réalisée sous l'influence d'un champ électrique élevé entre  $\pm 3$  à  $\pm 5$  kV appliqué entre le capillaire et le cône d'échantillonnage. À l'extrémité du capillaire on peut alors voir se former un cône appelé « cône de Taylor » et des gouttelettes monochargées ou multichargées négativement ou positivement, en fonction de la polarité du champ électrique appliquée, sont produites. Les gouttelettes formées se déplacent par la suite sous l'influence d'un champ électrique intense et d'un gradient de pression créée entre la source et l'entrée du spectromètre de masse.

### ii) Fission des gouttelettes

Au cours de leur parcours dans la chambre d'ionisation thermostatée, les gouttelettes chargées issues du cône de Taylor entrent en collision avec le gaz rideau résiduel ( $N_2$ ) et vont subir une diminution progressive de leur diamètre. Les charges vont alors se concentrer dans la goutte, ainsi les forces de répulsions coulombiennes augmentent jusqu'à être supérieures aux forces de tension de surface et l'équilibre est rompu. On atteint alors la limite dite de Rayleigh. Ce phénomène induit alors une succession d'explosions coulombiennes qui donnent naissance à des microgouttelettes ou nanogouttelettes et qui permettent la désorption de molécules mono ou multichargées.

### iii) Émission des ions en phase gazeuse

Deux théories, schématisées **Figure II-12**, sont proposées pour décrire le phénomène de production des ions désolvatés en phase gazeuse : le modèle de la charge résiduelle (« charged residual model », CRM) proposé par Dole (Dole et *al.* 1968) expliquant le processus de désorption/ionisation des macromolécules et le modèle d'évaporation ionique (« ion evaporation model », IEM) d'Iribarne et Thomson (Iribarne et Thomson 1976) qui s'appliquerait plutôt aux petites molécules. Un troisième modèle proposé par Fenn est un compromis tenant compte des deux modèles précédents (Fenn, 1988).



**Figure II-11** : Schéma de l'émission des ions  $[M+nH]^{n+}$  en phase gazeuse en ESI d'après (A) le modèle de Dole et (B) le modèle d'Iribarne et Thomson, adaptation de Ferey 2017

Cette technique d'ionisation électrospray à pression atmosphérique présente de nombreux avantages et inconvénients présentés au **Tableau II-6**.

**Tableau II-6** : Avantages et inconvénients de l'ionisation électrospray

Avantages	Inconvénients
- Bonne adaptation à un couplage avec une chromatographie liquide	
- Technique très sensible	- Réponse et/ou quantification d'un analyte peut être affectée par la présence d'autres espèces
- Utilisation de faibles énergies d'ionisation possible	
- Permet l'étude d'interactions non covalentes	- Suppression de signal induit par la présence de sel
- Permet l'observation de molécules intactes	
- Détection des ions multichargées d'analytes de haute masse (> 40 kDa)	

Cette ionisation électrospray peut être réalisée selon deux modes, un mode d'ionisation positif ou un mode d'ionisation négatif.



*iv) Ionisation en mode positif*

L'ionisation en mode positif est utilisée pour observer des molécules chargées positivement. Dans ce mode d'ionisation, le capillaire ainsi que les gouttelettes de l'analyte sont polarisés positivement tandis que la contre électrode est polarisée négativement. Les porteurs de la charge positive dans les gouttelettes sont généralement des protons, des cations métalliques comme par exemple le lithium, le sodium ou le potassium, ou des sels comme le cation ammonium. Les protons peuvent provenir d'une solution d'analyte acidifiée ou être généré dans un processus d'électrolyse de l'eau à la surface du capillaire (Konermann et *al.* 2012). Ces porteurs de charges forment des adduits avec les molécules d'analytes et les ionisent. Lorsque le tampon formiate d'ammonium dilué est appliqué, les adduits de protons ( $[M+zH]^{z+}$ ) sont les ions les plus couramment observés dans le spectre de masse. Ils peuvent être formés soit par association directe des protons avec les molécules d'analyte soit par association de cations d'ammonium suivie d'une libération d'ammoniac. Les adduits de sodium et de potassium sont observés dans une moindre mesure à moins que des sels contenant ces cations soient intentionnellement ajoutés à la solution tampon. Les sels organiques peuvent être visualisés directement sous leurs formes cationiques, par exemple le bromure de cétyltriméthylammonium est observé comme  $[M-Br]^+$ . Comme indiqué ci-dessus, les ions positifs sont généralement visualisés sous la forme d'adduits de protons. Si dans les mélanges étudiés il y a un grand nombre de composés comme par exemple lors d'une analyse directe d'extrait brut de plante, nous pouvons rencontrer un phénomène de suppression d'ions. Cela est dû au fait que le pool de protons présents dans le tampon peut être appauvri par la présence de composés ayant une forte affinité pour les protons comme les amines. Cela entraînera une réduction du degré d'ionisation des composés ayant une faible affinité pour les protons comme l'acide carboxylique. Si le pH du tampon doit être fixé à un certain niveau dans le but de l'ajuster aux conditions expérimentales exigées par la cible biologique, il est généralement nécessaire d'ajouter un solvant acide en complément comme du méthanol pur ou un mélange de méthanol et d'une solution aqueuse diluée d'acide formique, juste avant l'injection de l'échantillon (Slon-Usakiewicz et *al.* 2004, Besanger et *al.* 2006, Olesen et *al.* 2013, Temporini et *al.* 2013).

*v) Ionisation en mode négatif*

L'ionisation en mode négatif est utilisée pour visualiser des molécules chargées négativement. Les polarités du capillaire et de la contre électrode sont inversées par rapport au mode d'ionisation positif. La plupart des molécules d'analyte sont ionisées par détachement d'un proton donnant l'ion  $[M+H]^-$ . De plus, les molécules analysées peuvent former des adduits avec des ions présents dans le tampon par exemple des ions chlorure, des ions bromure, des ions formiate ou des ions acétate.



Cette source d'ionisation électrospray peut être couplée à de nombreux analyseurs tels que ceux décrits ci-dessous.

#### 4.1.2.2 L'analyseur

Comme énoncé précédemment, de nombreux analyseurs peuvent être couplés à une source d'ionisation électrospray tels que ceux décrits dans le **Tableau II-7**.

**Tableau II-7** : Tableau comparatif des performances des différents analyseurs

Analyseur	Limite en rapport $m/z$	Résolution (FWHM)	Exactitude en masse (ppm)
Quadripôle	4000	3000	200
Piège à ion (2D/3D)	6000	5000	200
Temps de vol	Illimitée	5000 - 20000	20 – 200
Orbitrap	4000	30000 - 100000	< 5
Résonance cyclotronique	8000	50000 - 10000000	< 2

De manière générale, l'ensemble de ces analyseurs peuvent être définis selon différents paramètres que sont :

- La gamme de rapport  $m/z$  correspondant aux limites de  $m/z$  au-delà desquelles l'analyseur ne peut plus mesurer le signal.
- La sensibilité correspondant à la quantité d'échantillons nécessaire afin de détecter un signal significatif dans le spectre de masse (valeur du signal/bruit (S/N) supérieure à 3).
- La vitesse de balayage ou le temps mis par l'analyseur pour établir un spectre pour une gamme de  $m/z$  donnée.
- La résolution représentant la capacité de l'analyseur à séparer deux composés avec des  $m/z$  voisins. Pour un ion isolé, la mesure de la résolution peut être effectuée en prenant la largeur du pic à x% de son maximum, la plupart du temps à mi-hauteur.
- La précision sur la mesure  $m/z$  représentant la faculté à mesurer une masse la plus proche possible de la masse théorique de la molécule analysée, exprimée le plus souvent en « partie par million » (ppm) (Legeron 2015).

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nos extraits de plantes élicitées en hydroponie passive ou en hydroponie active ont été analysés à l'aide d'une chromatographie liquide à ultra haute performance à polarité de phase inversée (RP-UHPLC) Dionex™ Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific™, Germany) couplée à un spectromètre de masse maXis UHR (Ultra-high resolution)-QTOF (Bruker, Germany) combiné à une source d'ionisation électrospray (ESI). Entre 0,7 et 1,25 µL des échantillons de bardane ont été injectés dans une colonne Luna Omega C18 150 mm x 2,1 mm x 1,6 µm (Phenomenex, France). Les colonnes sont maintenues à une température de 40°C. La phase mobile est constituée d'une solution à 0,1 % d'acide formique dans de l'eau qualité LC-MS (Solvant A) et d'une solution à 0,08 % d'acide formique dans de l'acétonitrile (Solvant D). Un flux de 0,5 µL/min est appliqué suivant un gradient commençant à 3% de solvant D pendant 0,2 min et augmentant progressivement jusqu'à 85 % de 0,2 à 15 min, puis jusqu'à 100 % de solvant D à 16 min maintenu jusqu'à 18 min et enfin à 18,1 min, retour à 3 % de solvant D jusqu'à 21 min. Les paramètres utilisés en spectrométrie de masse ESI-QTOF-MS sont les suivants : la tension du capillaire est fixée à 4500 V, la pression du nébuliseur est de 2,0 bar, le débit du gaz séchant est de 9,0 L/min et l'énergie de la cellule de collision vaut 1Hz. Le spectre de masse a été acquis en mode d'ionisation positif sur une gamme de 50 à 1650 *m/z*. Les spectres de fragmentation MS/MS ont été réalisés à des énergies de collision de 25, 35 et 45 eV.

À partir des données de masse en mode d'ionisation positif un traitement statistique va être possible soit par des logiciels constructeurs ou par des plateformes internet.

#### 4.2 Identification des signatures phytochimiques – Traitement statistique des données

Les données brutes, soit la liste des *m/z* ainsi que les intensités des pics du spectre de masse, obtenues suite aux analyses par LC-MS sont rassemblées dans une matrice de données, regroupant les *m/z* et leur temps de rétention avec leur intensité dans chaque échantillon, qui pourra être exploitée en statistique. À cette fin, de nombreux logiciels sont disponibles à la fois en accès libre ou sous licence et permettent de réaliser divers traitements statistiques de ces données tels que des analyses en composantes principales ou des analyses discriminantes. Dans le cadre de cette thèse, la plateforme gratuite sur l'environnement de Galaxy accessible sur le site [workflow4metabolomics.org](http://workflow4metabolomics.org) a été utilisée. Cette plateforme utilise le logiciel XCMS présente l'avantage d'être codé sous un format de langage R qui permet d'avoir accès au code source et de comprendre, de suivre et éventuellement de modifier ou d'adapter les différentes étapes de l'analyse. Ce logiciel permet de traiter les données sous différents formats libres de fichiers tels que .NetCDF ou .mzXML. Lors du traitement d'un jeu de données par XCM, différents algorithmes sont utilisés (Figure II-13).

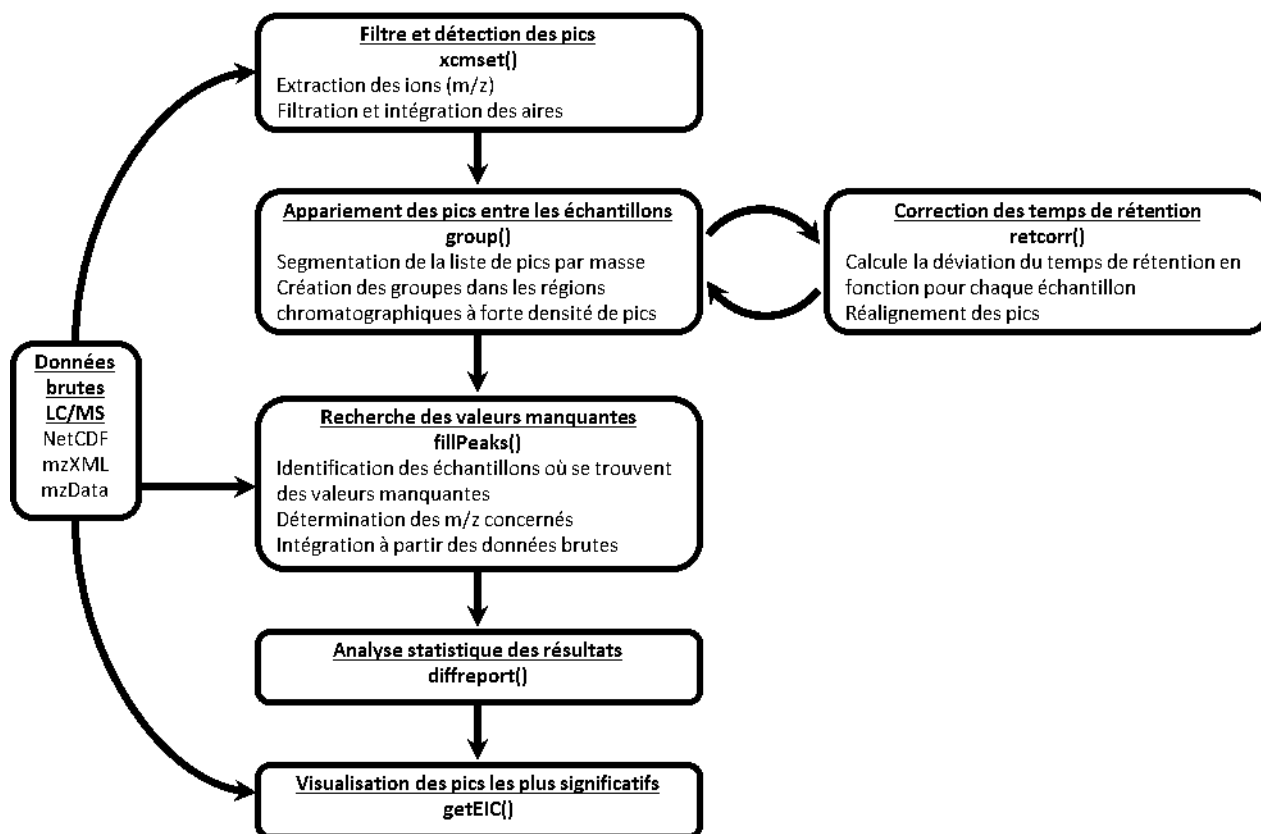


Figure II-12 : Organigramme des différentes étapes d'itération du logiciel XCMS, adaptation de Smith et al. 2006

Ces algorithmes permettent dans un premier temps de réaliser un filtrage des données afin d'éliminer le bruit de fond en recherchant spectre après spectre l'ensemble des ions ayant une intensité supérieure à une limite ce qui conduit à une liste d'ions d'intérêt. Cette étape est suivie d'une détection des pics par déconvolution des chromatogrammes et enfin un alignement des pics détectés en prenant en compte pour chaque analyse le temps de rétention de chacun des pics chromatographiques et les rapports  $m/z$  des ions correspondants (Smith et al 2006). En effet de petites variations des temps de rétention peuvent être observées au cours de l'analyse. Une étape de correction de ces temps de rétention est donc réalisée pour permettre de grouper de façon optimale les signaux d'un même ion présents sur les différents échantillons. Suit enfin une étape de recherche des valeurs manquantes. En effet, les intensités des pics d'un composé pouvant varier d'un échantillon à l'autre, il est possible que certains pics ne soient pas détectés sur tous les échantillons lors de la première détection sans *a priori*. Ils sont alors recherchés de manière ciblée pour permettre de vérifier que la première détection n'a pas oublié un signal.

Le résultat de cette étape d'obtention des variables est une matrice sur laquelle chaque ligne correspond à une variable définie par un couple  $m/z$  et temps de rétention. Pour chaque variable, différentes données sont présentées puis l'aire sous la courbe du signal correspondant à cette variable est indiquée pour chaque échantillon. C'est à partir de ces aires que l'étude statistique peut être réalisée.

Le nombre de données obtenues suite à l'analyse en spectrométrie de masse est très grand. De plus, la variation intrinsèque au sein des échantillons biologiques n'est pas négligeable, un grand nombre d'échantillons est donc conseillé pour atteindre une confiance suffisante pour investiguer la variation biologique. C'est dans ce contexte que le recours aux statistiques multidimensionnelles permet d'organiser et de visualiser les données d'analyse. Les données sont alors projetées sur un espace avec des dimensions réduites permettant une meilleure visualisation des dites données. Diverses méthodes d'analyses statistiques existent telles que la normalisation, les analyses statistiques univariées ou multivariées descriptives ou explicatives (van den Berg et *al.* 2006).

Dans notre étude, la matrice est utilisée pour réaliser des analyses statistiques multivariées. Ces analyses vont traiter l'ensemble du jeu de données comme un seul élément. Cela permet une visualisation plus immédiate de la dispersion des échantillons. Ces approches sont basées sur l'utilisation de variables latentes qui sont calculées comme des combinaisons linéaires des variables initiales et permettent de mettre en avant des interactions existantes entre ces différentes variables. Il existe deux types d'analyses statistiques multivariées :

- Les analyses multivariées descriptives ou non supervisées telles que l'analyse en composantes principales ou ACP (PCA en anglais pour Principal Component Analysis) vont chercher à faire ressortir la variance qui existe dans le jeu de données sans *a priori* sur la nature de chaque échantillon. Elles permettent de faire ressortir les composés qui vont avoir le plus de poids dans la séparation des échantillons en fonction de leurs groupes. Les objectifs d'une telle analyse sont de synthétiser les informations contenues dans la série statistique et de mettre en évidence ses propriétés mais aussi de suggérer des hypothèses relatives à la population dont provient l'échantillon.
- Les analyses multivariées explicatives sont nombreuses et ont, quant à elles, pour objectif d'expliquer l'une des variables, dite dépendante, à l'aide de deux ou plusieurs variables explicatives, dites indépendantes. Parmi elles, l'analyse discriminante PLS pour Partial Least Square permet d'effectuer une discrimination et peut s'appliquer au cas de jeux de données avec peu d'observations et beaucoup de variables explicatives. L'avantage de la régression PLS en comparaison avec la régression classique est la possibilité d'obtenir des graphiques facilement interprétables. Ceux-ci représentent les relations des variables explicatives entre elles ou des variables dépendantes entre elles, ainsi qu'entre les variables dépendantes et explicatives. On retrouve aussi la régression dite des moindres carrés OLS pour Ordinary Least Squares et l'analyse discriminante PLS-DA pour Partial Least Square Discriminant Analysis. Dans cette étude, la PLS-DA est utilisée et est un modèle maximisant la séparation entre les classes des échantillons. Ce modèle permet d'isoler les métabolites

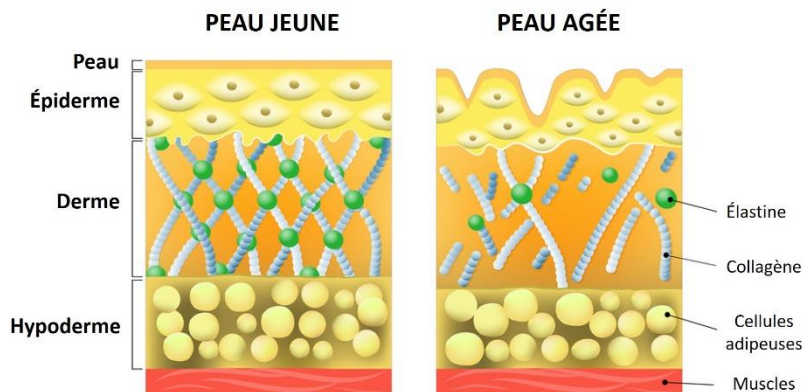
contribuant à la formation des différents groupes et dont l'intensité est caractéristique d'un état biologique donné.

Dans ce contexte, les données sont tout d'abord analysées à l'aide d'une analyse multivariée descriptive ACP dans le but d'observer la répartition spontanée des échantillons puis à l'aide d'une analyse statistique supervisée PLS-DA pour affiner les résultats et déterminer les variables contribuant à la différenciation entre les groupes (partie de la plante, lumière d'élicitation).

Dans le cadre de la thèse sur l'élicitation en culture pot, le nombre d'échantillon étant très faible, une approche métabolomique a été appliquée comme preuve de concept. Elle a été comparée avec une étude différentielle afin d'évaluer le degré de confiance de l'approche. Par la suite, l'approche différentielle a été appliquée pleinement dans le cadre de la culture en aéroponie élicitée dans le bleu.

#### 4.3 Tests basés sur des allégations cosmétiques

Le vieillissement cutané est un processus biologique naturel et complexe qui est influencé par la combinaison de facteurs endogènes comme la génétique, le métabolisme ou les hormones et de facteurs exogènes comme la pollution, les rayonnements ionisants, l'exposition à la lumière, les produits chimiques ou encore les toxines (Ganceviciene et *al.* 2012). L'ensemble de ces facteurs entraînent des altérations structurelles et physiologiques dans toutes les couches de la peau (**Figure II-14**) affectant son apparence et en particulier celle des zones exposées (Ganceviciene et *al.* 2012).



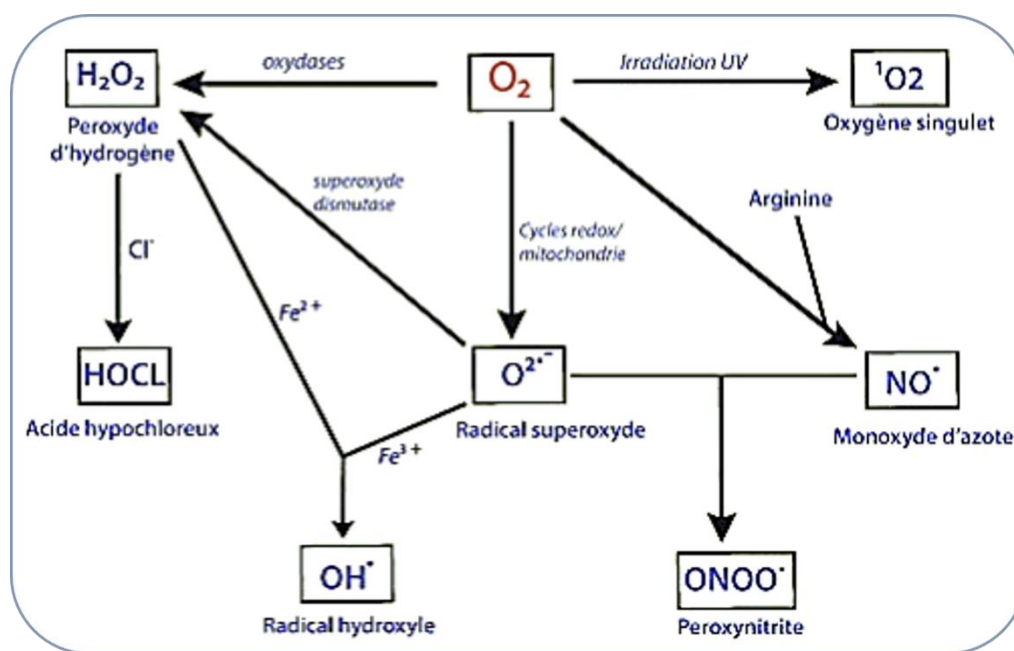
**Figure II-13** : Comparaison des structures d'une peau jeune et d'une peau âgée, adaptation du site internet <https://www.dralexchambers.co.uk/fat-removal/improving-skin-thickness-and-elasticity.html>

C'est dans ce contexte que l'industrie cosmétique cherche à apporter des solutions dans le but de protéger la peau du vieillissement. Afin de lutter contre le vieillissement cutané, les actifs cosmétiques développés ciblent des mécanismes cellulaires propres au derme et/ou à l'épiderme. Dans ce travail de thèse nous avons souhaité nous focaliser sur deux cibles largement étudiées que sont la limitation du stress oxydatif et la diminution de l'hyperpigmentation. Ces deux mécanismes ainsi que les tests utilisés pour mesurer l'activité de nos extraits contre ces cibles vont être présentés.

### 4.3.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) : acteurs du stress oxydatif cellulaire

Les espèces réactives de l'oxygène ou espèces réactives oxygénées souvent appelées par leur acronyme anglais ROS sont des molécules qui participent à des réactions d'oxydation physiologiquement indispensables. Cependant dans certaines conditions ces ROS peuvent devenir nuisibles et alors altérer les tissus et contribuer à leur sénescence (Sparavigna 2017). Parmi ces ROS on retrouve l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et l'ozone ( $\text{O}_3$ ). Selon les auteurs, on peut également inclure le monoxyde d'azote ( $\text{NO}^{\cdot}$ ), l'anion peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ), désignées comme espèces réactives de l'azote, et les radicaux peroxydes ( $\text{RO}^{\cdot}$  et  $\text{ROO}^{\cdot}$ ).

Les sources des ROS peuvent être exogènes ou endogènes. Les sources exogènes sont majoritairement environnementales comme les pesticides, les polluants, les métaux lourds, la fumée de cigarette, les composés produits suite à la prise de certains médicaments ou encore les rayonnements électromagnétiques (les radiations ionisantes et la lumière ultraviolette). Les sources endogènes des ROS dans l'organisme sont résumées à la **Figure II-15**.



**Figure II-14** : Les sources endogènes des ROS dans l'organisme, adaptation de Démarchez 2012

Le stress oxydatif aussi appelé stress oxydant se produit lorsqu'un déséquilibre se crée en faveur d'un excès de molécules pro-oxydantes qui engendrent des effets délétères sur l'organisme. L'intervention d'antioxydants qui sont des inhibiteurs de l'oxydation est une aide précieuse pour lutter contre les radicaux libres produits et contribuer à l'élimination de leur excédent dans les cellules.

D'après la littérature, les antioxydants peuvent être classés en deux catégories : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non-enzymatiques.

#### 4.3.1.1 Les antioxydants enzymatiques

Parmi les antioxydants enzymatiques les plus connus on retrouve la glutathion peroxydase, la catalase ou encore la superoxyde dismutase. La première enzyme permet en présence du couple forme oxydée (GSSG) et forme réduite (GSH) du glutathion d'assurer notamment la transformation du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en molécules d'eau et celle d'hydroperoxydes organiques de type ROOH en ROH selon la réaction. La catalase permet de diminuer le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau et en oxygène tandis que la superoxyde dismutase peut éliminer les radicaux superoxydes (Kammeyer et Luiten 2015). L'ensemble de ces réactions est résumé au **Tableau II-8**.

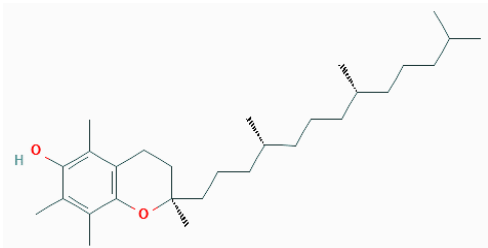
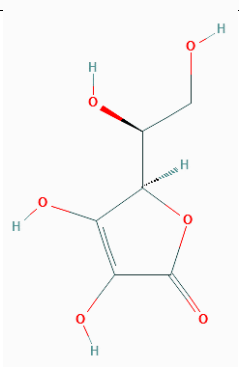
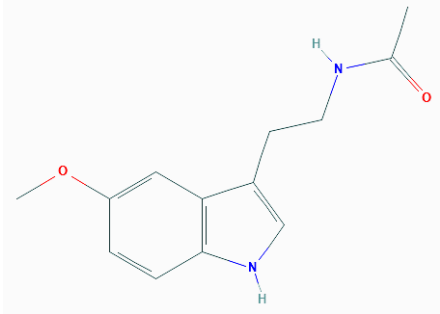
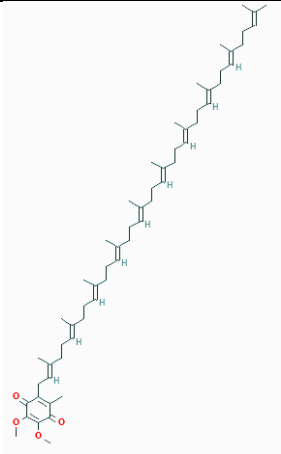
**Tableau II-8** : Exemples d'antioxydants enzymatiques, adaptation de Birben et al. 2012

Nom de l'enzyme	Acronyme	Réaction catalytique
Glutathion peroxydase	GPx	$2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$
		$2\text{GSH} + \text{ROOH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$
Catalase	CAT	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
		$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe(III)-E} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}=\text{Fe(IV)-E}(\cdot+)$
		$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}=\text{Fe(IV)-E}(\cdot+) \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Fe(III)-E} + \text{O}_2$
Superoxyde dismutase	SOD	$\text{M}^{(n+1)+}\text{-SOD} + \text{O}_2 \rightarrow \text{M}^{n+}\text{-SOD} + \text{O}_2$
		$\text{M}^{n+}\text{-SOD} + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{M}^{(n+1)+}\text{-SOD} + \text{H}_2\text{O}_2$

#### 4.3.1.2 Les antioxydants non-enzymatiques

Beaucoup d'antioxydants non-enzymatiques utilisés aujourd'hui ont été trouvés dans des plantes comme le ginseng, le curcuma, le gingko, le romarin, le thé vert, le raisin, le gingembre ou encore l'ail. Ces antioxydants appartiennent dans la majorité des cas aux groupes des composés phénoliques, des flavonoïdes, des caroténoïdes, des stéroïdes ou des composés thiolés (Lotito et Frei 2006, Lü et al. 2010). Le **Tableau II-9** présente certaines molécules antioxydantes non-enzymatiques connues.

Tableau II-9 : Exemples de molécules antioxydantes non-enzymatiques

Nom	Structure	Action	Référence bibliographique
Vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol)		Captation des radicaux peroxydes lipidiques et arrêt de la chaîne de réactions de peroxydation des lipides	Nimse et Pal 2015
Vitamine C (acide ascorbique)		Réduction des radicaux peroxydes et régénération de l' $\alpha$ -tocophérol	Nimse et Pal 2015
Mélatonine (N-acetyl-5-methoxytryptamine)		Réduction des radicaux superoxyde et hydroxyle	Poeggeler et al. 1994
Coenzyme Q10, (Ubiquinone et Ubiquinol, forme réduite et active)		Prévention et réduction des rides, permet la régénération de l' $\alpha$ -tocophérol	Blatt et Littarru 2011



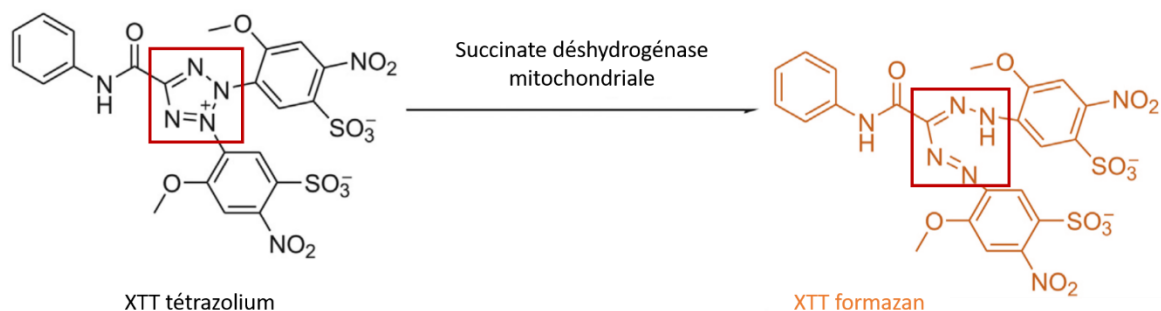
La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qu'elles soient endogènes ou exogènes, entraîne entre autres conséquences le vieillissement des tissus et particulièrement de la peau. Les antioxydants, inhibiteurs de l'oxydation et donc de la formation de ROS sont alors de précieux alliés pour aider la peau dans sa lutte contre la production et l'élimination des radicaux libres. Beaucoup de molécules antioxydantes non-enzymatiques sont d'origine naturelle comme les quatre molécules présentées dans le tableau ci-dessus (**Tableau II-9**). Nous pouvons alors nous demander si nos extraits de bardane montrent une activité antioxydante et possèdent des molécules responsables de cette activité. Le but de cette étude est aussi de voir si l'une des méthodes de culture ou si l'une des lumières d'élicitation permet d'augmenter cette activité antioxydante. Des tests de criblage cellulaire et chimiques ainsi que de dosage sont alors mis en place pour tenter de mettre en évidence la présence de molécules antioxydantes dans les extraits.

#### 4.3.1.3 Test cellulaire *in vitro*

Le criblage cellulaire *in vitro* permet de se rapprocher au plus près de l'activité réelle des extraits sur des cellules de peau. Les cellules utilisées sont la plupart du temps des kératinocytes qui représentent 90% des cellules de l'épiderme. Les kératinocytes utilisés dans ce type d'analyse *in vitro* proviennent de lignées cellulaires de type HaCaT, résultant de l'immortalisation spontanée de kératinocytes normaux humains. Cette lignée cellulaire a été mise au point en 1988 par l'équipe du Docteur Fusenig (Boukamp et al 1988). Elle provient d'une culture primaire à long terme de kératinocytes cutanés humains obtenue après une excision chirurgicale de peau humaine à la périphérie d'un mélanome localisé dans le dos d'un patient de 62 ans. Cette lignée a été développée suite à une culture prolongée de ces cellules à une température élevée et avec de faibles concentrations de calcium. Les cellules de cette lignée sont considérées comme immortelles et possèdent une capacité à se différencier normalement. Ces cellules conservent leur capacité pour restituer un épiderme structuré après une transplantation *in vivo* et demeurent relativement proches de kératinocytes humains normaux ce qui fait de ces cellules un intéressant modèle d'étude *in vitro* (Fusenig et Boukamp 1998).

Dans notre étude, la lignée cellulaire HaCaT a été obtenue à partir de l'American Type Culture Collection (ATCC) et cultivée dans du milieu de Eagle modifié de Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle media en anglais ou DMEM) à forte teneur en glucose supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur, 50 UI/mL de pénicilline, 50 mg/mL de streptomycine et 2 mM de glutamine. La culture est maintenue dans une atmosphère humidifiée à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Avant chacun des tests, les cellules sont déposées au nombre de  $2,5 \times 10^4$  cellules par puits et laissées 24 heures à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> afin d'atteindre 90% de confluence.

Ce criblage cellulaire d'activité *in vitro* sera effectué en deux étapes. Une première étape où l'innocuité de nos extraits sur les cellules HaCaT sera testée en utilisant une solution de XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) qui va permettre d'évaluer la viabilité cellulaire. Ce test est basé sur le suivi de la réduction de l'anneau tétrazolium contenu dans la molécule de XTT qui est incolore en formazan de couleur orange menée par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes (Figure II-16).



**Figure II-15** : Réduction enzymatique de l'anneau tétrazolium du XTT en formazan. Encadré en rouge : anneau tétrazolium à gauche et formazan à droite, adaptation de Kuete et al. 2017

Pour cette étape d'étude de la cytotoxicité, le kit Cell Proliferation II (XTT) de Roche a été utilisé en suivant les instructions du fournisseur. Tout d'abord après que les cellules aient atteint 90% de confluence, dans chaque puits 100  $\mu$ L de nos extraits à différentes concentrations sont ajoutés et laissés à incuber 24 heures en présence des cellules. Pendant ce temps, la solution de XTT est préparée en proportion 50:1 avec 5 mL de XTT labelling reagent et 0,1 mL d'électron coupling reagent. Ce réactif ainsi préparé est ensuite dilué au 1/3 dans le milieu de culture. Après les 24 heures d'incubation le dosage XTT est réalisé comme suit : le milieu de culture est éliminé des plaques et chaque puits est rincé deux fois avec du PBS. Dans chacun des puits est ajouté 100  $\mu$ L de la solution de XTT et les plaques sont mises à incuber 4 heures à 37°C à l'obscurité avec 5% de CO<sub>2</sub>. L'intensité de la coloration est ensuite quantifiée par une mesure de l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Victor (PerkinElmer, USA). Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité en normalisant la valeur observée pour les cellules non traitées à une valeur arbitraire de 100%. Toutes les analyses ont été réalisées au moins sur trois expériences indépendantes en triplicat.

La seconde étape consiste à évaluer l'activité de protection contre les ROS de nos extraits *in vitro* sur ces cellules. Ici un stress sera appliqué sur les cellules qui naturellement vont produire des ROS. La quantité de ROS ainsi produits sera évaluée grâce à une molécule, la 2',7'-Dichlorodihydrofluorescéine diacétate (DCF-DA). Sous l'action des ROS dans les cellules de kératinocytes, cette molécule de DCF-DA sera oxydée en 2',7'-Dichlorofluorescéine (DCF) qui est une molécule fluorescente (Figure II-17).

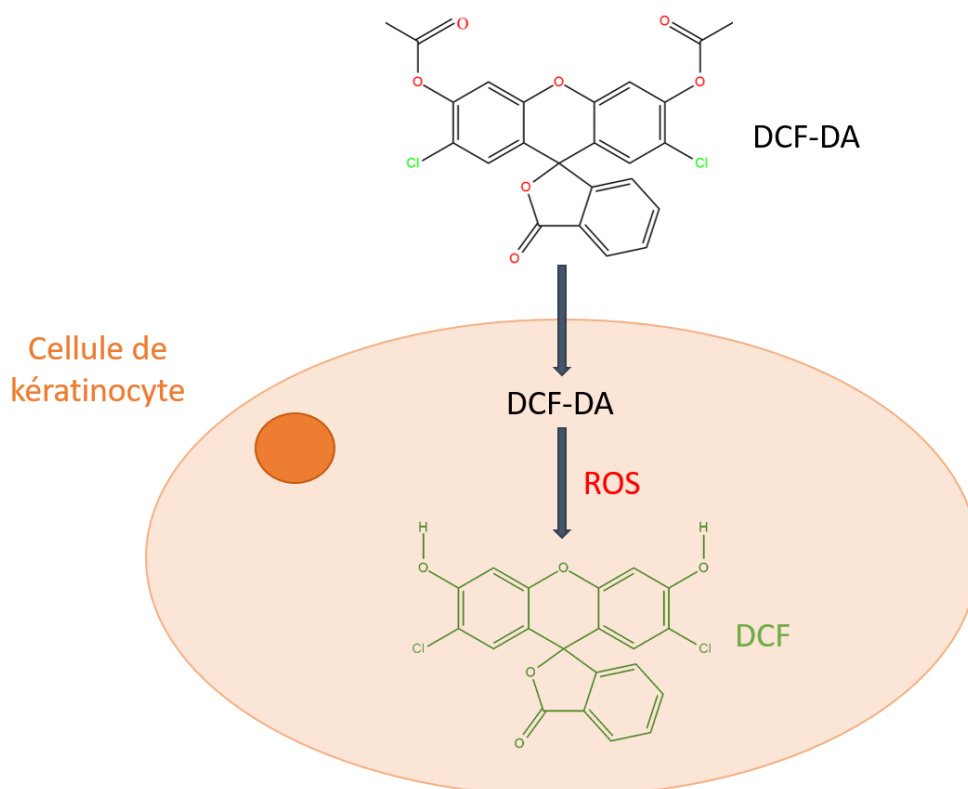


Figure II-16 : Schéma représentatif de l'action des ROS sur la conversion du DCF-DA en DCF fluorescent

Pour cette analyse de protection contre les ROS après que les cellules de kératinocytes aient atteint 90% de confluence comme indiqué précédemment on ajoute dans chaque puits nos extraits à différentes concentrations et on laisse incuber les extraits avec les cellules pendant six heures à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après ces six heures d'incubation, 200 µL de DCF-DA à 10 µM sont ajoutés dans chacun des puits et incubés pendant 20 minutes. À la suite de cette incubation, un lavage est réalisé avec du PBS puis la plaque est irradiée avec des rayonnements ultraviolets de type B (UVB) à raison de 25 mJ/cm<sup>2</sup> puis mise à incuber 30 minutes à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les valeurs de fluorescence sont mesurées à 490-535 nm à l'aide du même spectrophotomètre que pour l'étude de cytotoxicité. Les cellules non irradiées seront utilisées comme contrôle interne afin de mesurer le niveau basal de ROS dans les cellules. Les résultats sont exprimés en pourcentage de protection en normalisant la valeur de fluorescence observée pour les cellules irradiées « contrôles » utilisées comme témoins à une valeur arbitraire de 100%. Toutes les analyses ont été réalisées au moins trois fois en triplicat.

L'ensemble de ces tests de criblage cellulaire ont été réalisés au Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) d'Orléans, un des partenaires de notre projet. Ces activités mesurées *in vitro* sont complétées avec des tests de dosage et des tests d'activités biologiques *in tubo*.

#### 4.3.1.4 Test de dosage des composés phénoliques totaux : méthode de Folin-Ciocalteu

Comme indiqué précédemment, la majorité des antioxydants non enzymatiques issus de plantes appartiennent aux groupes des composés phénoliques, entre autres. Il nous est alors apparu intéressant de doser les composés phénoliques présents dans nos extraits afin d'obtenir des informations de première intention sur la teneur de ces composés et ainsi sur la potentielle teneur en antioxydants de nos extraits.

La méthode la plus couramment utilisée pour quantifier les composés phénoliques totaux est la méthode dite de Folin-Ciocalteu. Cette méthode fait appel au réactif de Folin-Ciocalteu, qui est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique, qui a été développé en 1927 par Otto Folin et Vintilă Ciocâlțeu pour quantifier la tyrosine et le tryptophane dans des protéines (Folin et Ciocâlțeu 1927). Cette méthode également appelée méthode GAE pour Gallic Acid Equivalence method en anglais est un dosage colorimétrique *in vitro* basé sur le suivi de la réduction, par un transfert d'électron provenant de composés phénoliques en conditions alcalines, du complexe d'acides phosphomolybdique/phosphotungstique du réactif de Folin de couleur **jaune** en oxydes de tungstène et de molybdène de couleur **bleu** (Figure II-18). Ce changement de coloration est suivi par une mesure au spectrophotomètre de l'absorbance à 650 nm.

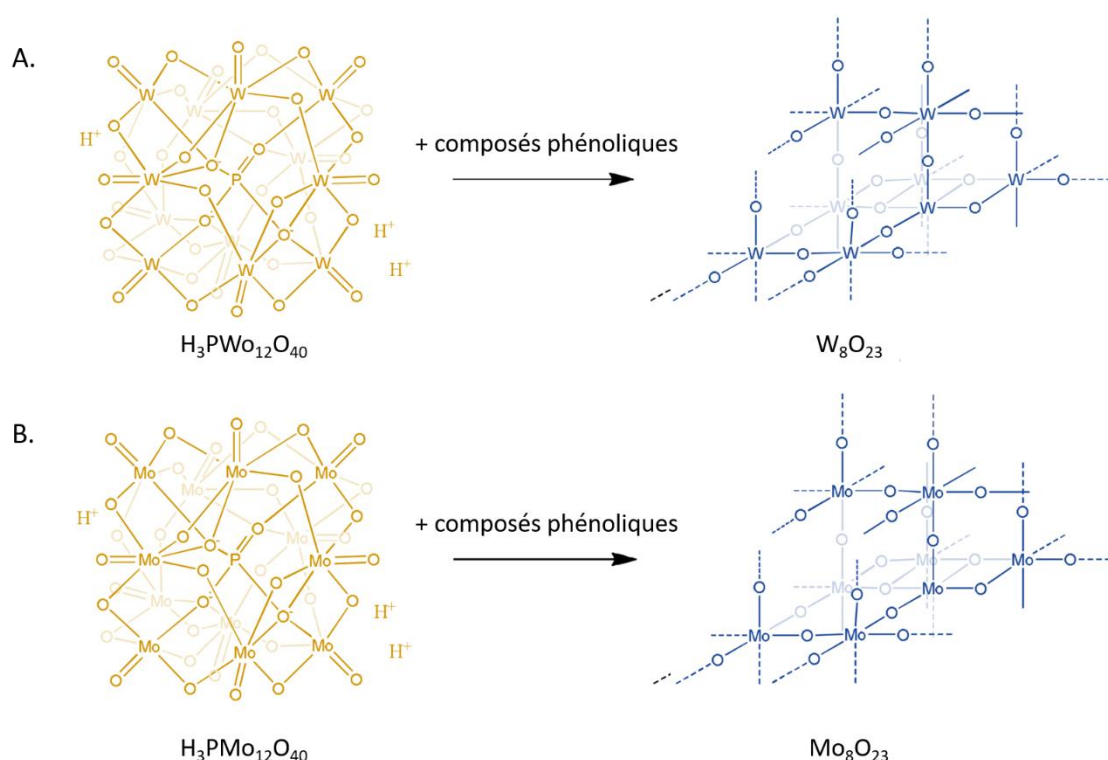


Figure II-17 : Réactions avec des composés phénoliques de l'acide phosphotungstique (A) et de l'acide phosphomolybdique (B), adaptation de Bancuta et al. 2016

Une molécule de référence est utilisée dans le but de pouvoir comparer les échantillons entre eux. Cette molécule est l'acide gallique, l'un des six isomères de l'acide trihydroxybenzoïque. Dans ce test, la teneur en composés phénoliques totaux des extraits est exprimée en mg/L d'équivalent d'acide gallique par mg de poids sec de l'échantillon.

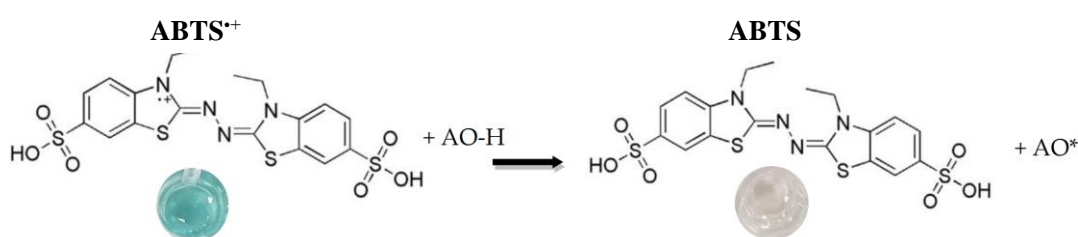
La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée grâce au réactif de Folin-Ciocalteu en utilisant la méthode décrite par Arias et *al.* (Arias et *al.* 2016). 10  $\mu$ L d'extrait sont mélangés avec 180  $\mu$ L d'une préparation composée de 4% de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) dans 0,1 M d'hydroxyde de sodium (NaOH), 0,02% de tartrate de potassium et de sodium tétrahydraté ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6, 4\text{H}_2\text{O}$ ) et 0,02% de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, 10  $\mu$ L de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/3 dans de l'eau distillée sont ajoutés dans le milieu et après 30 minutes d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 650 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque Multiskan Go de ThermoFischer couplé au logiciel SkanIt. L'acide gallique est utilisé comme standard afin de réaliser une courbe d'étalonnage et la teneur en composés phénoliques totaux est exprimée en mg/L d'équivalent d'acide gallique par mg de poids sec de l'échantillon.

#### 4.3.1.5 Tests d'activités antioxydantes *in tubo*

Les tests d'activité antioxydante *in tubo* sont des tests réalisés en première intention afin de déterminer s'il est nécessaire d'approfondir les études menées sur les extraits. Ce sont des tests faciles à mettre en œuvre que l'on peut retrouver pour certains sous forme de kits commerciaux. La mesure de l'activité antioxydante s'effectue par mesure d'absorbance des extraits étudiés. Ces tests chimiques *in tubo* permettent l'étude d'un grand nombre d'échantillons grâce à l'utilisation de plaques 96 puits. Dans la cadre de nos recherches, nous nous sommes concentrés sur trois tests : les tests d'activité antioxydante évaluée par la méthode TEAC, par le test DPPH et par le test CUPRAC.

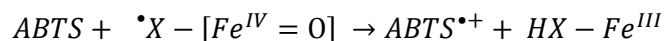
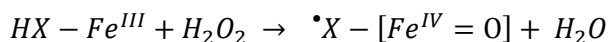
##### i) Méthode TEAC ou ABTS

La méthode TEAC pour Trolox Equivalent Antioxidant Capacity en anglais est une technique spectrophotométrique basée sur l'utilisation d'un radical cationique coloré **bleu/vert** stable, l'ABTS<sup>•+</sup> (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenthioazoline-6-sulfonique), qui se décolore lorsqu'il est réduit par un antioxydant suite au transfert d'un électron (**Figure II-19**). Cette décoloration est suivie par une mesure de l'absorbance à 405 nm au spectrophotomètre.



**Figure II-18** : Réaction entre le radical ABTS et un composé antioxydant (AO-H), Drouet 2019

Avec le kit et le protocole SigmaAldrich (CS0790) utilisé, la formation d'un radical de ferryle myoglobine ( $\cdot X-[Fe^{IV}=O]$ ) suite à la réaction de la métmyoglobine ( $HX-Fe^{III}$ ) avec le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) va induire l'oxydation de la molécule ABTS en un cation radicalaire  $ABTS^{\bullet+}$  :



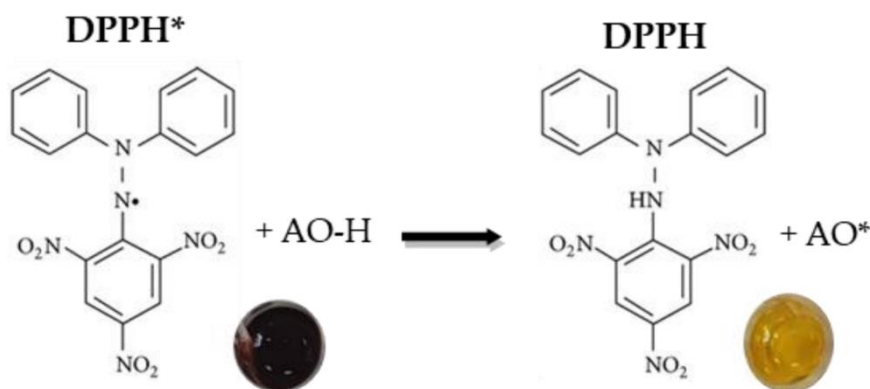
Une molécule de référence est utilisée dans le but de pouvoir comparer les échantillons entre eux. Cette molécule est le Trolox (acide (+)-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxilique) qui est un analogue structurale hydrosoluble de la vitamine E.

Dans ce test, la capacité antioxydante des extraits exprimée en équivalent Trolox correspondra à la concentration de Trolox en  $\mu\text{mol/L}$  ou en  $\mu\text{g/mL}$  ayant la même activité qu'une même concentration unitaire d'extrait à tester.

Le test est réalisé selon le protocole du fournisseur comme suit : le tampon fourni est dilué au 1:10 dans de l'eau ultrapure et est utilisé pour diluer certains des réactifs du test. Une solution stock à 1,5 mM de Trolox est réalisée en ajoutant le tampon de dilution, cette solution stock servira à préparer une gamme de concentration de Trolox allant de 0 à 0,42 mM afin de créer une courbe standard d'inhibition. Concernant la métmyoglobine, elle est obtenue à partir d'une solution de myoglobine. Une solution stock à 3,51 mg/mL est réalisée avec de l'eau ultrapure puis diluée 100 fois dans du tampon de dilution. La solution d'ABTS est quant à elle préparée en ajoutant une tablette d'ABTS avec une tablette de tampon citrate-phosphate dans 100 mL d'eau ultrapure. La solution de travail d'ABTS est réalisée en ajoutant 25  $\mu\text{L}$  d'une solution d'eau oxygénée 3% à 10 mL de la solution d'ABTS. Dans une plaque 96 puits, il faut dans chaque puits mélanger, 10  $\mu\text{L}$  d'extrait ou 10  $\mu\text{L}$  d'une concentration de Trolox, 20  $\mu\text{L}$  de solution de myoglobine à 35,1  $\mu\text{g/mL}$ , 150  $\mu\text{L}$  de la solution de travail d'ABTS puis laisser incuber 5 minutes à température ambiante. Après ce temps d'incubation, 100  $\mu\text{L}$  d'une solution Stop fournie dans le kit sont ajoutés et ensuite l'absorbance est lue à 405 nm en utilisant un lecteur de microplaque Multiskan Go de ThermoFischer couplé au logiciel SkanIt.

### ii) Test DPPH

Le test DPPH pour 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging Capacity en anglais est utilisé pour mesurer la capacité de piégeage des radicaux libres. Le test est basé sur la capacité d'un antioxydant à réduire le radical libre DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle) de couleur **violette** qui se décolore alors un **jaune** (**Figure II-20**). Cette décoloration est mesurée grâce au suivi de l'absorbance à 630 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.



**Figure II-19** : Réaction du radical stable DPPH avec un composé antioxydant (AO-H), Drouet 2019

Comme pour la méthode TEAC, le Trolox sera utilisé comme molécule de référence pour comparer les extraits entre eux.

Pour ce test DPPH, une gamme de concentration de Trolox allant de 0 à 1000 µg/mL est réalisée afin de créer une courbe standard d'inhibition. Une solution stock de DPPH est réalisée à 600 mM par dissolution de 23,5 mg de DPPH dans 100 mL d'éthanol absolue. Une solution de travail est ensuite préparée à 60 mM par dilution au 1/10<sup>ème</sup> de la solution précédente dans de l'éthanol absolu. Dans une plaque 96 puits, il faut dans chaque puits mélanger 10 µL d'extrait ou 10 µL d'une concentration de Trolox et 190 µL de la solution DPPH à 60 mM. Le mélange réactionnel est incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Après ce temps d'incubation, l'absorbance est lue à 630 nm en utilisant un lecteur de microplaque Multiskan Go de ThermoFischer couplé au logiciel SkanIt.

### iii) Test CUPRAC

La méthode CUPRAC pour Cupric Reducing Antioxidant Capacity en anglais mesure la capacité d'un antioxydant à réduire l'ion cuivre II  $\text{Cu}^{2+}$  de couleur **bleu clair** en ion cuivre I  $\text{Cu}^+$  de couleur **orange** par le transfert d'un électron (**Figure II-21**). Ce changement de coloration est suivi par mesure de l'absorbance à 450 nm au spectrophotomètre.

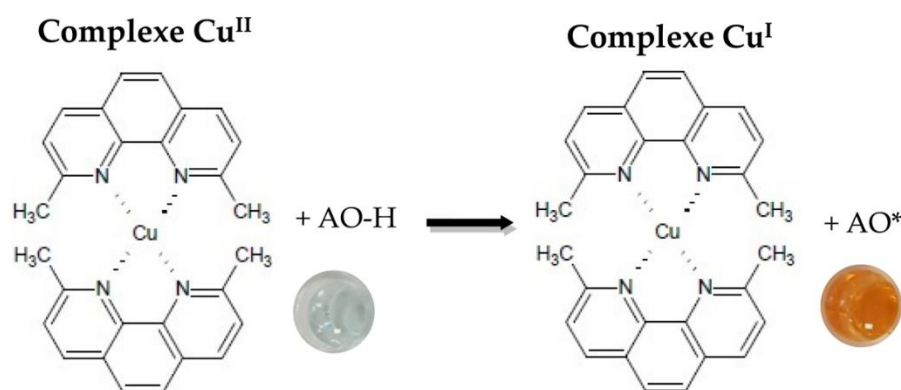


Figure II-20 : Réaction du complexe cuivre avec un composé antioxydant (AO-H), Drouet 2019

Comme pour la méthode TEAC et DPPH, le Trolox sera utilisé comme molécule de référence pour comparer les extraits entre eux.

Pour ce test CUPRAC, une gamme de concentration de Trolox allant de 0 à 600 µg/mL est réalisée afin de créer une courbe standard d'inhibition. Afin de préparer le mélange CUPRAC, trois solutions sont à préparer avant d'être mélangées à volume équivalent. Tout d'abord un tampon d'acétate d'ammonium (C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>) 1 M pH7,0 est réalisé par dissolution de 7,7 g d'acétate d'ammonium dans 100 mL d'eau ultrapure. Avec vérification et ajustement du pH à 7,0, le tampon est utilisé dans la préparation d'autres solutions. Ensuite, une solution de cuivre II à 10 mM est réalisée par dissolution de 100 mg de cuivre II dans 50 mL du tampon d'acétate d'ammonium. Enfin une solution de néocuproïne, un chélateur de l'ion cuivre, est effectuée par dissolution de 78 mg de néocuproïne dans 50 mL d'éthanol absolu. Ces trois solutions sont mélangées à volume équivalent pour former le mélange CUPRAC. Dans une plaque 96 puits, il faut dans chaque puits mélanger 10 µL d'extrait ou 10 µL d'une concentration de Trolox et 190 µL du mélange CUPRAC. Le mélange réactionnel est incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Après ce temps d'incubation, l'absorbance est lue à 450 nm en utilisant un lecteur de microplaque Multiskan Go de ThermoFischer couplé au logiciel SkanIt.

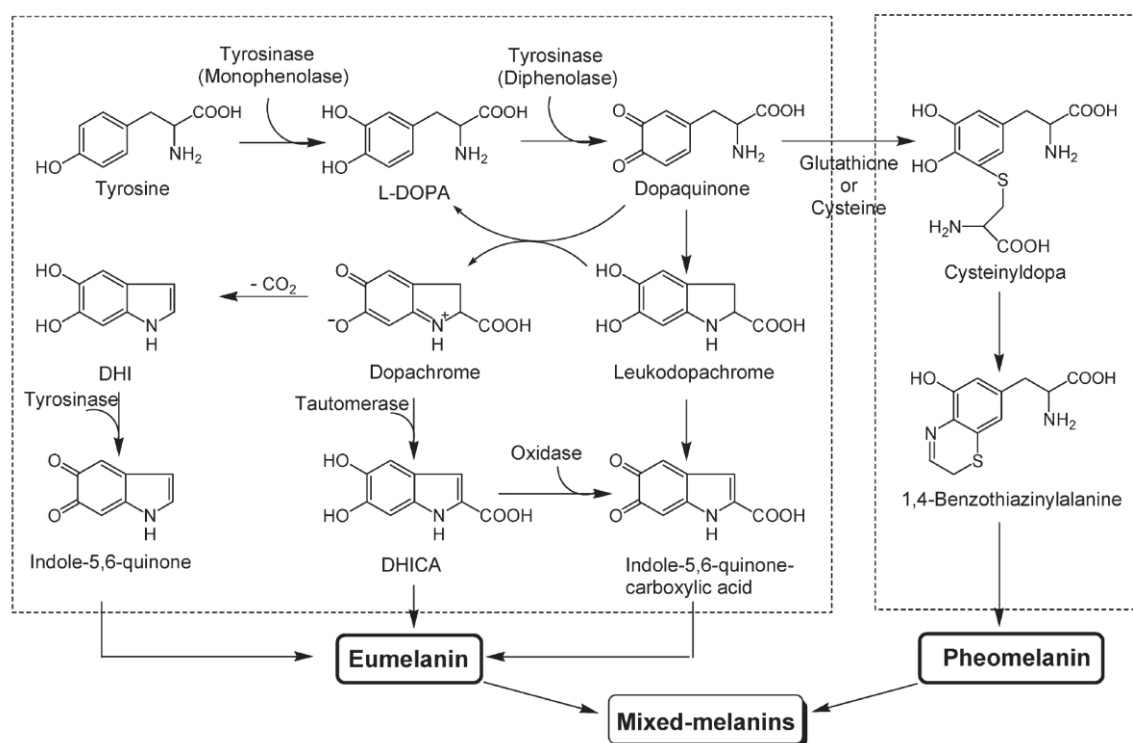
Pour chacun de ces trois tests chimiques, 10 µL de chaque extrait est inséré dans un puits de la plaque et complété au volume total du test par le tampon utilisé dans le test et l'absorbance de l'extrait seul est mesurée aux longueurs d'ondes utilisées dans chaque test.

Après avoir présenté les acteurs du stress oxydatif et les tests réalisés pour mettre en évidence des extraits et/ou des molécules ayant la capacité de contrer les effets négatifs des ROS nous allons maintenant nous attarder sur la seconde cible, la diminution de l'hyperpigmentation.



### 4.3.2 La tyrosinase : cible pour le traitement de l'hyperpigmentation

De nombreuses enzymes sont aujourd'hui la cible d'une large variété de tests d'activité de par leur implication dans les processus de vieillissement de la peau. Parmi ces enzymes on peut notamment retrouver la tyrosinase. À ce jour, l'inhibition ou le ralentissement de l'activité catalytique de la tyrosinase est une cible pour améliorer ou prévenir les troubles hyper-pigmentaires de la peau. En effet les premières étapes de la synthèse des mélanines, les pigments naturels de la peau, au sein des mélanocytes, sont régulées par la tyrosinase. Il existe deux types de mélanines, les phéomélanines qui sont des pigments jaune-rouge et les eumélanines qui elles sont des pigments brun-noir. Elles sont toutes deux responsables de la pigmentation constitutive de la peau et les eumélanines ont en plus un rôle de photoprotection. La synthèse de l'ensemble des mélanines (**Figure II-22**) débute par l'hydroxylation de la tyrosine en L-DOPA suivi par l'oxydation de la L-DOPA en dopaquinone. Ces deux étapes sont catalysées par la même enzyme, la tyrosinase. La suite de la synthèse des mélanines se poursuit avec la dopaquinone qui s'oriente dans la voie des phéomélanines si elle rencontre une grande quantité de cystéine, sinon elle entre dans la voie des eumélanines.



**Figure II-21** : Voie de biosynthèse des mélanines, Kim et Uyama 2005

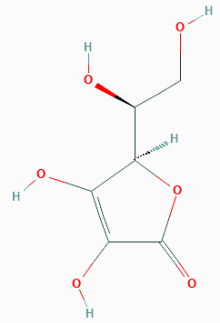
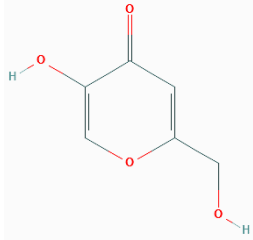
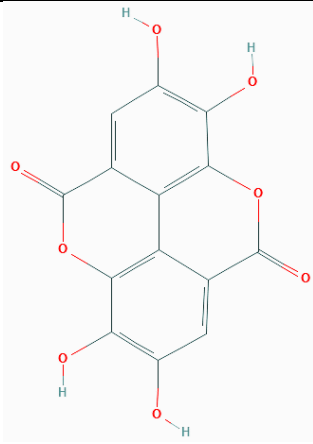
Lors du vieillissement cellulaire un dérèglement de cette voie de biosynthèse va conduire à une surproduction de mélanines et à l'apparition de taches de couleur brune sur la peau. Ces taches brunes qui apparaissent avec l'âge sont appelées lentigos séniles et surviennent majoritairement au niveau des zones qui sont les plus exposées aux rayonnements ultraviolets comme le dos des mains, le visage, les épaules ou encore le décolleté.

À ce jour, plusieurs molécules sont utilisées afin d'inhiber l'hyperpigmentation. Le mode d'action de ces molécules est basé sur différents principes :

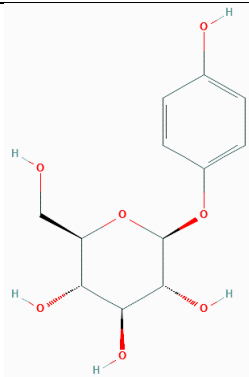
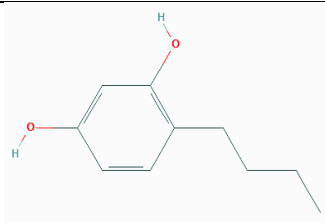
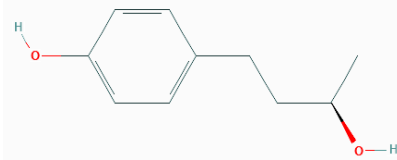
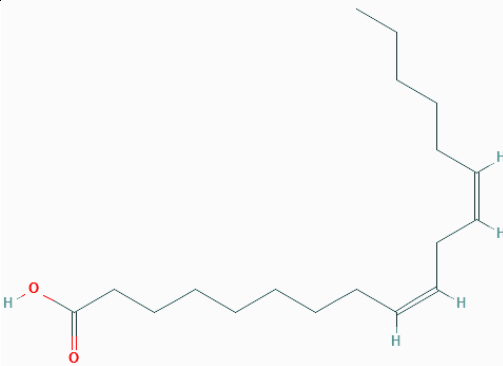
- L'inhibition d'une des étapes de la biosynthèse des mélanines en inhibant une des enzymes impliquées dans la mélanogénèse ou en s'intercalant comme analogue structural d'un des composés de la voie de synthèse. Des composés possédant une structure de monophénol comme l'acide kojique ou de diphenol telle que la glabridine sont régulièrement identifiés comme inhibiteurs de la tyrosinase du fait qu'ils peuvent agir en tant qu'inhibiteurs compétitifs au détriment des substrats naturels.
- La diminution du taux de tyrosinase par l'accélération de sa dégradation ou par l'inhibition de sa maturation. L'acide linoléique ou le magnolignan, un néolignan de *Magnolia obovata*, sont des exemples de molécules ayant ce type d'action.
- L'inhibition de la signalisation entre les kératinocytes et les mélanocytes notamment en bloquant ou en diminuant la production et la signalisation des cytokines inflammatoires induites par les rayonnements ultraviolets de type B (UVB). Des ingrédients comme l'extrait de camomille peuvent par conséquent inhiber l'activation des mélanocytes ce qui a pour conséquence d'inhiber l'activité de la tyrosinase.
- La stimulation de l'excrétion de la mélanine de l'épiderme en accélérant le renouvellement épidermique. Des molécules comme l'adénosine monophosphate (AMP) retrouvée dans l'extrait de placenta peuvent par cette action guérir les troubles hyperpigmentaires.

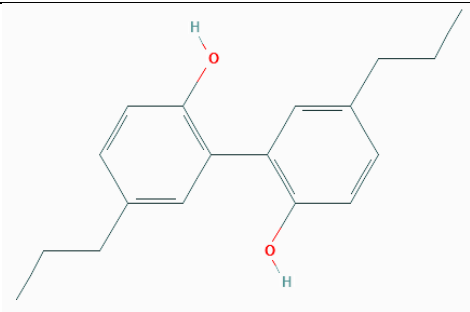
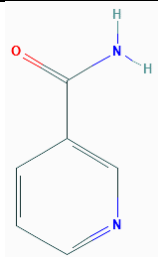
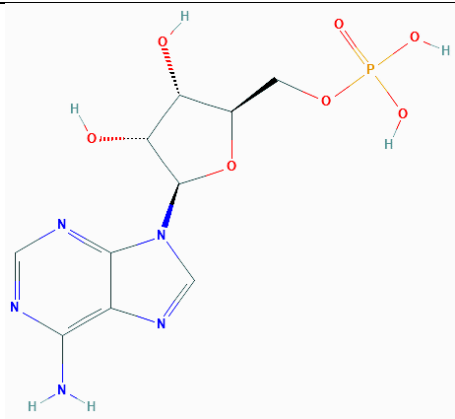
Le **Tableau II-10** présente des exemples de molécules inhibitrices, ainsi que leur mode d'action, utilisées dans le traitement des troubles hyperpigmentaires et approuvées par le Ministère japonais de la Santé, du Travail et des Affaires Sociales (MHLW).

Tableau II-10 : Composés utilisés pour le traitement de l'hyperpigmentation approuvés par le Ministère japonais de la Santé, du Travail et des Affaires Sociales (MHLW)

Mode d'action	Mécanisme	Composé	Structure chimique	Référence
Inhibition de l'activité de la tyrosinase	Antioxydant	Acide ascorbique et dérivés		Ando 2017
		Acide kojique		Higa et al. 2007
	Chélation avec l'atome de cuivre	Acide ellagique		Shimogaki et al. 2000

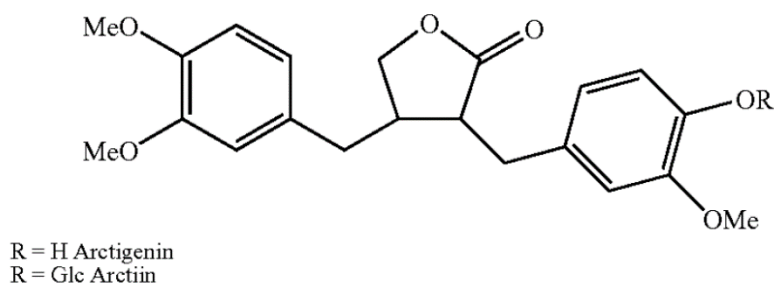
Suite **Tableau II-10**

Inhibition de l'activité de la tyrosinase (suite)	Inhibition compétitive	Arbutine		Maeda et Fukuda 1996
		Rucinol		Kim et al. 2005
		Rhododendrol		Ando 2017
Diminution du taux de tyrosinase	Accélération de la dégradation de l'enzyme	Acide linoléique		Ando et al. 2004

Diminution du taux de tyrosinase (suite)	Inhibition de la maturation de l'enzyme	Magnolignan		Nakamura et <i>al.</i> 2003
Inhibition de la signalisation entre kératinocytes et mélanocytes	Inhibition de l'inflammation induite par les UVB	Extrait de camomille	Molécule non identifiée à l'heure actuelle	Ando 2017
Inhibition du transfert des mélanosomes	Inhibition de la dispersion de la mélanine	Niacinamide		Hakozaki et <i>al.</i> 2002
Accélération du renouvellement épidermique	Excrétion de la mélanine	Adenosine monophosphate (AMP)		Ando 2017



De nombreuses publications attestent à ce jour que des extraits de bardane, de la plante entière ou d'une partie de la plante, ainsi que des molécules extraites de la bardane possèdent une activité d'inhibition de la tyrosinase (Park et *al.* 2013, Horng et *al.* 2017, Lee et *al.* 2019). De plus, en 2010 un brevet a été déposé aux États-Unis par une équipe coréenne pour l'utilisation d'arctiine, d'arctigénine ou d'un mélange en proportion variable des deux composés dans des formulations cosmétiques (Lee et *al.* 2010). L'arctigénine et sa forme glucoside l'arctiine (**Figure II-23**) sont deux molécules extraites de la grande bardane notamment des graines et des racines.



**Figure II-22** : Formule de l'arctiine et de l'arctigénine, Lee et al. 2010

Nous pouvons alors nous demander si nos extraits de bardane qui montrent une inhibition de l'activité de la tyrosinase possèdent des molécules responsables de cette activité. Le but de cette étude est aussi de voir si l'une des méthodes de culture ou si l'une des lumières d'élicitation permet d'augmenter cette inhibition de la tyrosinase. Un test d'activité enzymatique est alors mis en place pour tenter de mettre en évidence des extraits possédant une action inhibitrice contre l'activité de la tyrosinase.

Pour ce test d'activité anti-tyrosinase, une solution de tyrosinase à 125 U/mL est préparée dans du tampon phosphate (PHB, 50 mM, pH=6,8). L'inhibiteur utilisé comme contrôle positif est la glabridine, afin de voir un effet dose-réponse deux concentrations sont étudiées, 100 µM et 10 µM. La solution du substrat, la L-DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine ou lévodopa) à 8.3 mM dans le tampon PHB pH 6,8 est préparée au dernier moment car le substrat est très vite dégradé. Dans une plaque de 96 puits, il faut mélanger dans chaque puits 40 µL d'extrait ou 40 µL d'inhibiteur et 40 µL de tyrosinase à 125 U/mL puis laisser incuber 5 minutes à température ambiante. Après incubation, 120 µL de L-DOPA sont ajoutés et la plaque est mise à incuber à 37°C dans une étuve pendant 30 minutes. L'absorbance est ensuite mesurée à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque Multiskan Go de ThermoFischer couplé au logiciel SkanIt.

Outre les troubles hyper-pigmentaires, d'autres altérations structurelles et physiologiques peuvent être observées lors du vieillissement cellulaire affectant l'apparence de la peau. C'est le cas notamment des rides. Leur formation est due à la fois au chrono-vieillessement mais aussi au photo-vieillessement et résulte d'une perte d'élasticité et de fermeté de la peau. Ces altérations des propriétés de la peau sont liées à la dégradation de protéines de la matrice extracellulaire de la peau (MEC), un assemblage de macromolécules dont font parties les collagènes et l'élastine. Nous nous sommes alors intéressés aux enzymes responsables de la dégradation du collagène et de l'élastine qui sont respectivement la collagénase et l'élastase, deux enzymes sécrétées par les fibroblastes du derme.

#### **4.3.3 Deux autres enzymes impliquées dans les processus de vieillissement cellulaire, l'élastase et la collagénase**

##### **4.3.3.1 L'élastine et l'élastase**

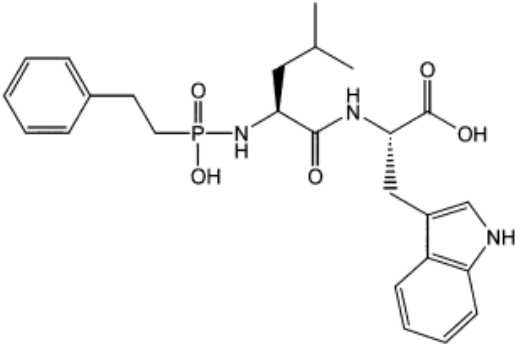
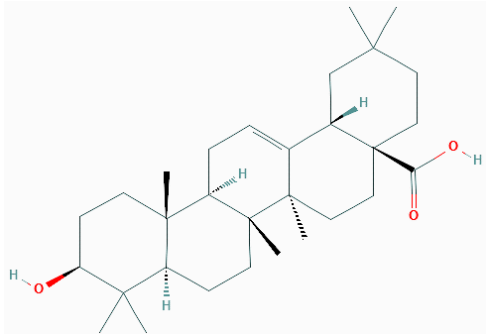
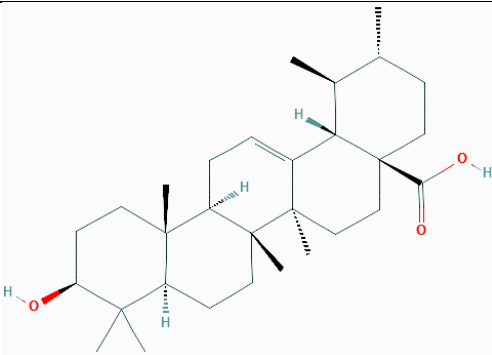
Dans une étude menée par Imokawa et Ishida sur des souris à différents âges, il a été montré que l'activité de l'élastase augmentait graduellement au cours du vieillissement et selon l'intensité des répétitions d'exposition aux rayons ultraviolets A et B. La perte d'élasticité de la peau tout compte la déformation du réseau des fibres élastiques ont pu être associées à une activation des élastases au sein des fibroblastes du derme provoquant ainsi l'apparition de rides et l'affaissement de la peau (Imokawa et Ishida 2015). Les élastases sont des enzymes de la classe des protéinases et possèdent la capacité d'hydrolyser l'élastine qui est insoluble en fragments d'élastine solubles. Il a été montré à ce jour qu'il existe au moins deux types d'élastases présentes dans la peau : tout d'abord l'élastase neutrophile, une protéase de sérine, et l'élastase de fibroblaste dermique, une métalloprotéinase (Tsuji et *al.* 2001). Dans notre étude sur l'activité *in tubo* de l'élastase, nous avons utilisé l'élastase issue de pancréas porcin possédant une masse moléculaire de 25,9 kDa.

De par la capacité des élastases à catalyser l'hydrolyse en fragments de l'élastine, une protéine de fibre élastique responsable de l'élasticité des tissus des vertébrés qui, avec le collagène, détermine les propriétés mécaniques des tissus conjonctifs, l'utilisation d'inhibiteurs ciblés sur les élastases est envisagée afin de ralentir l'action de ces enzymes et donc de ralentir le vieillissement cellulaire.

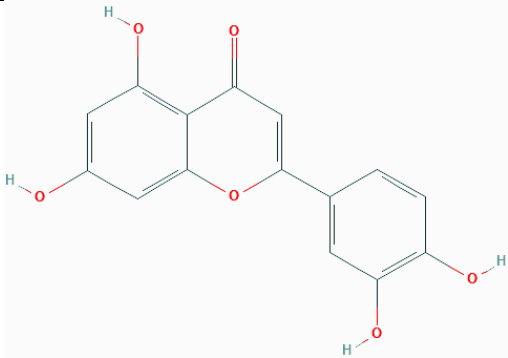
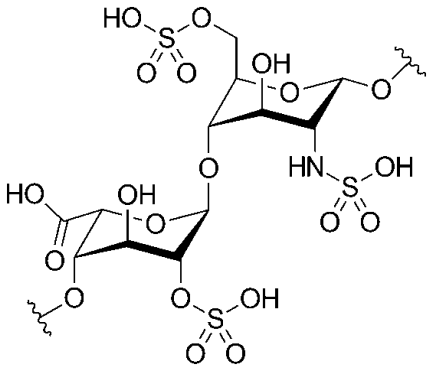
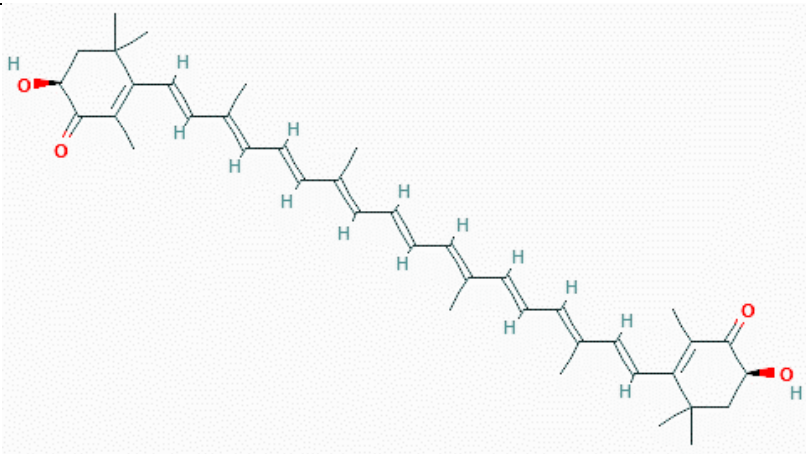
Certains inhibiteurs d'élastases, d'origine naturelle se trouvent parmi les composés phénoliques, les tannins ou bien les acides cinnamiques. Plusieurs molécules de ces familles moléculaires ont été montrées comme des inhibiteurs directs de l'activité de l'élastase neutrophile humaine, qui est connue pour sa capacité à cliver de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire comme le collagène IV ou l'élastine. Le **Tableau II-11** regroupe des exemples de molécules inhibitrices de l'élastase ainsi que leur origine.



Tableau II-11 : Exemples de molécules d'origine naturelle inhibitrices de l'élastase

Composé	Groupe moléculaire	Structure chimique	Origine	Référence bibliographique
NPLT (N-phenethyl-phosphonyl-L-leucyl-L-tryptophane)	Peptide		Synthétique	Imokawa et Ishida 2015
Acide oléanolique	Triterpénoïde pentacyclique		Feuilles et fruits d'olivier ( <i>Olea europaea</i> ) Feuilles du rosier de Woods ( <i>Rosa woodsii</i> ) Mesquite à miel ( <i>Prosopis glandulosa</i> )	Azmi et al. 2014
Acide ursolique	Triterpénoïde pentacyclique		Romarin ( <i>Salvia rosmarinus</i> ), thym ( <i>Thymus</i> ), origan ( <i>Origanum vulgare</i> ), lavande ( <i>Lavandula</i> )	Ying et al. 1991

Suite **Tableau II-11**

Lutéoline	Flavonoïdes		Feuille de réséda des teinturiers ( <i>Reseda luteola</i> )	Makarenko et Levitsky 2016
Héparine	Carbohydrates sulfatés		Muqueuse intestinale porcine	Spencer et al. 2006
Astaxanthine	Caroténoïdes		Plantes océaniques rouge et saumon ()	Elsner et al. 2015

Nous nous sommes demandés si nos extraits de bardane montraient une inhibition de l'activité de l'élastase. L'objectif de cette étude était également de voir si l'une des méthodes de culture ou si l'une des lumières d'élicitation permettait d'augmenter cette inhibition de l'élastase. Ainsi, un test d'activité enzymatique a alors été mis en place pour tenter de mettre en évidence des extraits possédant une action inhibitrice contre l'activité de l'élastase.

Le test d'activité anti-élastase est réalisé à l'aide du kit de ThermoFischer en suivant le protocole du fournisseur. Le tampon fourni est dilué à 1:10 dans de l'eau distillée. Une solution stock du substrat, DQ elastin, à 1 mg/mL est réalisée dans de l'eau distillée puis cette solution stock servira à préparer une solution de DQ elastin à 100 µg/mL dans le tampon du kit. Une solution stock d'inhibiteur, N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chloromethylketone, est également réalisée à 10 mg/mL dans du DMSO (dimethylsulfoxide), cette solution servira de départ pour préparer des solutions de travail à 40 µM et 4 µM dans du tampon. Pour l'enzyme élastase, une solution stock est réalisée à 100 U/mL dans de l'eau distillée puis diluée pour obtenir une solution de travail à 0,5 U/mL dans le tampon. Le test est réalisé dans une plaque de 96 puits, dans chaque puits il est nécessaire de mélanger 50 µL d'extrait ou 50 µL d'inhibiteur, 50 µL de DQ elastin à 100 µg/mL et 100 µL d'élastase à 0,5 U/mL. La plaque est mise à incuber 2 heures à l'obscurité et à température ambiante. La fluorescence est mesurée avec un lecteur de microplaque multimode Varioskan LUX de Thermo Scientific avec comme longueur d'onde d'excitation 505 nm et comme longueur d'onde d'émission 515 nm.

Nous nous sommes ensuite intéressés à une seconde enzyme responsable de la dégradation d'un des composants de la matrice extracellulaire.

#### 4.3.3.2 Le collagène et la collagénase

Dans une étude menée sur un peu moins de 50 patients, Varani et *al.* ont pu montrer qu'une diminution des taux de collagènes, notamment du collagène I, dans les peaux exposées au soleil était corrélée à une augmentation de la dégradation des collagènes et non à une baisse de la production des collagènes car celle-ci reste inchangée (Varani et *al.* 2001). De plus dans une autre étude menée sur des biopsies de peaux âgées Contet-Audonneau et *al.* ont pu remarquer une diminution de l'expression du collagène VII, un constituant des fibrilles d'ancrage de la jonction dermoépidermique, dans les kératinocytes au niveau des zones exposées aux UV provoquant alors des rides de part des connexions affaiblies entre le derme et l'épiderme (Contet-Audonneau et *al.* 1999). Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sont des endopeptidases dépendantes du zinc qui possède un site catalytique comprenant 3 résidus d'histidines avec un ion  $Zn^{2+}$  et qui sont capables de dégrader les composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène (Kähäri et Saarialho-Kere, 1997). Dans

la peau, les métalloprotéinases matricielles MMP-1, MMP-8 et MMP-13 qui sont synthétisées au sein des kératinocytes, des fibroblastes, des macrophages, des cellules endothéliales, des éosinophiles et des neutrophiles (Kähäri et Saarialho-Kere, 1997) appartiennent au groupe des collagénases. Parmi les trois collagénases, la MMP-1 est la plus importante, elle intervient dans le renouvellement, la cicatrisation et la reconstruction des tissus. De plus, elle est capable de dégrader les collagènes fibrillaires alors que les autres MMPs ne peuvent pas dégrader des fragments de collagène déjà détériorés (Krieg et *al.* 1988). Dans notre étude sur l'activité *in tubo* de la collagénase, nous avons utilisé la collagénase issue de la bactérie *Clostridium histolyticum* possédant une masse moléculaire d'environ 115 kDa qui a la capacité de dégrader le tropocollagène qui est l'unité fondamentale du collagène dans les conditions physiologiques (Kim et *al.* 2004).

À ce jour, l'utilisation d'inhibiteurs de collagénases est devenue une bonne stratégie dans le but de diminuer l'expression des métalloprotéinases matricielles de type collagénase dans la peau et ainsi ralentir le vieillissement.

Suite à des travaux de modélisation moléculaire, des molécules inhibitrices possédant une structure pseudo-peptidique et mimant le site de clivage du substrat ont été synthétisées. La majorité des inhibiteurs synthétiques étudiés *in vitro* et *in vivo* sont des dérivés hydroxamates dont les plus connus sont le Batimastat<sup>•</sup> et le Marimastat<sup>•</sup> (Figure II-24).

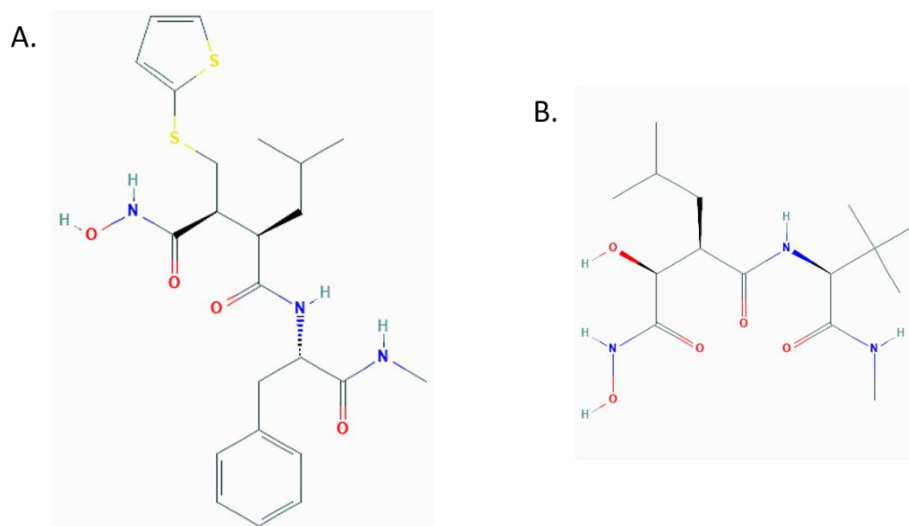
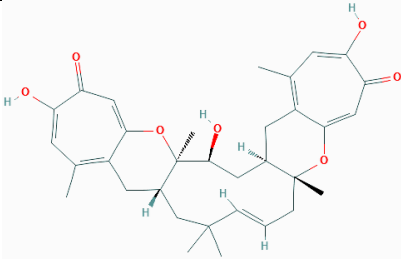
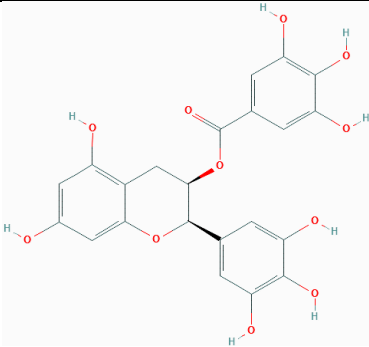
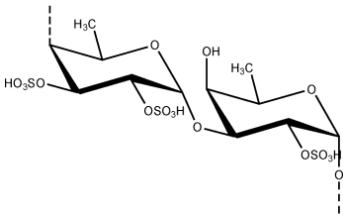
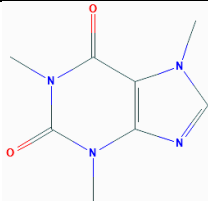


Figure II-23 : Exemples d'inhibiteurs synthétiques de la collagénase, la Batimastat<sup>•</sup> (A) et le Marimastat<sup>•</sup> (B)

Certains inhibiteurs de la collagénase peuvent être d'origine naturelle. Le Tableau II-12 regroupe des exemples de molécules inhibitrices de la collagénase ainsi que leur origine et leur mécanisme d'action.

Tableau II-12 : Exemples de molécules d'origine naturelle inhibitrices de la collagénase

Composé	Structure chimique	Origine	Mécanisme	Référence bibliographique
Pycnidione		Agent dérivé de champignon	Inhibiteurs de MMPs	Leung et al 2000
Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)		Thé vert ( <i>Camellia sinensis</i> )	Inhibition de la dégradation du collagène et inhibition de l'induction de collagénases	Bae et al. 2008
Fucoidans		Algues brunes ( <i>Undaria pinnatifida</i> )	Inhibition de MMP-1 activé par les UVB dans les fibroblastes	Moon et al. 2008
Caféine		Café, thé (boissons)	Inhibition de collagénases	Eun Lee et al. 2019

Nous pouvons nous demander si nos extraits de bardane possèdent des capacités d'inhibition de la collagénase. Le but de cette étude visant l'activité de la collagénase était également d'évaluer l'apport ou non d'une des méthodes de culture ou d'une des lumières d'éllicitation sur l'augmentation de l'inhibition de la collagénase. Ainsi, un test d'activité enzymatique a alors été mis en place pour tenter de mettre en évidence des extraits possédant une action inhibitrice contre l'activité de la collagénase.

Le test d'activité anti-collagénase est réalisé à l'aide du kit de ThermoFischer en suivant le protocole du fournisseur. Le tampon fourni est dilué à 1:10 dans de l'eau distillée. Une solution stock du substrat, DQ gelatin, à 1 mg/mL est réalisée dans de l'eau distillée puis placée dans un bain à ultrasons pendant 5 minutes pour faciliter la dissolution du substrat. Une solution stock d'inhibiteur, 1,10-Phenanthroline monohydrate, est également réalisée à 10 mM en pesant 9,9 mg d'inhibiteur que l'on solubilise dans 25  $\mu$ L d'éthanol absolu, 2 mL de tampon est ensuite ajouté à 10  $\mu$ L de ce mélange pour obtenir la concentration désirée. Des solutions de travail de l'inhibiteur sont ensuite préparées à 1,25 mM et 125  $\mu$ M dans du tampon. Pour l'enzyme, une solution stock est réalisée à 1000 U/mL dans de l'eau distillée puis diluée pour obtenir une solution de travail à 0,4 U/mL dans le tampon. Le test est réalisé dans une plaque de 96 puits, dans chaque puits il est nécessaire de mélanger 80  $\mu$ L d'extrait ou 80  $\mu$ L d'inhibiteur, 20  $\mu$ L de DQ gelatin à 1 mg/mL et 100  $\mu$ L de collagénase à 0,4 U/mL. La plaque est mise à incuber 2 heures à l'obscurité et à température ambiante. La fluorescence est mesurée avec comme longueur d'onde d'excitation 495 nm et comme longueur d'onde d'émission 515 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque multimode Varioskan LUX de Thermo Scientific.

## 5 En résumé

Ce chapitre nous a permis de dresser l'ensemble des stratégies, des techniques et des méthodologies qui seront appliquées au cours de notre étude. Parmi celles-ci, nous retrouvons l'approche métabolomique qui sera mise en œuvre afin de cartographier les effets d'une éllicitation lumineuse lors d'une culture en hydroponie passive ou active. Outre la cartographie de l'empreinte phytochimique des extraits de plante obtenus, les activités de ces différentes conditions seront évaluées en interne de l'ICOA pour les tests *in tubo* et en externe avec notre partenaire du CBM pour les tests biologiques sur la toxicité, la prolifération cellulaire et la protection contre les ROS des kératinocytes. Une corrélation entre l'activité de l'extrait et son profil phytochimique sera faite afin de mieux comprendre la nature de l'impact de l'éllicitation lumineuse qu'il soit bénéfique ou non.

Afin de valoriser les activités potentielles en cosmétique des méthodes de culture innovantes, nous nous attarderons dans un premier temps sur la capacité d'inhibition de l'activité de la tyrosinase

de nos extraits ainsi que sur l'identification de ou des molécules responsables de cette activité qui seront présentés et discutés dans la Partie 1 du **Chapitre III**. La Partie 2 du **Chapitre III** sera consacrée à l'activité de protection contre les ROS que cela soit par des mesures *in vitro* ou *in tubo* mais aussi à l'identification de ou des molécules impliquées.

# Références bibliographiques

**Ando H. (2017).** Chapter 44 -Melanogenesis. In Sakamoto K., Lochhead R.Y., Maibach H.I., & Yamashita M. (Éds.), *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications* (Elsevier, p. 729-736). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802005-0.00044-6>

**Ando H., Watabe H., Valencia J. C., Yasumoto K., Furumura M., Funasaka Y., Oka M., Ichihashi M., & Hearing V. J. (2004).** Fatty Acids Regulate Pigmentation via Proteasomal Degradation of Tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 15427-15433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313701200>

**Arias J. P., Zapata K., Rojano B., & Arias M. (2016).** Effect of light wavelength on cell growth, content of phenolic compounds and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 163, 87-91. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.014>

**Azmi N., Hashim P., Hashim D. M., Halimoon N., & Majid N. M. N. (2014).** Anti-elastase, anti-tyrosinase and matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity of earthworm extracts as potential new anti-aging agent. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, S348-S352. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1166>

**Azwanida N. N. (2015).** A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 04(03). <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>

**Bae J.-Y., 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. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.112>

**Bancuta O. R., Chilian A., Bancuta I., Gheboianu A., Setnescu R., Setnescu T., & Gheboianu A. (2016).** Improvement of spectrophotometric method for determination of phenolic compounds by statistical investigations. *Romanian Journal of Physics*, 61(7-8), 1255-1264

**Besanger T. R., Hodgson R. J., Guillon D., & Brennan J. D. (2006).** Monolithic membrane-receptor columns : Optimization of column performance for frontal affinity chromatography/mass spectrometry applications. *Analytica Chimica Acta*, 561(1-2), 107-118. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.062>



**Birben E., Sahiner U. M., Sackesen C., Erzurum S., & Kalayci O. (2012).** Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>

**Blatt T. & Littarru G. P. (2011).** Biochemical rationale and experimental data on the antiaging properties of CoQ10 at skin level. *BioFactors*, 37(5), 381-385. <https://doi.org/10.1002/biof.169>

**Bose S., Munsch T., Lanoue A., Garros L., Tungmunnithum D., Messaili S., Destandau E., Billet K., St-Pierre B., Clastre M., Abbasi B. H., Hano C., & Giglioli-Guivarc'h N. (2020).** UPLC-HRMS Analysis Revealed the Differential Accumulation of Antioxidant and Anti-Aging Lignans and Neolignans in In Vitro Cultures of *Linum usitatissimum* L. *Frontiers in Plant Science*, 11, 508658. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.508658>

**Boukamp P., Petrussevska R. T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., & Fusenig N. E. (1988).** Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, 106(3), 761-771. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>

**Contet-Audonneau J. L., Jeanmaire C., & Pauly G. (1999).** A histological study of human wrinkle structures : Comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles, and sun-protected areas: HISTOLOGY OF WRINKLES. *British Journal of Dermatology*, 140(6), 1038-1047. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1999.02901.x>

**Démarchez M. (2012).** *Le stress oxydant cutané* [En ligne]. <https://biologiedelapeau.fr>

**Dole M., Mack L. L., Hines R. L., Mobley R. C., Ferguson L. D., & Alice M. B. (1968).** Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics*, 49(5), 2240-2249. <https://doi.org/10.1063/1.1670391>

**Drouet S. (2019).** *Du Chardon Marie et des flavonolignanes (MARILINE) : Valorisation de la biodiversité structurale issue de populations sauvages et cultivées pour des applications cosmétiques* [Thèse de doctorat]. Université d'Orléans

**Elsner P., Sivamani R. K., Jagdeo J., & Maibach H.I. (Éds.). (2016).** *Cosmeceuticals and Active Cosmetics* (Third Edition). CRC Press

**Eun Lee K., Bharadwaj S., Yadava U., & Kang S. G. (2019).** Evaluation of caffeine as inhibitor against collagenase, elastase and tyrosinase using *in silico* and *in vitro* approach. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 927-936. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1596904>

**Ferey J. (2017).** *Développement d'outils analytiques basés sur la spectrométrie de masse pour le suivi d'interactions enzyme-ligand dans le domaine de la Santé* [Thèse de doctorat]. Université d'Orléans

- Folin O. & Ciocâlțeu V. (1927).** On tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627-650. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)84277-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)84277-6)
- Fusenig N. E. & Boukamp P. (1998).** Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Molecular Carcinogenesis*, 23, 144-158. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2744\(199811\)23:3<3C144::AID-MC3>3E3.O.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2744(199811)23:3<3C144::AID-MC3>3E3.O.CO;2-U)
- Ganceviciene R., Liakou A. I., Theodoridis A., Makrantonaki E., & Zouboulis C. C. (2012).** Skin anti-aging strategies. *Dermato-Endocrinology*, 4(3), 308-319. <https://doi.org/10.4161/derm.22804>
- Hakozaki T., Minwalla L., Zhuang J., Chhoa M., Matsubara A., Miyamoto K., Greatens A., Hillebrand G. G., Bissett D. L., & Boissy R. E. (2002).** The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer. *British Journal of Dermatology*, 147(1), 20-31. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2002.04834.x>
- Higa Y., Kawabe M., Nabae K., Toda Y., Kitamoto S., Hara T., Tanaka N., Kariya K., & Takahashi M. (2007).** Kojic acid—Absence of tumor-initiating activity in rat liver, and of carcinogenic and photo-genotoxic potential in mouse skin. *The Journal of Toxicological Sciences*, 32(2), 143-159. <https://doi.org/10.2131/jts.32.143>
- Horng C.-T., Wu H.-C., Chiang N.-N., Lee C.-F., Huang Y.-S., Wang H.-Y., Yang J.-S., & Chen F.-A. (2017).** Inhibitory effect of burdock leaves on elastase and tyrosinase activity. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(4), 3247-3252. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4880>
- Imokawa G. & Ishida K. (2015).** Biological Mechanisms Underlying the Ultraviolet Radiation-Induced Formation of Skin Wrinkling and Sagging I : Reduced Skin Elasticity, Highly Associated with Enhanced Dermal Elastase Activity, Triggers Wrinkling and Sagging. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 7753-7775. <https://doi.org/10.3390/ijms16047753>
- Iribarne J. V. & Thomson B. A. (1976).** On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics*, 64(6), 2287. <https://doi.org/10.1063/1.432536>
- Kähäri V.-M. & Saarialho-Kere U. (1997).** Matrix metalloproteinases in skin. *Experimental Dermatology*, 6(5), 199-213. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.1997.tb00164.x>
- Kammeyer A. & Luiten R.M. (2015).** Oxidation events and skin aging. *Ageing Research Reviews*, 21, 16-29. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.01.001>

- Kim D.-S., Kim S.-Y., Park S.-H., Choi Y.-G., Kwon S.-B., Kim M.-K., Jung-Im Na J.-I., Youn S.-W., & Park K.-C. (2005).** Inhibitory effects of 4-n-butylresorcinol on tyrosinase activity and melanin synthesis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(12), 2216-2219. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.2216>
- Kim Y.-J. & Uyama H. (2005).** Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources : Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(15), 1707-1723. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5054-y>
- Kim Y.-J., Uyama H., & Kobayashi S. (2004).** Inhibition effects of (+)-catechin–aldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(1), 256-261. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.163>
- Konermann L., Ahadi E., Rodriguez A. D., & Vahidi S. (2013).** Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. *Analytical Chemistry*, 85(1), 2-9. <https://doi.org/10.1021/ac302789c>
- Krieg T., Hein R., Hatamochi A., & Aumailley M. (1988).** Molecular and clinical aspects of connective tissue. *European Journal of Clinical Investigation*, 18(2), 105-123. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1988.tb02400.x>
- Kuete V., Karaoslanoglu O., & Sivas H. (2017).** Chapter 10—Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. In Kuete V. (Éd.), *Medicinal Spices and Vegetables from Africa—Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases* (Elsevier, p. 271-297). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8>
- Lee C. J., Park S. K., Kang J. Y., Kim J. M., Yoo S. K., Han H. J., Kim D.-O., & Heo H. J. (2019).** Melanogenesis regulatory activity of the ethyl acetate fraction from *Arctium lappa* L. leaf on  $\alpha$ -MSH–induced B16/F10 melanoma cells. *Industrial Crops and Products*, 138, 111581. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111581>
- Lee J. N., Choi J. E., Kim S. W., Lee K. T., & Lee K. K. (2010).** *Cosmetic composition for skin whitening comprising arctiin, arctigenin or the mixture thereof as active* (Patent N° US 2010/0104524 A1)
- Legeron-Lieutenant R. (2015).** *La spectrométrie de masse appliquée à la quantification absolue des anticorps monoclonaux thérapeutiques en milieu plasmatique pour la réalisation d'études pharmacocinétiques-pharmacodynamiques* [Thèse de doctorat]. Université de Bordeaux
- Leung D., Abbenante G., & Fairlie D. P. (2000).** Protease Inhibitors : Current Status and Future Prospects. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(3), 305-341. <https://doi.org/10.1021/jm990412m>

- Lotito S. & Frei B. (2006).** Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans : Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine*, 41(12), 1727-1746. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.033>
- Lü J.-M., Lin P. H., Yao Q., & Chen C. (2010).** Chemical and molecular mechanisms of antioxidants : Experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 840-860. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>
- Maeda K. & Fukuda M. (1996).** Arbutin : Mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 276(2), 765-769
- Makarenko O. & Levitsky A. (2016).** Biochemical Mechanisms of Therapeutic and Prophylactic Effects of Bioflavonoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4, 451-456. <https://doi.org/10.17265/2328-2150/2016.08.013>
- Michel T. (2011).** *Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (Hippophaë rhamnoides)* [Thèse de doctorat]. Université d'Orléans
- Moon H. J., Lee S. R., Shim S. N., Jeong S. H., Stonik V. A., Rasskazov V. A., Zvyagintseva T., & Lee Y. H. (2008).** Fucoïdan Inhibits UVB-Induced MMP-1 Expression in Human Skin Fibroblasts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(2), 284-289. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.284>
- Morel G. & Wetmore R. H. (1951).** Fern callus tissue culture. *American Journal of Botany*, 38(2), 141-143. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1951.tb14804.x>
- Murashige T. & Skoog F. (1962).** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nakamura K., Yoshida M., Uchiwa H., Kawa Y., & Mizoguchi M. (2003).** Down-regulation of melanin synthesis by a biphenyl derivative and its mechanism. *Pigment Cell Research*, 16(5), 494-500. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00084.x>
- Nimse S. B. & Pal D. (2015).** Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986-28006. <https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>
- Olesen K., Karlsson R., Lind U., Davidson M., Blomberg A., & Karlsson A. (2013).** Detection of ligand–receptor binding using microfluidic frontal affinity chromatography on proteoliposomes derived directly from native cell membranes. *Journal of Chromatography B*, 931, 84-89. <https://doi.org/10.1016/J.jchromb.2013.05.010>

**Park H., Song K. H., Jung P. M., Kim J.-E., Ro H., Kim M. Y., & Ma J. Y. (2013).** Inhibitory Effect of Arctigenin from Fructus Arctii Extract on Melanin Synthesis via Repression of Tyrosinase Expression. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2013/965312>

**Pétrier C., Gondrexon N., & Boldo P. (2008).** *Ultrasons et sonochimie*. 18

**Poeggeler B., Saarela S., Reiter R. J., Tan D.-X., Chen L.-D., Manchester L. C., & Barlow-Walden L. R. (1994).** Melatonin-A Highly Potent Endogenous Radical Scavenger and Electron Donor : New Aspects of the Oxidation Chemistry of this Indole Accessed *in vitro*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 738(1), 419-420. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb21831.x>

**Salwiński A. (2014).** *Development of novel mass spectrometry-based approaches for searching for low-mass tyrosinase inhibitors in complex mixtures* [Thèse de doctorat]. Université d'Orléans

**Salwiński A., Da Silva D., Delépée R., & Maunit B. (2014).** Enzyme-Coupled Nanoparticles-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry for Searching for Low-Mass Inhibitors of Enzymes in Complex Mixtures. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 25(4), 538-547. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-0826-y>

**Shimogaki H., Tanaka Y., Tamai H., & Masuda M. (2000).** *In vitro* and *in vivo* evaluation of ellagic acid on melanogenesis inhibition. *International Journal of Cosmetic Science*, 22(4), 291-303. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2494.2000.00023.x>

**Slon-Usakiewicz J. J., Ng W., Foster J. E., J.-R., Deretey E., Toledo-Sherman L., Redden P. R., Pasternak A., & Reid N. (2004).** Frontal Affinity Chromatography with MS Detection of EphB2 Tyrosine Kinase Receptor. 1. Comparison with Conventional ELISA. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(21), 5094-5100. <https://doi.org/10.1021/jm049733a>

**Smith C. A., Want E. J., O'Maille G., Abagyan R., & Siuzdak G. (2006).** XCMS : Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Analytical Chemistry*, 78(3), 779-787. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>

**Sparavigna A. (2017).** Aging and the Recovery of Skin Function and Appearance. In Watson R. R. (Éd.), *Nutrition and Functionnal Foods for Healthy Aging* (p. 11-16). [www.doi.org/10.1016/B978-0-12-805376-8.00002-2](http://www.doi.org/10.1016/B978-0-12-805376-8.00002-2)

**Spencer J. L., Stone P. J., & Nugent M. A. (2006).** New Insights into the Inhibition of Human Neutrophil Elastase by Heparin. *Biochemistry*, 45(30), 9104-9120. <https://doi.org/10.1021/bi060338r>

- Temporini C., Pochetti G., Fracchiolla G., Piemontese L., Montanari R., Moaddel R., Laghezza A., Altieri F., Cervoni L., Ubiali D., Prada E., Loiodice F., Massolini G., & Calleri E. (2013).** Open tubular columns containing the immobilized ligand binding domain of peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  for dual agonists characterization by frontal affinity chromatography with mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1284, 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.077>
- Tsuji N., Moriwaki S., Suzuki Y., Takema Y., & Imokawa G. (2001).** The Role of Elastases Secreted by Fibroblasts in Wrinkle Formation : Implication Through Selective Inhibition of Elastase Activity¶. *Photochemistry and Photobiology*, 74(2), 283-290. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)0740283TROESB2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0740283TROESB2.0.CO2)
- van den Berg R. A., Hoefsloot H. C. J., Westerhuis J. A., Smilde A. K., & van der Werf M. J. (2006).** Centering, scaling, and transformations : Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7(1), 142. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>
- Varani J., Spearman D., Perone P., Fligiel S. E. G., Datta S. C., Wang Z. Q., Shao Y., Kang S., Fisher G. J., & Voorhees J. J. (2001).** Inhibition of Type I Procollagen Synthesis by Damaged Collagen in Photoaged Skin and by Collagenase-Degraded Collagen in Vitro. *The American Journal of Pathology*, 158(3), 931-942. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64040-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64040-0)
- Vinatoru M., Toma M., Radu O., Filip P. I., Lazurca D., & Mason T.J. (1997).** The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4(2), 135-139. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(97\)83207-5](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(97)83207-5)
- Wang L. & Weller C. L. (2006).** *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants*. 13
- Wong S. F., Meng C. K., & Fenn J. B. (1988).** Multiple charging in electrospray ionization of poly(ethylene glycols). *The Journal of Physical Chemistry*, 92(2), 546-550. <https://doi.org/10.1021/j100313a058>
- Yamashita M. & Fenn J. B. (1984).** Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry*, 88(20), 4451-4459. <https://doi.org/10.1021/j150664a002>
- Ying Q. L., Rinehart A. R., Simon S. R., & Cheronis J. C. (1991).** Inhibition of human leucocyte elastase by ursolic acid. Evidence for a binding site for pentacyclic triterpenes. *Biochemical Journal*, 277(2), 521-526. <https://doi.org/10.1042/bj2770521>





# Chapitre III: Influence d'une approche d'élicitation et de différents modes de culture sur le profil phytochimique et l'activité biologique de molécules issues d'une plante modèle







# Table des matières

<b>CHAPITRE III: INFLUENCE D'UNE APPROCHE D'ELICITATION ET DE DIFFERENTS MODES DE CULTURE SUR LE PROFIL PHYTOCHIMIQUE ET L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE MOLECULES ISSUES D'UNE PLANTE MODELE.....</b>	<b>122</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>123</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>125</b>
<b>2 ÉVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE A VISEE COSMETIQUE DE TREIZE PLANTES .....</b>	<b>126</b>
2.1 Criblage d'activité biologique <i>in tubo</i> des treize plantes .....	127
2.1.1 Évaluation de l'activité antioxydante par des tests chimiques.....	127
2.1.2 Évaluation de l'activité d'inhibition des enzymes tyrosinase, élastase et collagénase impliquées dans les processus de vieillissement cellulaire .....	129
2.1.2.1 Évaluation de l'activité inhibitrice sur la tyrosinase extraite de champignon .....	129
2.1.2.2 Évaluation de l'activité inhibitrice sur l'élastase extraite de pancréas porcin.....	131
2.1.2.3 Évaluation de l'activité inhibitrice sur la collagénase extraite de la bactérie <i>Clostridium histolyticum</i> .....	132
2.2 Choix de la plante modèle pour les études d'optimisation des extraits .....	134
<b>3 MISE EN PLACE D'UNE CULTURE DE CALS DE LA GRANDE BARDANE ET EVALUATION DE L'INFLUENCE DE L'ELICITATION .....</b>	<b>134</b>
<b>4 APPORT DU MODE DE CULTURE DE LA GRANDE BARDANE ET DE L'ELICITATION LUMINEUSE SUR LE PROFIL PHYTOCHIMIQUE DE SES EXTRAITS ET DE LEURS ACTIVITES BIOLOGIQUES .....</b>	<b>138</b>
4.1 <u>Partie 1</u> : Évaluation de l'impact du mode de culture et de l'élicitation sur l'activité anti-tyrosinase et identification des molécules responsables de cette activité.....	141
4.1.1 Suivi de la présence de l'arctiine et de l'arctigénine dans les extraits de grande bardane issus des différents modes de culture .....	141
4.1.2 Évaluation de l'activité anti-tyrosinase des extraits de bardane élicités.....	147
4.1.2.1 Activité des extraits de cals sur la tyrosinase extraite de champignon .....	147
4.1.2.2 Activité sur la tyrosinase des extraits d'hydroponie active avec et sans élicitations	147
4.1.2.3 Activité anti-tyrosinase des extraits d'hydroponie passive réalisés sous différentes lumières d'élicitation .....	149
4.1.3 Recherche et proposition de candidats par une approche différentielle non ciblée ....	150
4.1.4 En résumé.....	159
4.2 <u>Partie 2</u> : Impact de l'élicitation sur l'activité antioxydante et identification de molécules responsables de cette activité.....	161

4.2.1 Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de bardane cultivée en hydroponie active .....	161
4.2.1.1 Tests d'activité antioxydante in tubo.....	161
i) Test DPPH.....	161
ii) Test CUPRAC .....	162
4.2.1.2 Criblage cellulaire in vitro sur des cellules de kératinocytes .....	164
i) Étude de l'innocuité des extraits sur les cellules de kératinocytes HaCaT .....	164
ii) Évaluation de la protection contre les ROS des extraits de bardane cultivée en hydroponie active.....	166
4.2.2 Identification des molécules responsables de la capacité de protection des kératinocytes contre les ROS .....	168
4.2.2.1 Molécules impliquées dans la cytotoxicité des extraits et sa diminution observée en présence des extraits sous lumière bleue.....	169
4.2.2.2 Molécules impliquées dans l'augmentation de la capacité de protection contre les ROS au cours du temps de culture .....	175
i) Étude dans les racines.....	175
ii) Étude dans les feuilles.....	181
4.2.2.3 Molécules impliquées dans les différences de capacité de protection observées en fonction de la lumière utilisée .....	186
4.2.2.4 Molécules impliquées dans les différences de capacité de protection observées en fonction de l'organe étudié .....	190
4.2.2.1 Molécules impliquées dans la capacité de protection des kératinocytes contre les ROS dans les extraits de bardane indépendamment de l'organe étudié.....	195
<b>5 CONCLUSION .....</b>	<b>207</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>209</b>

---

*Après avoir présenté les différentes stratégies et méthodes mises en œuvre lors de ces recherches nous allons ci-après nous intéresser au choix des plantes étudiées dans ce projet. Nous présenterons ensuite une étude préliminaire sur l'apport d'un stress abiotique, ici une éllicitation lumineuse, menée sur une culture de cals de bardane afin d'évaluer la faisabilité de l'éllicitation lumineuse et les effets de celle-ci sur l'augmentation ou non de molécules d'intérêt. Nous appliquerons enfin l'ensemble des stratégies énoncées dans le chapitre précédent sur une plante modèle, la grande bardane, cultivée grâce à différentes méthodes de culture notamment la culture de cals ainsi que l'hydroponie passive à l'échelle du laboratoire et l'hydroponie active à échelle pilote avec la collaboration du CDHR Centre-Val de Loire. Afin de mesurer l'influence et l'apport d'une éllicitation lumineuse sur la production de métabolites bioactifs ainsi que ces effets selon trois modes de culture de la grande bardane, nous comparerons les activités des extraits végétaux obtenus sur une cible enzymatique, la tyrosinase, et sur leur activité antioxydante, deux allégations recherchées dans le domaine de la cosmétique, et nous tenterons de corrélérer ces effets à un patrimoine phytochimique particulier ou différencié par une analyse par spectrométrie de masse haute résolution.*

## 1 Introduction

Afin de permettre la valorisation du patrimoine végétal local en région Centre-Val de Loire dans le domaine de la cosmétique, la mise en œuvre et le suivi de cultures innovantes telles que l'hydroponie active, l'hydroponie passive et la culture de cals ont été investigués. C'est ainsi qu'une campagne de criblage d'activités sur des extraits issus de culture de plantes à l'échelle du laboratoire et à l'échelle pilote sous serre avec notre partenaire le CDHR Centre-Val de Loire a été réalisée afin de faire ressortir une ou des conditions de cultures les plus favorables quant aux activités biologiques recherchées que sont l'activité anti-tyrosinase et/ou antioxydante.

Il a tout d'abord été nécessaire dans un premier temps de réaliser une sélection des plantes à étudier parmi les différentes plantes choisies par les différents membres du consortium à l'aide de tests de criblage d'activité. À l'issue d'une première sélection effectuée sur treize plantes au départ, trois plantes modèles ont été choisies pour nos recherches, à savoir la grande bardane, le chardon Marie et l'échinacée pourpre.

Une première expérience d'éllicitation lumineuse via des LED émettant dans le bleu, le rouge et en lumière blanche a alors été réalisée à l'échelle du laboratoire sur des cals de la grande bardane, plante qui a été désignée par l'ensemble des partenaires comme plante circulaire du projet ValBioCosm'.

Ainsi, l'effet de l'élicitation lumineuse des cals de la grande bardane a été évalué par l'étude du profil phytochimique et de l'activité à la fois anti-tyrosinase et antioxydante des extraits issus de chacun de ces cals.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont été réalisés en collaboration avec le Centre de Biophysique Moléculaires (CBM) UPR 4301 du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) d'Orléans au sein duquel ont été menés notamment les tests de criblage cellulaire pour la détermination *in cellulo* de l'activité antioxydante.

## 2 Évaluation de l'activité biologique à visée cosmétique de treize plantes

La recherche de nouveaux actifs pour l'industrie cosmétique est aujourd'hui un secteur en progression constante de par les nouvelles attentes des consommateurs pour des produits plus naturels moins allergisants et dont on peut facilement suivre la traçabilité. Aujourd'hui de nombreuses réglementations encadrent l'utilisation en cosmétique de produits naturels ce qui est un réel défi pour les industries en cosmétique. Parmi ces réglementations on peut notamment retrouver le Protocole de Nagoya sur l'accès et le partage des avantages (APA) entré en vigueur en 2014 qui est un accord international sur la biodiversité. L'APA a pour but le partage juste et équitable des avantages qui peuvent découler de l'utilisation des ressources génétiques dans un but commercial ou de recherche. Dès 2003, l'Office chinois de contrôle des médicaments et des produits alimentaire (China Food and Drug Administration, CFDA) a publié une liste recensant tous les ingrédients approuvés pour leur utilisation en cosmétique sur le marché chinois. Cette liste appelée Inventaire des Ingrédients Cosmétiques Existants en Chine (Inventory of Existing Cosmetic Ingredients in China, IECIC) mise à jour en 2015 contient 8783 ingrédients (Industries Cosmétiques 2016). Pour ce marché des cosmétiques devenu stratégique, il existe depuis 2018 un nouveau programme de normes qui s'applique aux cosmétiques distribués en Chine. Depuis 2021, s'applique une nouvelle réglementation aux produits cosmétiques importés ou produits sur le sol chinois. Elle est dénommée CSAR (Cosmetic Supervision and Administration Regulation). Les requis pour l'homologation et l'étiquetage sont fréquemment mis à jour et les dernières mesures s'appliquent depuis le 1<sup>er</sup> mai 2021.

Ainsi l'ensemble des treize plantes sélectionnées dans ce projet ont été choisies pour leurs activités potentielles déjà décrites dans la littérature et sur le fait qu'elles rentrent dans la réglementation IECIC. Pour chacune de ces plantes, il a ainsi été possible de distinguer la ou les parties de chacune d'elles qui présentent un intérêt en termes d'activité cosmétique quelles soit antioxydante ou anti-âge (**Tableau III-1**).

Tableau III-1 : Liste des différents organes d'intérêt « cosmétique » étudiés pour chacune des treize plantes

Partie d'intérêt	Feuilles	Racines	Akènes ou Graines	Parties aériennes fleuries	Sarment	Queue
Plantes	Alchémille vulgaire	Grande bardane	Chardon Marie	Pensées sauvages	Vigne	Cerise
	Coléus	Chicorée	Lin	Trèfle		
	Gentiane	Echinacée pourpre				
	Ortie					

C'est ainsi que l'ensemble de ces treize plantes ont été récupérées dans le consortium sous forme de broyats issus de précédents projets menés en région Centre-Val de Loire pour une comparaison uniforme des activités des extraits éthanolique/eau et une comparaison avec les activités décrites dans la littérature. En effet, l'ensemble de tous les échantillons correspondant à chacun des organes et ce pour les treize plantes ont été extraits à partir de chacun de ces broyats suivant le protocole décrit dans le **Chapitre II**. Par la suite, les tests d'activité *in tubo* ont été réalisés sur les extraits bruts non évaporés obtenus après une extraction aux ultrasons en engageant pour chacun 1 g de broyat et 10 mL de solvant.

## 2.1 Criblage d'activité biologique *in tubo* des treize plantes

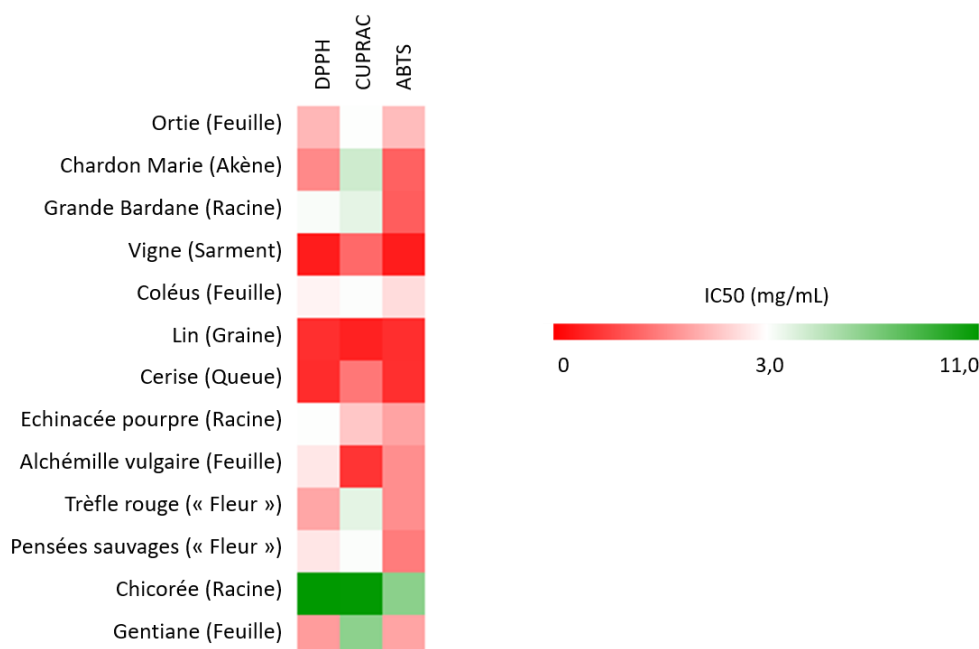
Dans un premier temps, nous avons étudié à partir d'extraits bruts issus des treize plantes citées ci-dessus des tests d'activité *in tubo* concernant l'effet antioxydant et les effets inhibiteurs sur des enzymes impliquées en cosmétique à savoir la tyrosinase, l'élastase et la collagénase. Afin de réaliser ces différents tests, les extraits bruts de chacun des organes retenus pour les treize plantes ont été dilués avec un facteur de dilution de ½ dans un mélange éthanol/eau 70:30, composition identique au solvant d'extraction. Ces tests chimiques et enzymatiques ont été effectués suivant les protocoles décrits au **Chapitre II**.

### 2.1.1 Évaluation de l'activité antioxydante par des tests chimiques

La plupart des tests antioxydants consistent à étudier la disparition ou la formation d'un produit spécifique dans un milieu soumis à un stress oxydant. Cependant, chaque test permet d'étudier l'inhibition d'une seule espèce oxydante ou bien la protection d'une seule cible à la fois. Ainsi l'évaluation de l'activité antioxydante par une technique donnée ne fournit que des informations partielles sur l'activité des composés. Il est donc nécessaire de réaliser différents tests antioxydants afin de percevoir la capacité réelle de protection d'un composé dans un milieu biologique complexe.

Aussi, l'efficacité antioxydante des treize extraits de plantes est évaluée à l'aide de tests d'activité chimique DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), ABTS (acide 2,2'-azinobis-(3(éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) et CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) décrits dans le **Chapitre II**.

La **Figure III-1** représente la capacité antioxydante des treize extraits éthanoliques d'organes spécifiques aux treize plantes exprimée en  $IC_{50}$ , concentration en antioxydant requise pour bloquer 50% de la réaction d'oxydation du composé. Ces valeurs d' $IC_{50}$ , en mg/mL, ont pu être calculées grâce aux calculs du rendement d'extraction pour chacune des extractions effectuées et en utilisant différentes concentrations d'extraits pour les tests. Dans cette étude, les résultats sont présentés sous forme Heatmap grâce au logiciel MeV (Multiple Experiment Viewer) avec en rouge les valeurs d' $IC_{50}$  les plus faibles et donc celles représentant les capacités antioxydantes les plus importantes et en vert les valeurs d' $IC_{50}$  les plus élevées correspondant à une capacité antioxydante faible de l'extrait étudié.



**Figure III-1** : Représentation sous forme Heatmap à l'aide du logiciel MeV (Multiple Experiment Viewer) des mesures de l'activité antioxydante des extraits des organes retenus pour les treize plantes sur trois tests chimiques exprimées en valeurs d' $IC_{50}$

Parmi les plantes étudiées, il apparaît que l'activité antioxydante ne se retrouve pas de la même façon dans toutes les plantes. L'extrait de racines de chicorée possède, pour les trois tests réalisés, la capacité antioxydante la plus faible avec les  $IC_{50}$  les plus élevées : 11,42 mg/mL pour le DPPH, 10,96 mg/mL pour le CUPRAC et 6,66 mg/mL pour l'ABTS. Quant aux extraits de sarments de vigne, de graines de lin ou de queues de cerise, ils possèdent les capacités antioxydantes les plus élevées déterminées par les tests DPPH et ABTS avec les  $IC_{50}$  les plus faibles : 0,34 mg/mL pour la vigne et environ 0,55 mg/mL pour le lin et la cerise dans les deux tests. Les extraits des organes des autres plantes possèdent quant à eux une activité intermédiaire avec des valeurs d' $IC_{50}$  comprises entre 1,1 et 3,2 mg/mL sortant des tests DPPH et ABTS. On peut noter que bien que l'extrait provienne d'un même organe, l'activité

antioxydante diffère d'une plante à une autre : c'est le cas des extraits de racines de chicorée pour lesquels l'activité antioxydante est faible alors que les extraits de racines de grande bardane et d'échinacée pourpre indiquent une activité antioxydante plus prononcée. On montre bien ici l'intérêt de se focaliser sur tel ou tel organe de la plante afin d'avoir l'effet recherché. Nous pouvons également constater que pour l'extrait de feuilles d'alchémille vulgaire, les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont dépendantes du test réalisé : 0,62 mg/mL avec le test CUPRAC, 1,68 mg/mL avec le test ABTS et 2,72 mg/mL avec le test DPPH. Nous ne pouvons pas conclure sur l'activité antioxydante de cet extrait mais simplement donner une tendance à savoir que l'extrait montre une activité antioxydante mais sans pouvoir donner une indication sur l'importance de cet effet. Il en est de même par exemple pour l'extrait d'akènes de chardon Marie. Aussi, l'on voit toute l'utilité d'avoir recours non pas à un seul test mais bien à trois tests afin de pouvoir lever des indéterminations quant à l'importance plus ou moins prononcée de l'effet antioxydant.

Dans la suite de ce manuscrit, les prochains résultats des tests chimiques d'activité antioxydante seront exprimés en équivalent Trolox. Le Trolox ou acide (+)-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxilique est un analogue structural hydrosoluble de la vitamine E et est utilisé comme molécule de référence dans le but de comparer les échantillons entre eux. La capacité antioxydante des extraits exprimés en équivalent Trolox (TEAC en anglais pour Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) correspond à la concentration de Trolox en  $\mu\text{mol/L}$  ou en  $\mu\text{g/mL}$  ayant la même activité qu'une même concentration unitaire d'extrait à tester.

Suite à l'étude de l'activité antioxydante des différents organes des treize plantes sélectionnées, nous avons procédé à la détermination de l'efficacité de ces mêmes treize extraits à l'aide de tests d'activité enzymatique décrits dans le **Chapitre II** ciblant les enzymes tyrosinase, élastase et collagénase.

#### **2.1.2 Évaluation de l'activité d'inhibition des enzymes tyrosinase, élastase et collagénase impliquées dans les processus de vieillissement cellulaire**

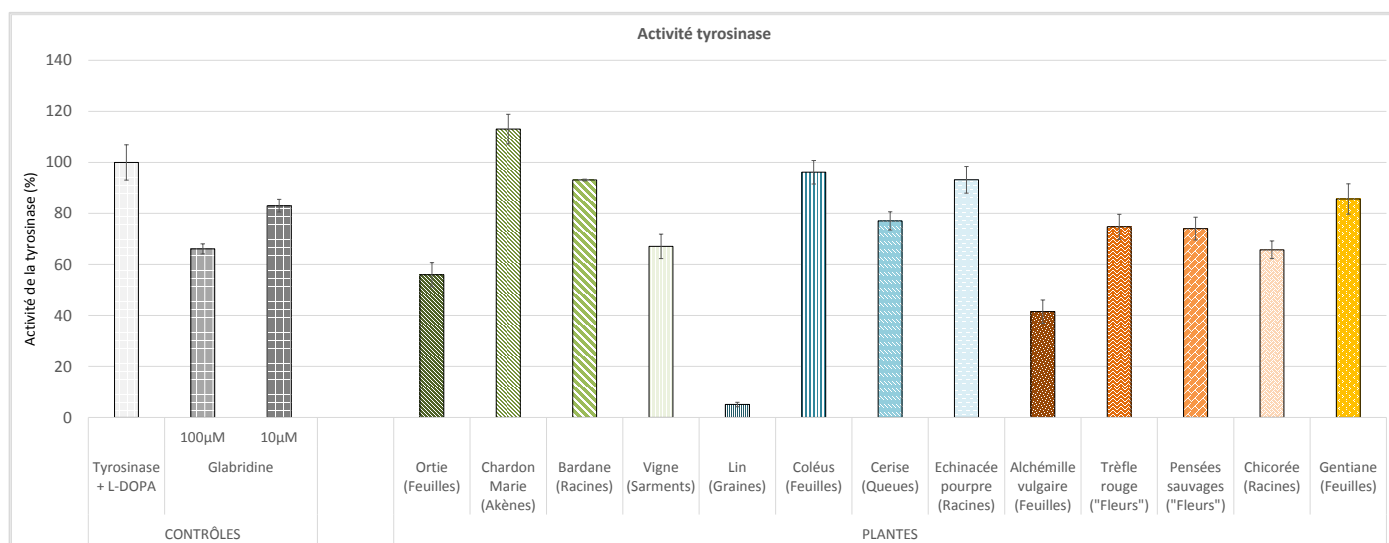
L'activité inhibitrice enzymatique de nos treize extraits d'organes de plantes est évaluée sur trois enzymes qui sont impliquées dans les processus de vieillissement cellulaire à savoir : la tyrosinase, l'élastase et la collagénase.

##### **2.1.2.1 Évaluation de l'activité inhibitrice sur la tyrosinase extraite de champignon**

Ce test d'inhibition de la tyrosinase a été réalisé en appliquant le protocole comme décrit dans le **Chapitre II**. La **Figure III-2** ci-dessous représente l'activité de l'enzyme tyrosinase exprimée en pourcentage par rapport à une activité contrôle « tyrosinase + L-DOPA ». Ce test repose sur le suivi de la réaction d'oxydation du substrat de la tyrosinase, la L-DOPA qui est transformée en dopachrome, un pigment rouge. Cette transformation est suivie par spectrophotométrie UV-visible grâce à une mesure



d'absorbance à une longueur d'onde de 490 nm. La glabridine, utilisée comme inhibiteur de la tyrosinase, est un ingrédient déjà utilisé en cosmétique pour ses propriétés éclaircissantes (Yokota et al. 1998).



**Figure III-2 :** Activités de l'enzyme tyrosinase exprimées en pourcentage pour les treize extraits d'organes de plantes dilués au 1/2 dans le solvant d'extraction. Substrat : L-DOPA, Inhibiteur : Glabridine, n=3

D'après les résultats contrôles présentés dans la **Figure III-2**, nous pouvons s'assurer d'une fonction catalytique optimale de l'enzyme tyrosinase avec un signal égal à 100% lorsque l'enzyme est en présence du substrat L-DOPA. De plus, notre test permet de mettre en évidence le caractère inhibiteur d'une molécule ou cocktail de molécules au regard des valeurs tests de 60 % et 90 % obtenues des concentrations respectives de 100 et 10 µM de l'inhibiteur glabridine.

La majorité des extraits, soit 9 extraits sur 13, des organes retenus de chacune des plantes testées présente un effet inhibiteur sur l'activité de la tyrosinase : ainsi, nous pouvons constater une activité de la tyrosinase de 5,08 % pour l'extrait de graines de lin correspondant à une diminution de l'activité d'inhibition de 94,92 %. Les extraits de feuilles d'ortie et d'alchémille vulgaire, de sarments de vigne, de graines de lin, de parties aériennes fleuries de pensées sauvages et de racines de chicorée présentent de façon significative une diminution de plus de 20 % de l'activité de la tyrosinase. À noter que les extraits d'akènes de chardon Marie, de feuilles de coléus et de gentiane et de racines de grande bardane et d'échinacée pourpre ne présentent pas d'activité inhibitrice envers la tyrosinase à la vue d'une différence non significative en comparaison au contrôle « tyrosinase + L-DOPA ».

Ces résultats indiquent qu'un extrait d'un même organe, par exemple les racines, et ce pour des plantes différentes, comme la grande bardane ou l'échinacée pourpre, ne présente pas du tout la même activité inhibitrice vis-à-vis de la tyrosinase, l'extrait de graines de lin étant celui dont l'activité inhibitrice est la plus forte. Aussi, si l'on se réfère à ce critère d'inhibition de la tyrosinase, un

classement de l'effet le plus inhibiteur au moins inhibiteur sur la tyrosinase des différents extraits d'organes des treize plantes sélectionnées peut être alors proposé (Figure III-3).



Figure III-3 : Classification des treize extraits d'organes de plantes du plus inhibiteur (à gauche) au moins inhibiteur (à droite) vis-à-vis de la tyrosinase

Il semble alors intéressant de voir si cette classification est identique ou non vis-à-vis de l'inhibition d'autres enzymes telles que l'élastase et la collagénase.

## 2.1.2.2 Évaluation de l'activité inhibitrice sur l'élastase extraite de pancréas porcin

La Figure III-4 représente l'activité de l'enzyme élastase exprimée en pourcentage par rapport à l'activité du contrôle « élastase + élastine ». L'inhibiteur utilisé comme témoin positif de l'activité inhibitrice de l'élastase est la N-méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chlorométhylketone. Ce test, sous forme de kit, repose sur le suivi de l'action de l'élastase sur le substrat élastine marqué par un chromophore fluorescent. Lors de la dégradation catalytique de l'élastine par l'enzyme élastase, l'intensité de la fluorescence augmente ( $\lambda_{\text{ex}} = 505 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ ).

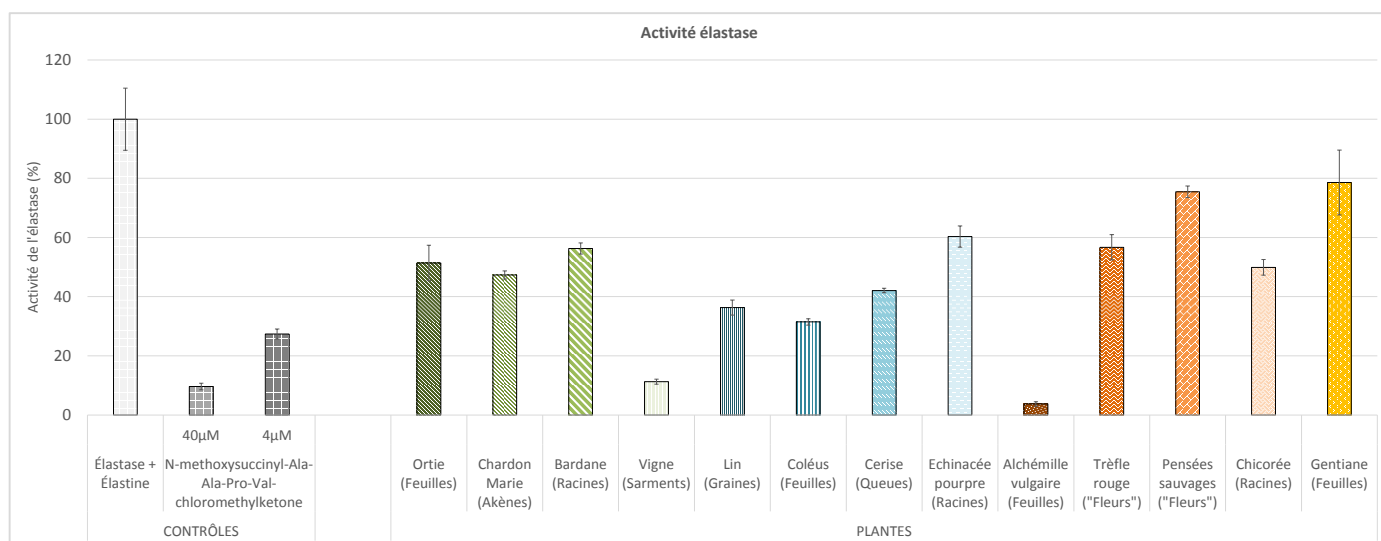


Figure III-4 : Activités de l'enzyme élastase exprimées en pourcentage pour les treize extraits d'organes de plantes dilués au 1/2 dans le solvant d'extraction. Substrat : Élastine, Inhibiteur : N-méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chlorométhylketone, n=3

Les résultats présentés dans la Figure III-4 de l'échantillon contrôle « élastase + élastine » et des deux échantillons à 40 µM et 4 µM de l'inhibiteur N-méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chlorométhylketone indiquent que les propriétés catalytiques de l'enzyme élastase sont préservées et effectives et que le test d'inhibition est dose dépendant.

Tous les extraits de plantes testés, excepté l'extrait de feuilles de gentiane présentent une diminution significative de plus de 20% de l'activité de l'enzyme élastase. De plus, six des extraits testés

présentent de façon significative une diminution de plus de 50% de l'activité de l'élastase : les extraits d'akènes de chardon Marie, de graines de lin, de sarments de vigne, de feuilles de coléus et d'alchémille vulgaire ainsi que de queues de cerise. L'extrait de feuilles d'alchémille semble être l'extrait le plus actif avec une activité de l'élastase de 3,73% soit une diminution d'activité de 96,3%.

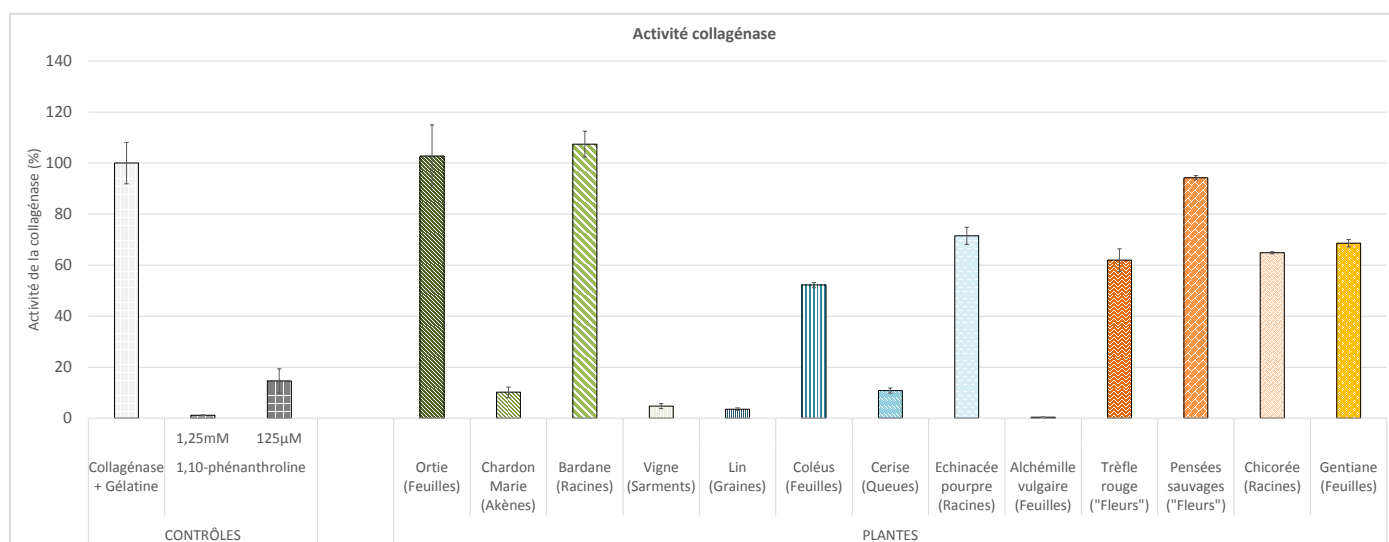
Nous pouvons alors ici, tout comme nous l'avons proposé pour l'activité de la tyrosinase, faire une échelle d'inhibition de nos différents extraits vis-à-vis de l'élastase (**Figure III-5**).



**Figure III-5** : Classification des treize extraits d'organes de plantes du plus inhibiteur (à gauche) au moins inhibiteur (à droite) vis-à-vis de l'élastase

## 2.1.2.3 Évaluation de l'activité inhibitrice sur la collagénase extraite de la bactérie *Clostridium histolyticum*

La **Figure III-6** représente l'activité de l'enzyme collagénase exprimée en pourcentage par rapport à l'activité du contrôle « collagénase + gélatine ». L'inhibiteur utilisé comme témoin positif de l'activité inhibitrice de la collagénase est la 1,10-phénanthroline, un inhibiteur de métalloprotéinase. Ce test, également fourni sous forme de kit, est similaire à celui utilisé pour le test de l'élastase : lors du clivage du substrat, une fluorescence est émise et est suivie grâce à une absorbance à la longueur d'onde de 505 nm et une émission de fluorescence à 515 nm.



**Figure III-6** : Mesures de l'activité de l'enzyme collagénase exprimées en pourcentage pour les treize extraits d'organes de plantes dilués au 1/2 dans le solvant d'extraction. Substrat : Gélatine, Inhibiteur : 1,10-phénanthroline, n=3

De même que dans les deux précédentes figures, les résultats contrôles présentés dans la **Figure III-6** permettent de s'assurer de l'intégrité catalytique de l'enzyme collagénase et de son inhibition de manière dose-dépendante en présence de l'inhibiteur, la 1,10-phénanthroline. Tous les extraits des

différents organes des plantes testés, exceptés les extraits de feuilles d'ortie, de racines de bardane et des parties aériennes fleuries de pensées sauvages présentent une diminution significative de plus de 20% de l'activité de la collagénase par rapport au contrôle « collagénase + gélatine ». De plus, les extraits d'akènes de chardon Marie, de graines de lin, de sarments de vigne, de queues de cerise et de feuilles d'alchémille vulgaire présentent de façon significative une diminution de plus de 50% de l'activité de l'enzyme. Parmi eux, les extraits de sarments de vigne, de graines de lin et de feuilles d'alchémille vulgaire semblent les plus actifs en termes d'inhibition avec des activités de la collagénase inférieures à 5% soit une diminution d'activité de plus de 95%. À noter que les extraits de feuilles d'ortie et de racines de grande bardane n'ont aucune activité inhibitrice vis-à-vis de la collagénase.

Une échelle représentative de l'activité inhibitrice des différents extraits étudiés peut alors être proposée (Figure III-7).



Figure III-7 : Classification des treize extraits d'organes de plantes du plus inhibiteur (à gauche) au moins inhibiteur (à droite) vis-à-vis de la collagénase

Sur la base des résultats précédents, nous pouvons alors superposer chacune des échelles concernant respectivement l'activité inhibitrice de la tyrosinase, de l'élastase et de la collagénase avec à gauche les extraits les plus actifs et à droite les extraits les moins actifs.

#### Activité inhibitrice de la tyrosinase



#### Activité inhibitrice de l'élastase



#### Activité inhibitrice de la collagénase



Nous pouvons alors ici donner un premier panel d'organes de différentes plantes qui présentent une activité d'inhibition vis-à-vis des trois enzymes tyrosinase, élastase et collagénase : il s'agit des graines de lin, des sarments de vigne et surtout les feuilles d'alchémille vulgaire qui présente la meilleure activité inhibitrice vis-à-vis de l'élastase et de la collagénase ainsi que la deuxième meilleure activité inhibitrice de la tyrosinase derrière l'extrait de graines de lin. Cependant nous constatons que sur les treize plantes sélectionnées, il en existe un bon nombre qui n'ont que peu ou pas d'effet

inhibiteur sur les trois enzymes étudiées. Aussi, dans le cadre de ces travaux de thèse, nous nous sommes penchés sur la question suivante :

Est-il possible d'améliorer le caractère antioxydant et inhibiteur d'extraits d'organes de plantes qui au départ n'avaient qu'une faible voire aucune activité inhibitrice envers ces enzymes en mettant en place des modes de cultures tels que l'hydroponie passive ou l'hydroponie active ou bien encore la culture de cals avec en supplément à chacun de ces modes de cultures la mise en place d'une élicitation lumineuse à l'aide de LED émettant soit dans le bleu, dans le rouge ou en lumière blanche ?

## 2.2 Choix de la plante modèle pour les études d'optimisation des extraits

Pour répondre à cette question, il était nécessaire de choisir des plantes pour lesquelles les activités à la fois antioxydante et inhibitrice sur les enzymes étudiées ne font pas parties ni des plus élevées, ni des plus faibles afin d'évaluer l'apport de ces nouvelles méthodes de culture en termes d'amélioration de l'activité antioxydante et inhibitrice des extraits alors produits. Notre choix s'est ainsi porté sur la grande bardane. En effet l'extrait de racines de grande bardane présente une activité antioxydante moyenne avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> allant de 1 mg/mL à 3,8 mg/mL au regard des trois tests chimiques ABTS, CUPRAC et DPPH. Concernant les tests enzymatiques, l'activité inhibitrice de la tyrosinase de l'extrait de racines de grande bardane est de l'ordre de 10 %. Pour ce qui est de l'activité inhibitrice de l'élastase, cet extrait présente une activité d'inhibition de l'ordre de 40 %. Enfin, on peut noter que l'extrait de racines de grande bardane ne montre aucune activité inhibitrice envers la collagénase.

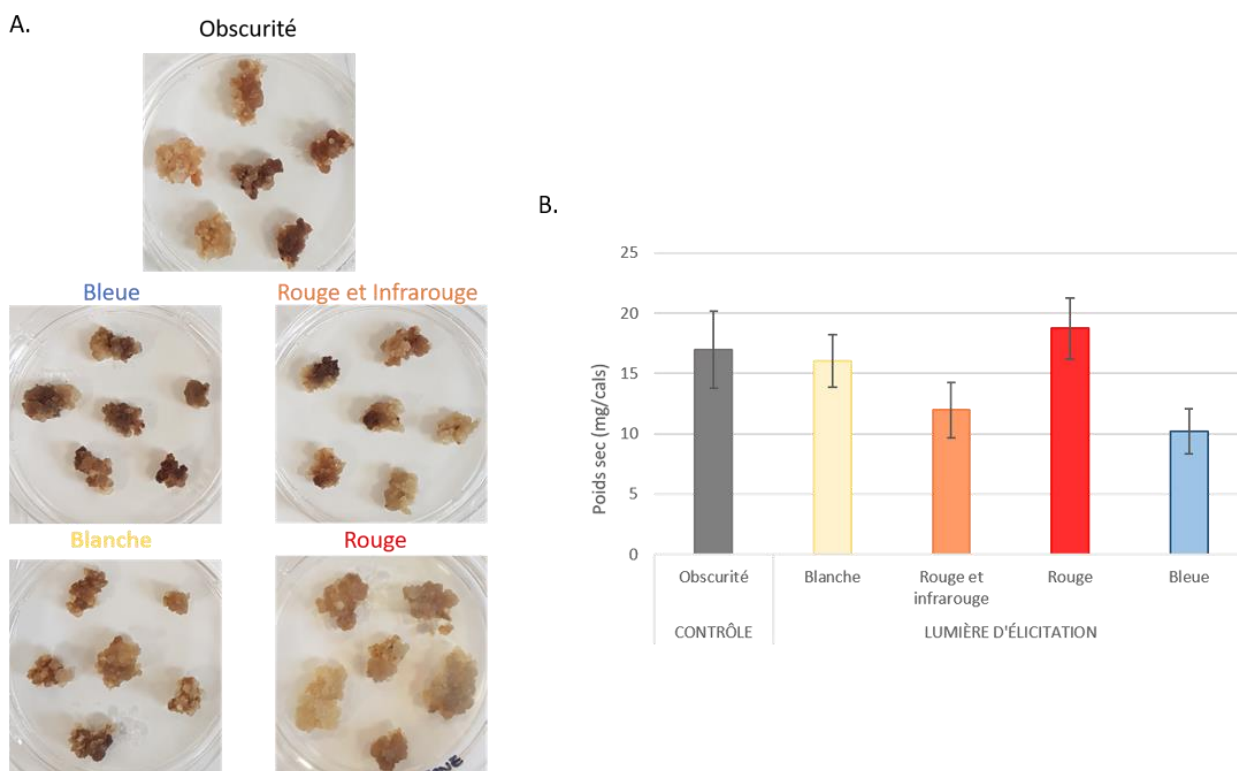
## 3 Mise en place d'une culture de cals de la grande bardane et évaluation de l'influence de l'élicitation

Cette étude a été réalisée sur une méthode de culture innovante et biotechnologique : les cals. Les cals sont décrits comme des amas de cellules végétales indifférenciées et totipotentes obtenus par culture *in vitro* ou par réaction naturelle de la plante après une blessure ou une infection. La culture de cals est un modèle de culture *in vitro* simple à mettre en œuvre et apparaît comme tout à fait adéquat pour l'étude de l'influence de l'élicitation lumineuse sur la production de métabolites d'intérêt.

Dans notre cas, la culture de cals a été réalisée à partir de feuilles de grande bardane et les différentes élicitations lumineuses ont été menées grâce à des systèmes de lampes à LED placés au-dessus des boîtes de Pétri contenant les cals de grande bardane comme décrit au [Chapitre II](#). Les élicitations lumineuses ont été réalisées en continu pendant 48 et 96 heures pour toutes les lumières

d'éllicitation utilisées. Ici, seuls les résultats obtenus après 96 heures d'éllicitation lumineuse seront présentés.

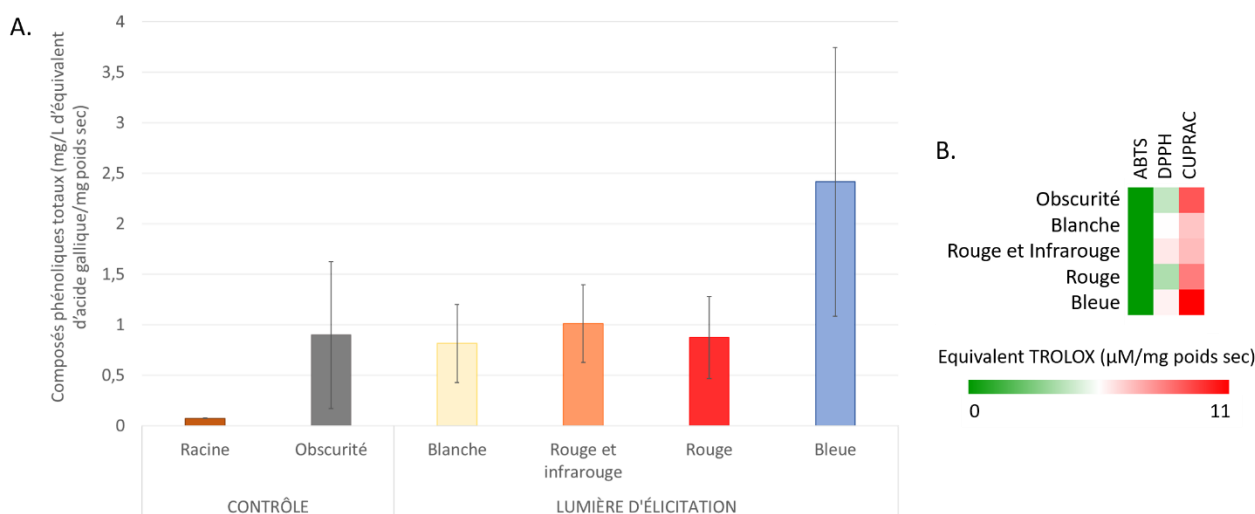
Les photographies des cals prises après 96 heures d'éllicitation (**Figure III-8.A**) ne montre pas d'importantes différences du point de vue phénotypiques entre les différentes éllicitations. En revanche, l'éllicitation sous lumière bleue laisse apparaître la totalité des cals plus foncés par rapport aux quatre autres conditions pour lesquelles certains cals sont bien plus clairs. Suite aux différentes éllicitations, les cals sont congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  puis lyophilisés. Leur poids sec en milligramme par cal est alors évalué pour chacune des quatre conditions d'éllicitation lumineuse (lumière blanche, rouge, bleue et rouge-infrarouge) et pour la condition à l'obscurité dans le but de déterminer si l'une ou plusieurs des lumières d'éllicitation permet de favoriser la croissance des cals (**Figure III-8.B**).



**Figure III-8 :** (A) Photographies des cals et (B) Pesées des cals après 96 heures d'éllicitation lumineuse,  $n=3$

Les cals obtenus sous obscurité, qui est la condition contrôle, ont en moyenne un poids sec de 17 mg. Pour les cals des différentes lumières d'éllicitation, leur poids sec est en moyenne compris entre 10 et 19 mg. Néanmoins, cette expérience semble mettre en avant deux effets en lien avec la source de lumière sur la production de masse des cals soit aucun effet, c'est le cas des éllicitations à la lumière blanche et à la lumière rouge avec une masse comparable à celle du contrôle à l'obscurité, soit une diminution de la masse des cals pour les éllicitations à la lumière rouge et infrarouge et à la lumière bleue avec une masse plus faible de 5 mg.

Afin d'évaluer le potentiel de l'élicitation lumineuse sur la capacité des extraits des cals de grande bardane à produire une action antioxydante, nous avons décidé, en parallèle des tests chimiques ABTS, CUPRAC et DPPH, d'apporter une information sur la concentration de nos extraits de cals en composés phénoliques totaux grâce au réactif de Folin-Ciocalteu en utilisant comme molécule de référence l'acide gallique. L'ensemble des résultats est présenté à la **Figure III-9** sous forme d'histogramme pour la concentration en composés phénoliques totaux et sous forme Heatmap pour les capacités antioxydantes avec en rouge les équivalents Trolox les plus élevés et en vert les équivalents Trolox les plus faibles.



**Figure III-9 : Évaluation du potentiel de l'élicitation lumineuse sur une culture in vitro de cals de bardane** (A) Teneur en composés phénoliques totaux exprimée en mg/L d'équivalent d'acide gallique par mg de poids sec et mesurée à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu pour les cals élicités avec différentes lumières en comparaison des deux contrôles, les cals à l'obscurité et les racines de bardane et (B) Mesures de l'activité antioxydante des extraits de cals élicités sur trois tests chimiques exprimées en équivalent Trolox et représentées sous forme Heatmap à l'aide du logiciel MeV (Multiple Experiment Viewer),  $n=3$

La **Figure III-9.A** indique la concentration en composés phénoliques, en mg/L d'équivalent d'acide gallique par mg de poids sec, évaluée grâce au réactif de Folin-Ciocalteu comme décrit dans le **Chapitre II**, de cals de bardane élicités mais aussi d'un extrait de racines de bardane, le même extrait que celui utilisé précédemment lors du criblage des treize plantes.

En premier lieu, on peut remarquer que l'extrait de racines de bardane est celui possédant la plus faible concentration en composés phénoliques de l'ordre de 0,07 mg/L d'eq. d'acide gallique/mg de poids sec. Ce résultat permet de mettre en évidence l'apport du point de vue de la richesse en composés phénoliques de la culture *in vitro* de cals par rapport aux racines pour la grande bardane. Concernant la concentration en composés phénoliques des extraits de cals élicités, celle-ci se situe entre 0,8 et 1 mg/L ( $\pm 0,4$  mg/L) d'eq. d'acide gallique par mg de poids sec en moyenne, exception faite de la concentration correspondant à l'élicitation à la lumière bleue pour laquelle la concentration en composés phénoliques est de 2,4 mg/L ( $\pm 1,3$  mg/L) d'eq. d'acide gallique par mg de poids sec.

Cependant pour l'ensemble des cals élicités, il est difficile de conclure de manière univoque sur des différences significatives sur l'effet des différentes élicitations en termes de concentration en composés phénoliques, compte-tenu des barres d'erreur obtenues sur les mesures dues probablement à l'hétérogénéité du matériel végétal obtenu avec cette culture de cals. En effet, les cals utilisés pour cette étude proviennent de feuilles de bardane qui ont été lésées dans le but de produire ces amas de cellules végétales indifférenciées or ces cals ne proviennent pas tous de la même feuille lésée, ni du même amas cellulaire au départ. Ces différences d'origine peuvent être la cause de ces grandes hétérogénéités de réponse des extraits aux différents tests réalisés.

La capacité antioxydante de ces mêmes extraits a ensuite été évaluée grâce aux tests chimiques ABTS, CUPRAC et DPPH (**Figure III-9.B**). Au premier regard, on peut remarquer que les trois tests chimiques utilisés présentent des résultats différents les uns des autres.

En effet, les valeurs des activités des différentes lumières d'élicitation pour le test ABTS varient entre 0,2 nM d'équivalent Trolox par mg de poids sec, pour la condition à l'obscurité et la lumière rouge, et 1 nM d'équivalent Trolox par mg de poids sec de cals pour la lumière rouge et infrarouge. Ainsi, le test ABTS indique des valeurs exprimées en  $\mu\text{M}$  d'équivalent Trolox par mg de poids sec les plus faibles correspondant à des activités antioxydantes les plus petites. Quant au test DPPH, les valeurs se situent entre 1  $\mu\text{M}$  d'équivalent Trolox par mg de poids sec de cals pour la lumière rouge et 2,4  $\mu\text{M}$  d'équivalent Trolox par mg de poids sec pour la lumière rouge et infrarouge ce qui indique une activité antioxydante plutôt moyenne. Pour ces deux tests ABTS et DPPH, basés sur la capacité de certaines molécules constitutives des extraits à réduire des radicaux, on peut noter que les extraits ayant l'activité la plus et la moins importante sont identiques. En effet, l'extrait de cals issus de l'élicitation à la lumière rouge et infrarouge est celui présentant l'équivalent Trolox le plus élevé à la fois dans le test DPPH et dans le test ABTS. À l'inverse, l'extrait des cals élicités par la lumière rouge est celui montrant l'équivalent Trolox le plus faible, et donc une activité antioxydante faible, pour ces deux tests.

En ce qui concerne les résultats obtenus par le test CUPRAC, basé sur la capacité de certaines molécules constitutives de l'extrait à réduire les ions cuivriques, les valeurs varient de 3,7  $\mu\text{M}$  d'équivalent Trolox par mg de cals pour la lumière blanche à 11,8  $\mu\text{M}$  d'équivalent Trolox par mg pour la lumière bleue. Ainsi, l'ensemble des extraits et donc l'ensemble des élicitations lumineuses montrent une activité antioxydante supérieure à celles qui ont pu être observées avec les deux précédents tests ABTS et DPPH.

Notre investigation est portée sur l'évaluation des activités antioxydantes des différents extraits de cals suite à une élicitation lumineuse par le biais de trois méthodes ABTS, CUPRAC et DPPH. Les



teneurs en composés phénoliques totaux révèlent que la teneur la plus élevée en polyphénols est constatée dans les extraits de cals élicités à la lumière bleue avec 2,4 mg/L ( $\pm 1,3$  mg/L) d'eq. d'acide gallique par mg de poids sec. Ces mêmes extraits révèlent une faible activité antioxydante dans la capacité de piégeage de radicaux libres avec le test DPPH et dans l'effet « scavenger » de l'ABTS ce qui apparaît contradictoire aux vues de la concentration des extraits en composés phénoliques, connus pour leur effet antioxydant en neutralisant les radicaux libres. Il est à rappeler ici que le test DPPH n'est pas quantitatif, il permet de comparer différents extraits entre eux selon leur capacité à piéger le DPPH<sup>\*</sup> et ainsi, d'apprécier les variations qualitatives des composés phénoliques. L'évaluation de l'activité anti-radicalaire doit être interprétée avec précaution du fait que l'absorbance du DPPH<sup>\*</sup> à 515-520 nm diminue sous l'action de la lumière, de l'oxygène, en fonction du pH et du type de solvant additionnée à l'antioxydant. De plus, la structure chimique et la polarité de l'espèce antioxydante sont déterminantes pour sa capacité à piéger les radicaux libres. Des effets antagonistes peuvent être la cause d'une faible activité antioxydante bien que l'extrait soit riche en composés phénoliques. Le test CUPRAC est capable de doser les antioxydants qu'ils soient hydrophiles ou lipophiles. De plus, comme le pH optimal de la méthode est proche du pH physiologique le risque de sous-estimation, lié à la protonation des antioxydants en conditions acides, ou de surestimation, due à leur dissociation en conditions basiques, de la capacité antioxydante est limité. Ainsi, le test CUPRAC montre la meilleure corrélation entre la teneur en composés phénoliques des extraits de cals élicités dans le bleu et leur effet antioxydant.

Aussi, l'élicitation par la lumière bleue semble favoriser la teneur en composés phénoliques des cals et par la même occasion donne une activité antioxydante marquée à ces extraits.

Après cette première étude sur une culture *in vitro* de cals, nous allons maintenant présenter des études sur l'évaluation de l'activité anti-tyrosinase et de l'activité de protection contre les ROS des extraits de grande bardane cultivée selon différents modes de cultures à savoir sur cals, en hydroponie « passive » et en hydroponie « active ».

## 4 Apport du mode de culture de la grande bardane et de l'élicitation lumineuse sur le profil phytochimique de ses extraits et de leurs activités biologiques

Suite aux premières études menées sur des cals de grande bardane, nous allons développer ci-après une nouvelle étude menée afin d'étudier les impacts de différents modes de cultures soumis à différents modes d'élicitations lumineuses sur des extraits de bardane, tant sur leur profil phytochimique que sur leur activité anti-tyrosinase et de protection contre les ROS.

Afin d'apporter des facteurs de comparaisons et répondre également à des méthodes de cultures innovantes, trois méthodes de culture ont été utilisées :

- La culture *in vitro* de cals telle que présentée précédemment.
- Une culture en hydroponie passive qui consiste à cultiver les plantes dans des pots, contenant du terreau, placés directement dans un bac contenant de l'eau. L'eau remonte ainsi par capillarité ce qui vient automatiquement arroser le terreau.
- Une culture en aéroponie, ou hydroponie active, qui est une méthode hors-sol qui se distingue ainsi de la culture hydroponique passive. Les racines sont maintenues en suspension dans l'air, à l'intérieur d'une chambre d'aspersion obscure pour empêcher le développement d'algues. La solution nutritive est pulvérisée sur les racines à intervalles réguliers. Constamment exposées à l'oxygène et à l'humidité, ces dernières atteignent leur potentiel d'absorption maximal. Par conséquent, les racines de plantes cultivées à partir de l'aéroponie présentent des racines particulièrement développées, et cela permet d'ailleurs d'obtenir une croissance accélérée, sans toutefois altérer le développement des feuilles, des fleurs ou des fruits des plantes. Les plantes sont cultivées dans des pots contenant un substrat inerte, de la laine de roche.

Pour chacune de ces cultures des modalités différentes pour l'élicitation lumineuse ont été appliquées, à savoir :

- Pour la culture de cals de grande bardane, deux modalités ont été appliquées : une modalité à la lumière et une à l'obscurité.
- Concernant la culture de grande bardane en hydroponie passive, trois modalités ont été réalisées : une première modalité à la lumière blanche, une deuxième à la lumière rouge et une troisième à la lumière bleue.
- Enfin pour ce qui concerne la culture en hydroponie active, deux modalités d'éclairage ont été utilisées : une première avec de la lumière naturelle et une seconde avec de la lumière bleue en complément à la lumière naturelle.

Pour l'ensemble des extraits de grande bardane obtenus à partir de ces différentes cultures et modalités, des tests d'activités enzymatiques anti-tyrosinase et des tests cellulaires et chimiques pour évaluer la capacité de protection contre les ROS ont été effectués. Les études phytochimiques des différents extraits ont été réalisées par chromatographie de partage, en phase inverse, en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS). L'objectif étant de pouvoir

obtenir un profil phytochimique pour chaque extrait en fonction de l'organe, du mode de culture et de l'élicitation appliquée et de comparer ces empreintes afin de révéler lors d'une approche différentielle les molécules communes ou spécifiques de ces modalités. De plus, cette analyse en mode MS simple avec une ionisation positive, offre la possibilité d'appliquer des approches qualitatives, quantitatives ciblées ou non ciblées par extraction des informations massiques des données brutes. C'est dans ce contexte, que nous avons étudié l'influence de nos différents modes de culture et élicitations sur l'activité biologique et la corrélation avec le patrimoine moléculaire. Dans le cadre des analyses de cals et d'hydroponie passive, le nombre de reliquat de plante  $n=3$  ne permet pas d'appliquer une approche métabolomique contrairement à l'étude sur le mode de culture en hydroponie active. Bien qu'une approche métabolomique ciblée ou non aurait pu être envisagée pour la modalité de culture en hydroponie active, nous avons choisi de comparer les résultats entre eux selon une approche différentielle principalement. Les propositions de structure des molécules actives ont quant à elles été obtenues par convolution des résultats MS simple et MS/MS en ionisation positive et par corrélation avec des banques de données.

Cette partie de chapitre sera divisée en deux sous-parties :

- Une étude ciblée avec le suivi de l'arctiine et de l'arctigénine au [4.1 Partie 1](#) : Évaluation de l'impact du mode de culture et de l'élicitation sur l'activité anti-tyrosinase et identification des molécules responsables de cette activité.
- Une étude non ciblée au [4.2 Partie 2](#) : Impact de l'élicitation sur l'activité antioxydante et identification de molécules responsables de cette activité.

#### 4.1 Partie 1 : Évaluation de l'impact du mode de culture et de l'élicitation sur l'activité anti-tyrosinase et identification des molécules responsables de cette activité

La bardane a ainsi été choisie comme plante modèle en raison de son activité anti-tyrosinase déjà décrite dans la littérature afin d'étudier l'impact des conditions de cultures et de l'élicitation sur cette activité et sur la production en arctiine et arctigénine. Dans ce contexte, les différentes parties de la plante, les racines, les feuilles et les pétioles seront étudiées séparément et leur contenu en arctiine et arctigénine sera suivi et comparé voire quantifié.

On peut alors se demander si nos extraits possèdent plus ou moins de ces deux molécules, l'arctiine et l'arctigénine qui montrent une activité anti-tyrosinase, et si l'une des méthodes de culture ou l'une des lumières d'élicitation ou les deux permettent d'augmenter la quantité de ces molécules au sein de l'extrait.

##### 4.1.1 Suivi de la présence de l'arctiine et de l'arctigénine dans les extraits de grande bardane issus des différents modes de culture

La détection de l'arctiine et de l'arctigénine dans les différents extraits a été réalisée grâce à la spectrométrie de masse et à l'utilisation de solution de standards. Un mélange des deux molécules standards à plusieurs concentrations a été utilisé dans le but de détecter les temps de rétention afin d'avoir des temps de référence des deux molécules cibles et d'apporter une notion de teneur dans les extraits.

La **Figure III-10** regroupe les extractions d'ions (EIC pour Extracted Ion Chromatogram en anglais) des deux molécules standards. Les EIC permettent d'extraire le chromatogramme d'un ion d'une masse donnée et d'identifier les pics chromatographiques correspondant aux molécules recherchées, ici l'arctiine et l'arctigénine. Les pics numérotés 1 et 2 correspondent à nos standards. Le pic 1 est le pic chromatographique correspondant à l'arctiine tandis que le pic 2 est celui correspondant à l'arctigénine. En effet, l'arctiine est une arctigénine glycosylée et donc plus polaire c'est pourquoi elle a moins de rétention avec la phase inverse et est donc éluée en premier par rapport à la génine.

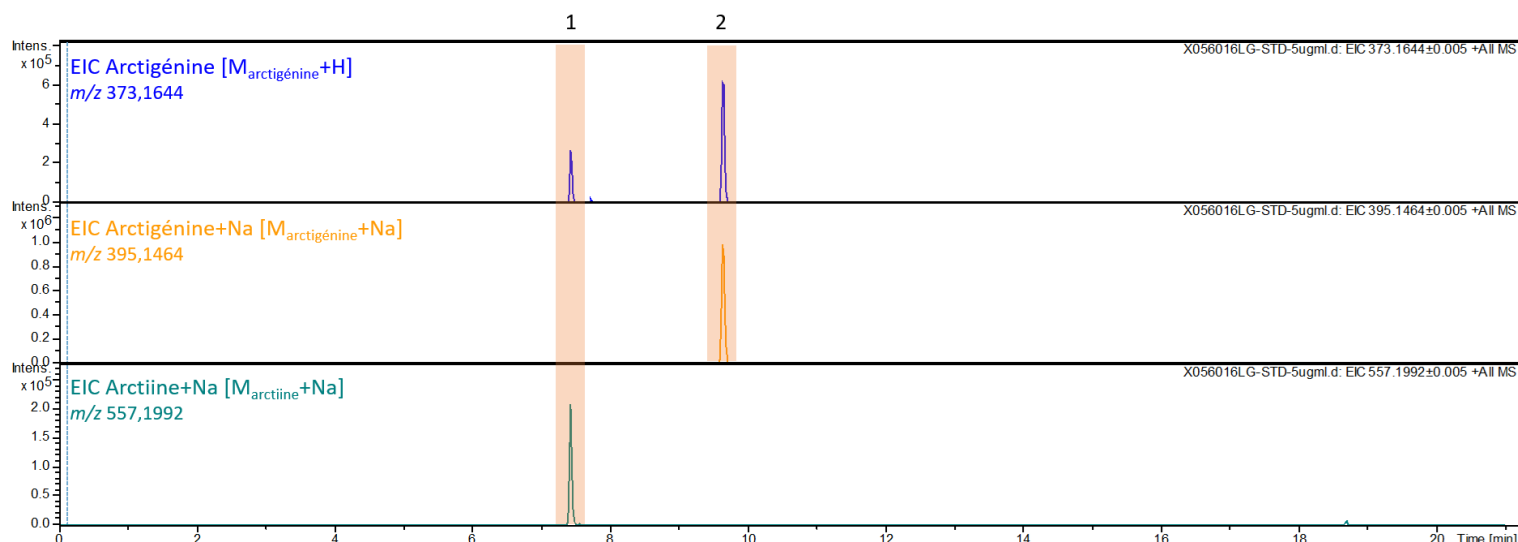
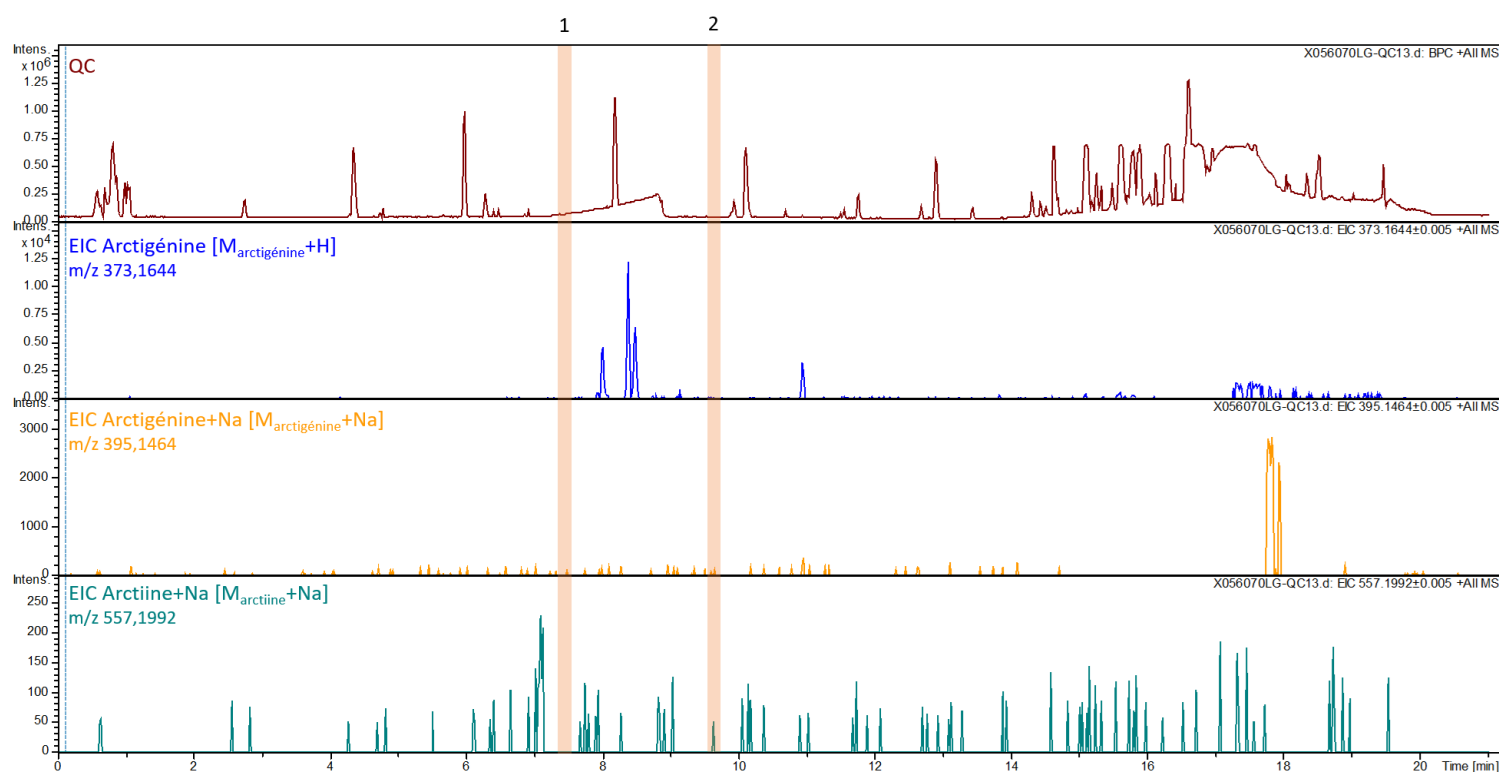


Figure III-10 : Exemple d'extractions d'ions (EIC) des standards sodés et non sodés d'un mélange des standards à 5 µg/ml. La précision pour extraire l'EIC de chaque ion est de  $\pm 0,005$  m/z

Comme nous pouvons le voir dans la Figure III-10, l'analyse du mélange d'arctiine et d'arctigénine à 5 µg/mL a permis d'identifier les temps de rétention pour ces deux molécules à savoir 7,44 min pour l'arctiine et 9,64 min pour l'arctigénine avec notre système LC-HMRS, décrit dans le Chapitre II, mais également les différents ions formés, protoné ou adduit sodium, pour ces molécules en mode d'ionisation positif. Ces profils EIC serviront de référence lors de la recherche de leur présence dans les différents modes de culture et dans les conditions d'élicitation appliquées dans ce projet de thèse. Nous pourrions ainsi évaluer l'impact de ces conditions de cultures sur la production ciblée de ces deux molécules déjà décrites et brevetées.

Concernant la culture de bardane en hydroponie active, un échantillon appelé QC pour Quality Control a été réalisé en mélangeant à volume égaux tous les extraits de bardane cultivée en hydroponie active. Ce QC permet d'homogénéiser le chromatogramme obtenu afin de pallier les hétérogénéités que peuvent présenter les échantillons et permet d'analyser l'ensemble des extraits dans leur globalité. La Figure III-11 montre un exemple de chromatogramme d'un QC et des extractions d'ions de l'arctiine et de l'arctigénine qui ont pu être réalisées. On peut voir grâce aux bandes orange mettant en avant les temps de rétention de nos molécules d'intérêt que ces molécules ne sont pas présentes dans notre QC car aucun pic, ni sur le chromatogramme, ni sur les extractions d'ions ne correspond à ces deux bandes. En revanche, nous pouvons observer un profil phytochimique avec un ion correspondant à la génine arctigénine à des temps de rétention inférieurs à celui de la référence à savoir 9,64 min. Cette molécule pourrait donc être une molécule glycosylée plus polaire avec une arctigénine qui se fragmenterait en source lors de l'ionisation en mode positif, ce qui est classique avec ce mode d'ionisation. Ce mode de culture en hydroponie active favoriserait donc peut-être des structures proches de l'arctiine mais ni d'arctiine et ni d'arctigénine recherchées de façon ciblée.

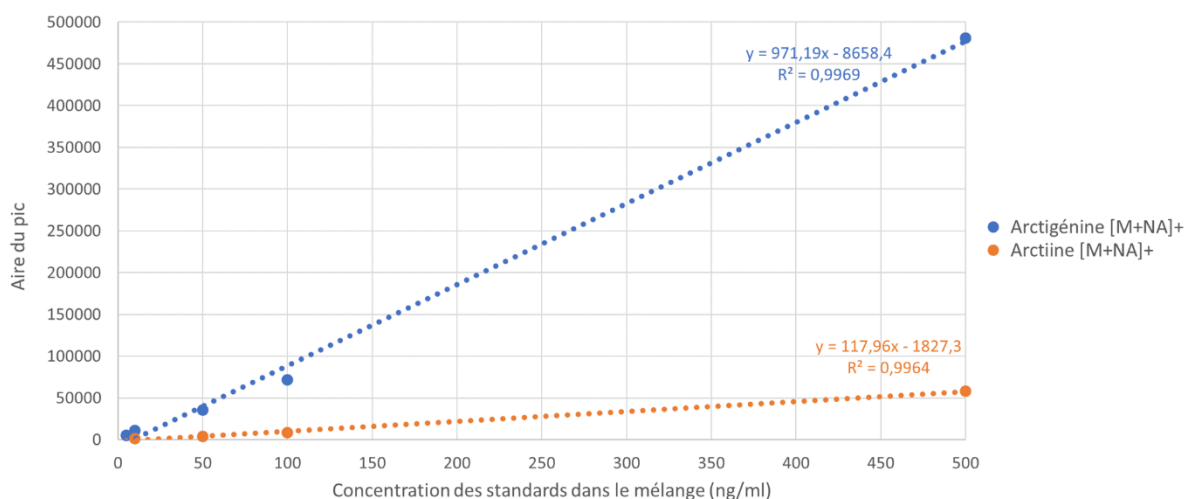


**Figure III-11** : Exemple de chromatogramme de l'échantillon QC regroupant à volume égal l'ensemble des extraits obtenus en hydroponie active et les extractions d'ions des molécules d'intérêts sodées et non sodées. La précision pour extraire l'EIC de chaque ion est de  $\pm 0,005$   $m/z$

Ici, nous représentons le QC dans le but de simplifier l'illustration mais les mêmes extractions d'ions ont été appliqués sur chaque extrait issus de la culture en hydroponie active et leur profil étaient identiques à celui du QC, c'est-à-dire qu'aucune des deux molécules d'intérêts n'a pu être observées.

Les mêmes résultats ont été observés dans les extraits issus de la culture de cals avec ou sans élicitation lumineuse. En effet, indépendamment de l'élicitation lumineuse appliquée et des organes étudiés nous avons une absence de ces deux molécules que sont l'arctiine et l'arctigénine dans à la fois les extraits de cals de grande bardane et les extraits de grande bardane cultivée en hydroponie active.

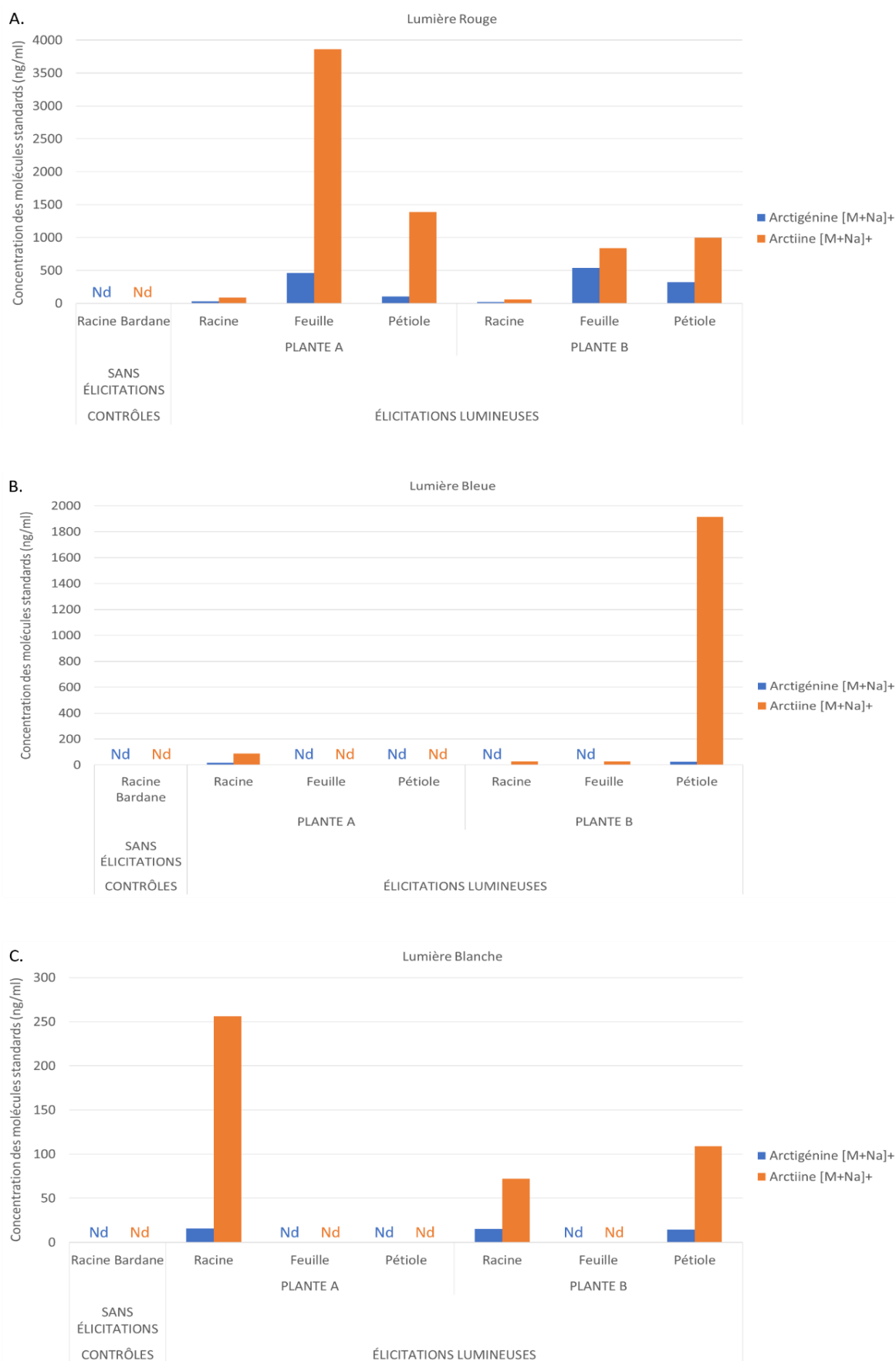
À l'inverse de ces deux méthodes de culture, cals et hydroponie active, pour la culture de la bardane en hydroponie passive nos deux molécules d'intérêt ont pu être détectées mais aussi quantifiées. La quantification de ces deux molécules a été réalisée à l'aide du logiciel Quant de Bruker. Ce logiciel permet de déterminer l'aire des pics correspondant à nos molécules d'intérêts en lui indiquant une masse avec une précision de  $\pm 0,005$   $m/z$  et un temps de rétention avec une précision de  $\pm 12$  s. Dans le cadre de notre quantification, nous avons choisi d'intégrer l'ion majoritaire pour nos deux molécules soit l'adduit sodium. Une gamme d'étalonnage externe comprise entre 0,5 ng/mL et 5  $\mu$ g/mL a été analysée dans les mêmes conditions que nos échantillons de culture. Les courbes d'étalonnage de l'arctiine en orange et de l'arctigénine en bleu sont présentées à la **Figure III-12** avec un coefficient de corrélation  $R^2 > 0,99$  pour les deux standards montrant la bonne linéarité de notre détecteur pour une quantification significative.



**Figure III-12 :** Courbes d'étalonnage pour les deux molécules d'intérêt, en **bleu** pour l'arctigénine et en **orange** pour l'arctiine permettant d'établir une corrélation entre la concentration du standard et l'aire du pic chromatographique correspondant

Après l'obtention de ces droites d'étalonnage et de leur équation correspondante, nous avons utilisé le logiciel Quant de Bruker avec les mêmes paramètres afin de quantifier l'arctiine et l'arctigénine dans nos extraits de bardane cultivée en hydroponie passive sous différentes lumières d'élicitation. Lors de cette analyse trois parties de la plante ont été étudiées : la racine, la feuille et le pétiole. Le pétiole est la partie de la feuille qui unit le limbe, la partie plate de la feuille, à la gaine foliaire, la base de la feuille qui enveloppe la tige. On l'appelle plus communément la « queue » de la feuille. Les expériences d'élicitation ayant été réalisées pour chaque lumière d'élicitation sur deux plantes distinctes, deux réplicats biologiques, nous avons choisis de présenter les résultats de quantification de chacun des réplicats et non une moyenne de ces deux réplicats biologiques (**Figure III-13**).

Les extraits des plants de bardane ayant subi l'élicitation sous lumière rouge sont les plus riches en nos molécules d'intérêt car dans les deux réplicats et pour chacun des organes étudiés nous avons pu détecter et quantifier nos deux molécules d'intérêt ce qui n'est pas le cas pour les deux autres lumières. Pour l'élicitation sous lumière bleue un des extraits de pétioles montre une forte concentration en arctiine de l'ordre de 1900 ng/mL, ce résultat semble aberrant sachant que pour le second extrait de pétioles sous lumière bleue ni l'arctiine et ni l'arctigénine n'ont pu être détectées. Pour tous les extraits sous lumière bleue et qu'importe l'organe étudié, les concentrations observées d'arctiine et d'arctigénine ne dépassent pas les 100 ng/mL lorsqu'elles ont pu être détectées. Concernant l'élicitation sous lumière blanche l'arctiine et l'arctigénine ont pu être quantifiées dans les deux réplicats uniquement pour les extraits de racines. Ces résultats mettent en lumière l'hétérogénéité biologique entre les deux plantes réplicats pour chaque lumière mais aussi la différence entre les organes d'une même plante. On remarque également que la concentration d'arctiine est toujours plus élevée que celle de l'arctigénine. En effet l'arctiine, la forme glucoside, est celle qui est stockée au sein de la plante.



**Figure III-13 :** Quantification de l'arctiine (orange) et de l'arctigénine (bleu) dans des extraits de bardane cultivée en hydroponie passive et sous une lumière d'élucitation rouge (A), bleue (B) et blanche (C). Nd = Non détecté



Ces résultats permettent de montrer que selon la méthode de culture utilisée ou la lumière d'élicitation et donc le stress appliqué, la concentration de certaines molécules peut fortement varier. Ici avec les méthodes de culture les plus innovantes que sont les cals et l'hydroponie active aucune de nos deux molécules d'intérêt n'ont pu être détectées. Ces deux cultures innovantes apportent probablement un stress supplémentaire à la plante en comparaison de la culture en hydroponie passive qui est une méthode de culture plus conventionnelle et peu stressante. Avec cette méthode de culture, la plante est sous sa forme naturelle et dans des conditions de culture les plus naturelles possibles en ayant accès à tout ce dont elle a besoin pour se développer.

Nos deux molécules d'intérêts faisant parties des lignanes, on les suppose impliquées dans les mécanismes de défense de la plante contre les pathogènes ou suite à un stress. Au sein des plantes, il existe deux catégories de molécules ayant pour rôle la protection de la plante face aux pathogènes et au stress. Ces deux types de molécules sont les phytoanticipines et les phytoalexines. Les phytoalexines sont des molécules de faible poids moléculaire synthétisées et accumulées dans la plante suite à une attaque biotique ou à un stress contrairement aux phytoanticipines, également des molécules de faible poids moléculaires, qui sont elles présentes de façon permanente dans certains tissus végétaux mais qui sont plutôt associées à la croissance car non actives lors du stress (VanEtten et *al.* 1994). La non détection de nos molécules d'intérêt dans les conditions de culture les plus innovantes et probablement les plus stressantes pour la plante nous permettent d'émettre l'hypothèse que l'arctiine et l'arctigénine pourraient être des phytoanticipines.

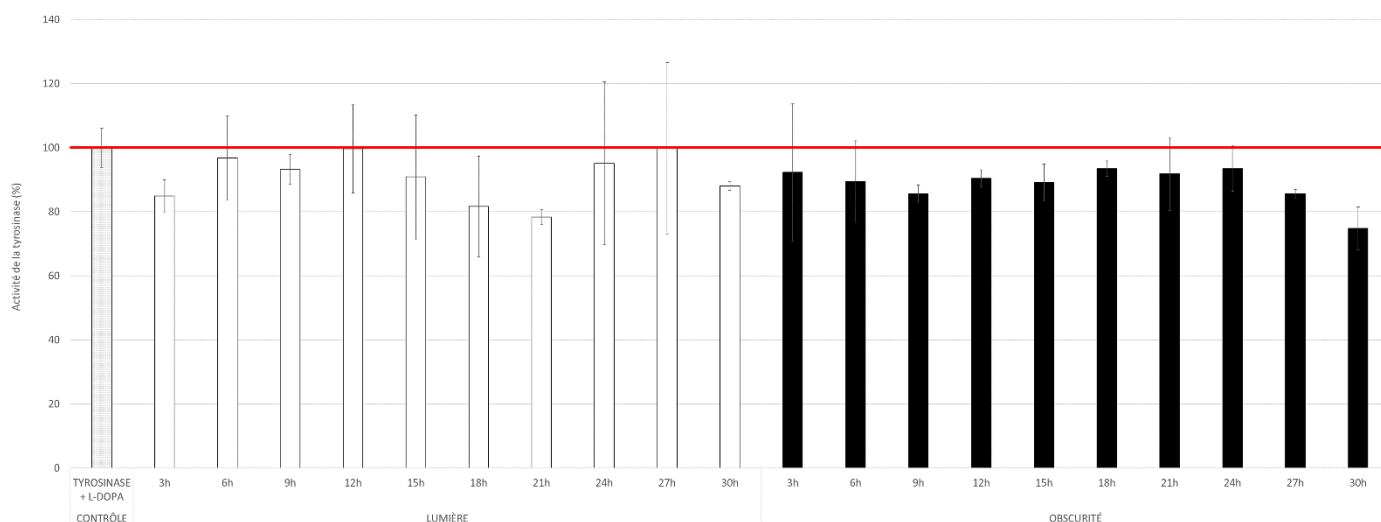
Après avoir été en mesure de suivre et de quantifier la teneur spécifique de l'arctiine et de l'arctigénine dans nos modes de cultures, nous avons voulu évaluer s'il y avait une corrélation directe entre la présence ou non de ces molécules sur l'activité anti-tyrosinase de nos extraits. En effet, l'objectif de ce modèle de plante était d'évaluer l'apport des modes de cultures innovants de la grande bardane et la relation structurale de la présence de l'arctiine et de l'arctigénine comme molécules brevetées anti-tyrosinase. L'arctiine et l'arctigénine décrites comme possédant une activité anti-tyrosinase nous pouvons nous demander si seuls nos extraits de bardane possédant ces deux molécules ont une activité d'inhibition de cette enzyme ou si d'autres molécules sont impliquées. Pour cela nous avons décidé d'évaluer cette activité anti-tyrosinase sur l'ensemble de nos extraits même ceux dans lesquels aucune de ces molécules n'a été détectée. L'activité anti-tyrosinase de nos extraits a été déterminée grâce à un test *in tubo* réalisé sur des plaques 96 puits grâce à de la tyrosinase extraite de champignon.

### 4.1.2 Évaluation de l'activité anti-tyrosinase des extraits de bardane élicités

Le test est réalisé comme décrit dans le [Chapitre II](#).

#### 4.1.2.1 Activité des extraits de cals sur la tyrosinase extraite de champignon

Comme nous avons pu le voir précédemment, ni l'arctiine et ni l'arctigénine qui sont nos deux molécules d'intérêts n'ont pu être détectées dans nos extraits de cals. La [Figure III-14](#) montre l'activité de l'enzyme tyrosinase pour chacun des extraits de cals. Cette activité est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle réalisé avec les mêmes quantités d'enzyme et de substrat que pour les tests mais en présence du solvant d'extraction, ici un mélange éthanol/eau 70/30.



**Figure III-14 :** Activité de la tyrosinase extraite de champignon exprimée en pourcentage pour chacun des extraits de cals cultivés à la lumière ou à l'obscurité pendant 30 heures, n=2. Trait rouge : limite de 100%

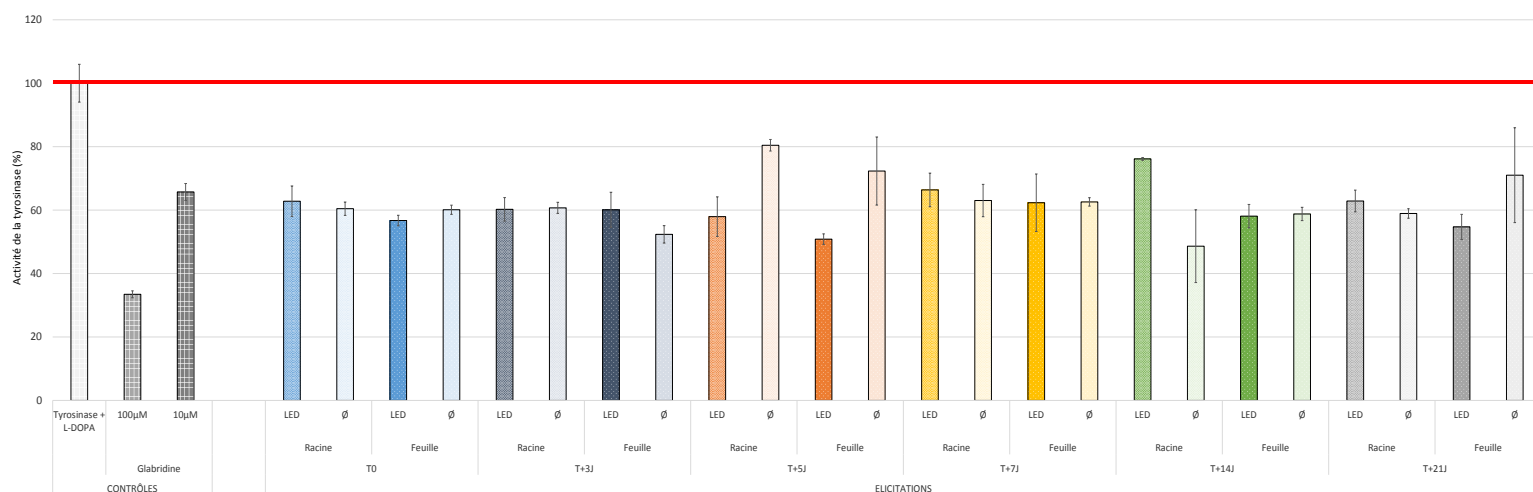
Sur cette [Figure III-14](#) l'ensemble des extraits a une activité tyrosinase comprise entre 80% et 100% correspondant à un faible taux d'inhibition de maximum 20%. Ici nous pouvons dire que l'ensemble des extraits étudiés ne présentent pas d'activité significative d'inhibition de l'enzyme tyrosinase et que l'absence d'arctiine et d'arctigénine peut peut-être en être la raison. Cependant, afin de valider cette hypothèse, il est nécessaire d'étudier l'activité des extraits de la culture en hydroponie active, dénués de ces mêmes molécules, et de les comparer avec celles de l'hydroponie passive.

Pour cela, nous allons continuer de mener nos investigations en analysant cette fois-ci les résultats d'inhibition de la tyrosinase des extraits de bardane cultivée en hydroponie active contre la tyrosinase.

#### 4.1.2.2 Activité sur la tyrosinase des extraits d'hydroponie active avec et sans élicitations

L'activité de l'enzyme tyrosinase a été testée comme précédemment sur nos extraits de bardane qui a été cultivée en hydroponie active ou aéroponie avec et sans élicitations. La [Figure III-15](#) regroupe les activités de la tyrosinase mesurées pour chacun des extraits. L'activité de nos extraits est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle « tyrosinase + L-DOPA ». Ici la glabridine est utilisée comme

témoin positif de l'activité inhibitrice contre la tyrosinase de champignon. La glabridine fait partie de la fraction hydrophobe des extraits de réglisse dont elle en est le composant principal.



**Figure III-15 :** Activité de la tyrosinase extraite de bardane exprimée en pourcentage pour les extraits de bardane cultivée en hydroponie active avec et sans élicitations lumineuses dilués au ½ dans le solvant d'extraction, n=3. LED : élicitation à la lumière bleue en plus de la lumière naturelle, Ø : lumière naturelle, trait rouge : limite de 100%

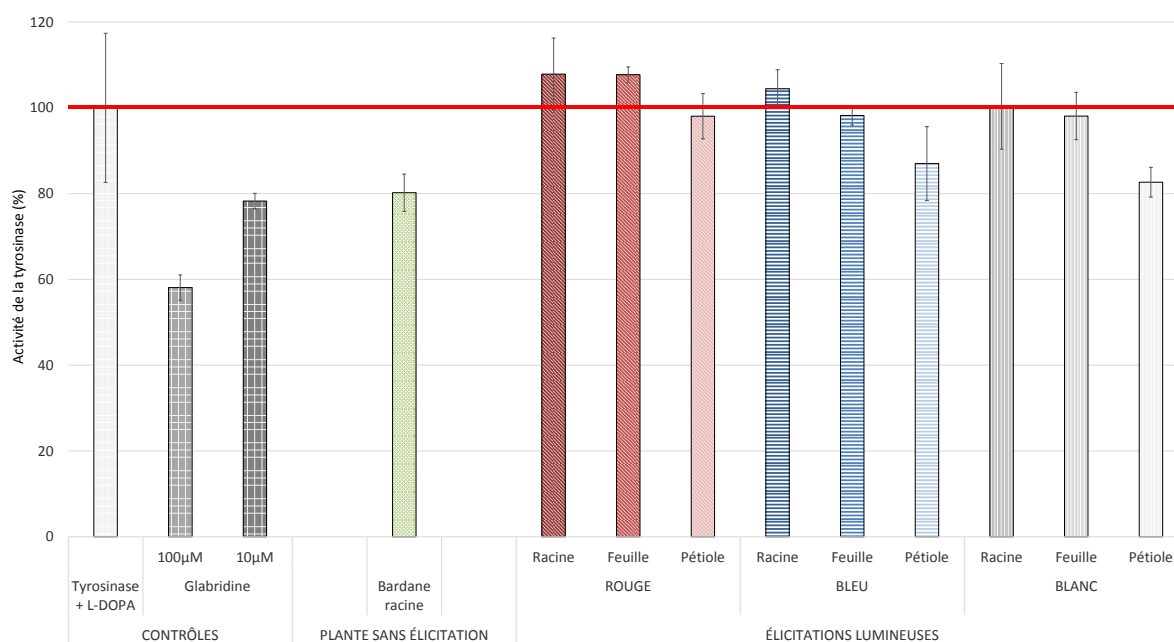
Sur cette **Figure III-15** l'activité de la tyrosinase en présence de l'ensemble des extraits de bardane se situe entre 50% et 80%. Nos extraits de bardane dans ces conditions de culture et d'élicitation montrent donc une inhibition importante de l'activité de la tyrosinase comprise entre 50% et 20%. Ici, ces résultats ne nous permettent pas de mettre en évidence une différence significative d'inhibition que cela soit entre les deux organes de la plante étudiés, la racine et la feuille, ou entre les deux modalités d'élicitations lumineuses utilisées, la lumière naturelle et la supplémentation en lumière bleue.

En rapprochant les résultats de cette **Figure III-15** à ceux observés à la **Figure III-11** montrant l'absence de nos molécules d'intérêts, l'arctiine et l'arctigénine, et contrairement à ce que les résultats de la **Figure III-14** pourraient laisser penser dans ces extraits l'activité d'inhibition de l'enzyme tyrosinase n'est due à l'arctiine et à l'arctigénine. Ces résultats peuvent laisser croire que d'autres molécules extraites de la bardane pourraient avoir cette activité d'inhibition de la tyrosinase.

Afin de continuer notre stratégie de criblage d'activité anti-tyrosinase dans le but d'établir une relation entre nos extraits et une activité d'inhibition de la tyrosinase nous allons poursuivre avec les résultats d'activité des extraits de bardane cultivée en hydroponie passive avec différentes lumières d'élicitation.

#### 4.1.2.3 Activité anti-tyrosinase des extraits d'hydroponie passive réalisés sous différentes lumières d'élicitation

L'activité d'inhibition de la tyrosinase des extraits d'hydroponie passive a été évaluée comme pour les précédents extraits. Ici seuls les résultats d'activité de l'un des deux réplicats biologiques a été évalué, la plante A. La **Figure III-16** regroupe les résultats d'activité de la tyrosinase en présence de nos extraits exprimée en pourcentage par rapport au contrôle « tyrosinase + L-DOPA ».



**Figure III-16** : Activité de l'enzyme tyrosinase extraite de champignon exprimée en pourcentage en présence des extraits de bardane cultivée en hydroponie passive sous différentes lumières d'élicitation dilués au 1/2 dans le solvant d'extraction, n=3. Trait rouge : limite de 100%

D'après les résultats observés à la **Figure III-16** seuls les extraits de pétioles de bardane cultivée sous lumière bleue et sous lumière blanche semblent montrer une inhibition de la tyrosinase mais celle-ci reste faible car inférieure à 20% d'inhibition. Cependant l'extrait de pétioles sous lumière bleue possède une grande variabilité de résultats de par sa grande barre d'erreur comparé à l'extrait de pétioles sous lumière blanche. Les résultats de cette figure permettent de mettre en avant une tendance où les extraits de pétioles ont un plus grand effet inhibiteur de la tyrosinase que les extraits de racines ou de feuilles, en particulier pour le plant cultivé sous lumière blanche.

En voulant corrélérer ces résultats avec ceux obtenus à la **Figure III-13** sur la quantification de l'arctiine et de l'arctigénine dans ces extraits, nous pouvons remarquer qu'aucune corrélation ne peut être établie entre la quantité de nos molécules d'intérêt et l'activité d'inhibition de la tyrosinase. En effet si on se focalise sur les extraits de pétioles, lors de la quantification l'arctiine et l'arctigénine n'ont pu être détectées que dans l'extrait de pétioles à la lumière rouge or c'est précisément dans ce seul extrait de pétioles qu'aucune activité anti-tyrosinase ne peut être établie. Pour les extraits de feuilles

où les molécules d'intérêts n'ont pu être détectées que dans l'extrait à la lumière rouge, les activités anti-tyrosinase sont quasiment identiques ce qui montre encore l'absence de corrélation entre la présence de ces molécules et l'activité observée.

Au regard de l'ensemble de ces résultats aucune corrélation ne semble avérée entre d'un côté la présence et la quantité d'arctine et d'arctigénine et d'un autre côté l'activité d'inhibition de la tyrosinase des extraits de bardane. Ceci laisse penser que d'autres molécules de nos extraits de bardane sont impliquées dans cette activité anti-tyrosinase. Nous allons alors tenter de découvrir qu'elles sont ces molécules.

#### 4.1.3 Recherche et proposition de candidats par une approche différentielle non ciblée

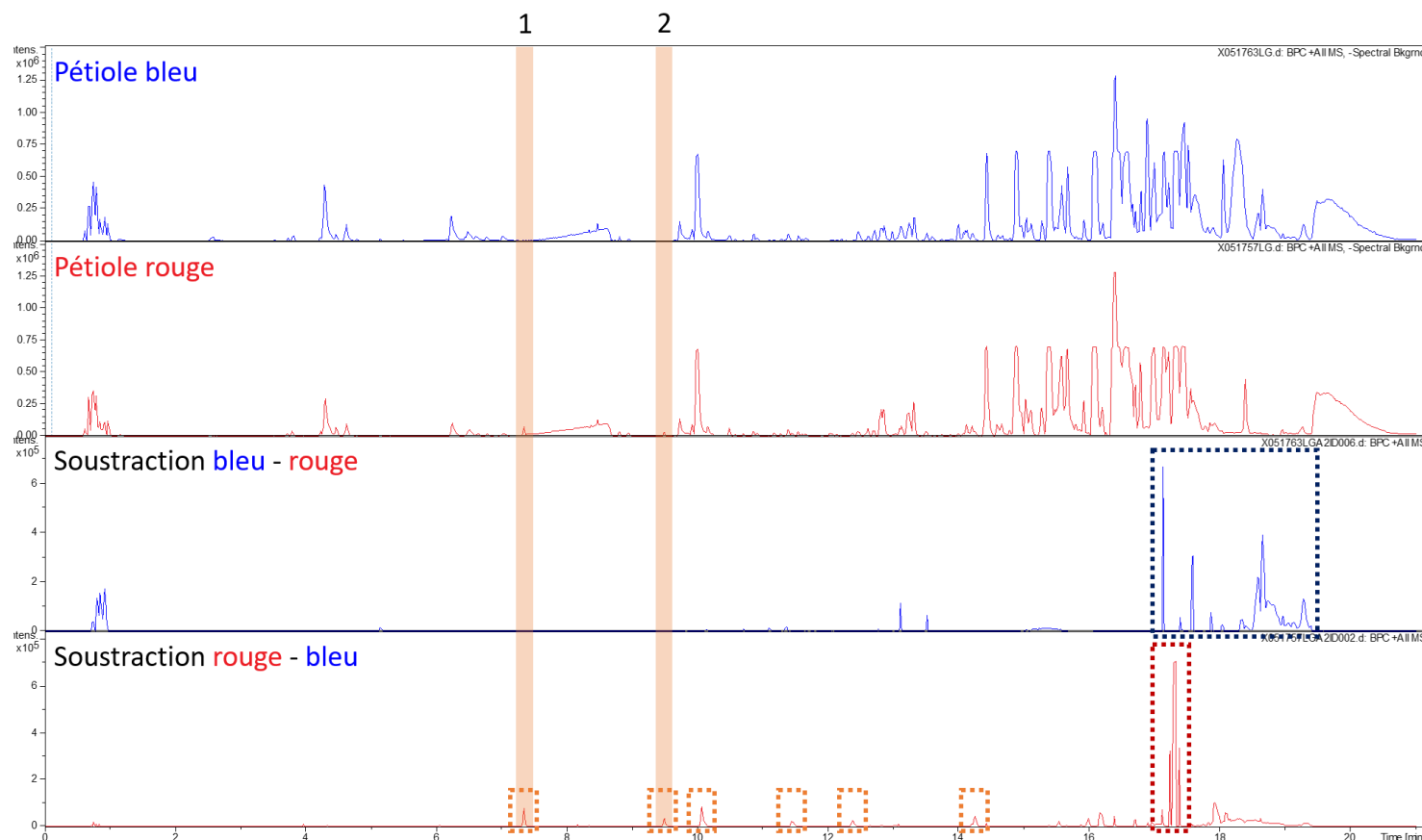
En effet, précédemment l'étude ciblée de la présence de deux potentiels marqueurs, actifs anti-tyrosinase, a permis à la fois de montrer l'influence du mode de culture sur la production ou non de ces molécules mais également, à travers les tests d'inhibition de la tyrosinase, aucune corrélation directe entre l'activité des extraits et la présence de ces molécules, contrairement à ce qui pouvait être attendu.

C'est pourquoi, nous avons envisagé d'appliquer une approche différentielle aux extraits actifs afin d'identifier les métabolites communs et potentiellement responsables de cette activité. Pour cette comparaison nous allons utiliser le logiciel MetaboliteDetect de Bruker qui va nous permettre de soustraire les chromatogrammes des extraits que nous avons choisis et ainsi de mettre en évidence d'une part des molécules communes à ces deux extraits et d'autre part des molécules spécifiques à chaque extrait. Dans cette approche, il peut être comparé deux extraits montrant une activité dans le but de rechercher les molécules communes ou bien comparé deux extraits avec et sans activité afin de proposer des métabolites spécifiques de l'extrait actif comme potentielle molécule d'intérêt.

Dans ce contexte, nous avons dans un premier temps étudié les extraits de pétioles élicités sous lumière bleue et sous lumière rouge lors de la culture en hydroponie passive. Les résultats des comparaisons sont présentés à la **Figure III-17**.

Sur ces comparaisons nous observons 6 pics peu intenses entre 7 et 15 minutes encadrés en orange correspondant à des molécules spécifiques à l'extrait de pétioles élicité sous lumière rouge. Parmi ces 6 pics spécifiques mis en évidence, deux des pics correspondent aux pics de nos molécules d'intérêt, l'arctine (**bandeau 1**) et l'arctigénine (**bandeau 2**). Cette observation est en accord avec les résultats de quantification présentés plus tôt à la **Figure III-13** où ces deux molécules n'ont pu être détectées et quantifiées que dans l'extrait de pétioles sous lumière rouge. Sur les soustractions nous pouvons aussi voir plusieurs pics intenses spécifiques à chacun des extraits étudiés entre 16 et 20

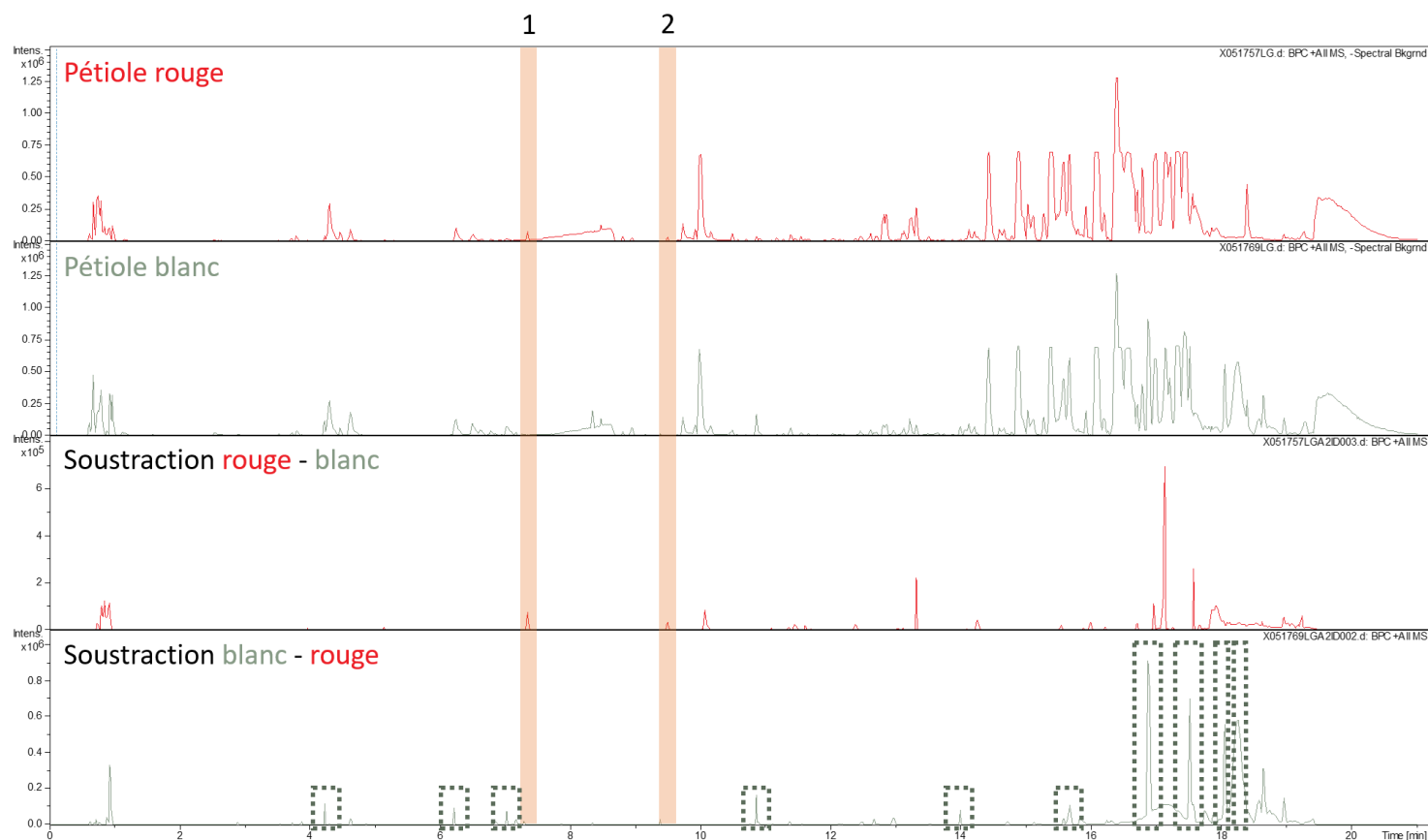
minutes, encadrés en **rouge** pour ceux spécifiques à l'extrait de bardane sous lumière rouge et en **bleu** pour ceux spécifiques à l'extrait sous lumière bleue.



**Figure III-17 :** Chromatogrammes des extraits de pétioles de bardane élicitée sous lumière bleue et sous lumière rouge obtenus par ESI-QTOF-MS et soustractions des chromatogrammes réalisées par le logiciel MetaboliteDetect. Les bandes orange mettent en évidence les pics de nos molécules d'intérêts, l'arctiine (1) et l'arctigénine (2)

Pour ces deux extraits obtenus après élicitations, aucune différence significative n'a pu être constatée concernant l'activité anti-tyrosinase que cela soit entre les deux extraits ou entre les extraits et le contrôle (cf. **Figure III-16**). Dans ce contexte, les molécules intenses spécifiques à chaque extrait mises en évidence entre 16 et 20 minutes peuvent être considérées comme des molécules non actives. En revanche concernant les molécules spécifiques à l'extrait rouge qui ont pu être mises en évidence entre 7 et 15 minutes de par leur faible intensité nous ne pouvons pas conclure sur l'activité ou non de ces molécules. En effet la quantité d'arctiine et d'arctigénine ainsi que des quatre autres molécules dans les 1 mg/mL de l'extrait est très faible par rapport à celle des molécules observées au-delà de 16 minutes d'analyse. Ces molécules pourraient tout aussi bien être non actives ou actives mais ne permettant pas un effet dose-réponse de par leur faible intensité. Ce pourrait être pour cette raison, à cause de leur faible intensité, que l'extrait de pétioles sous lumière rouge ne montre aucun effet d'inhibition de l'activité de la tyrosinase alors qu'il est le seul extrait de pétioles issus des plants répliqués A possédant l'arctiine et l'arctigénine.

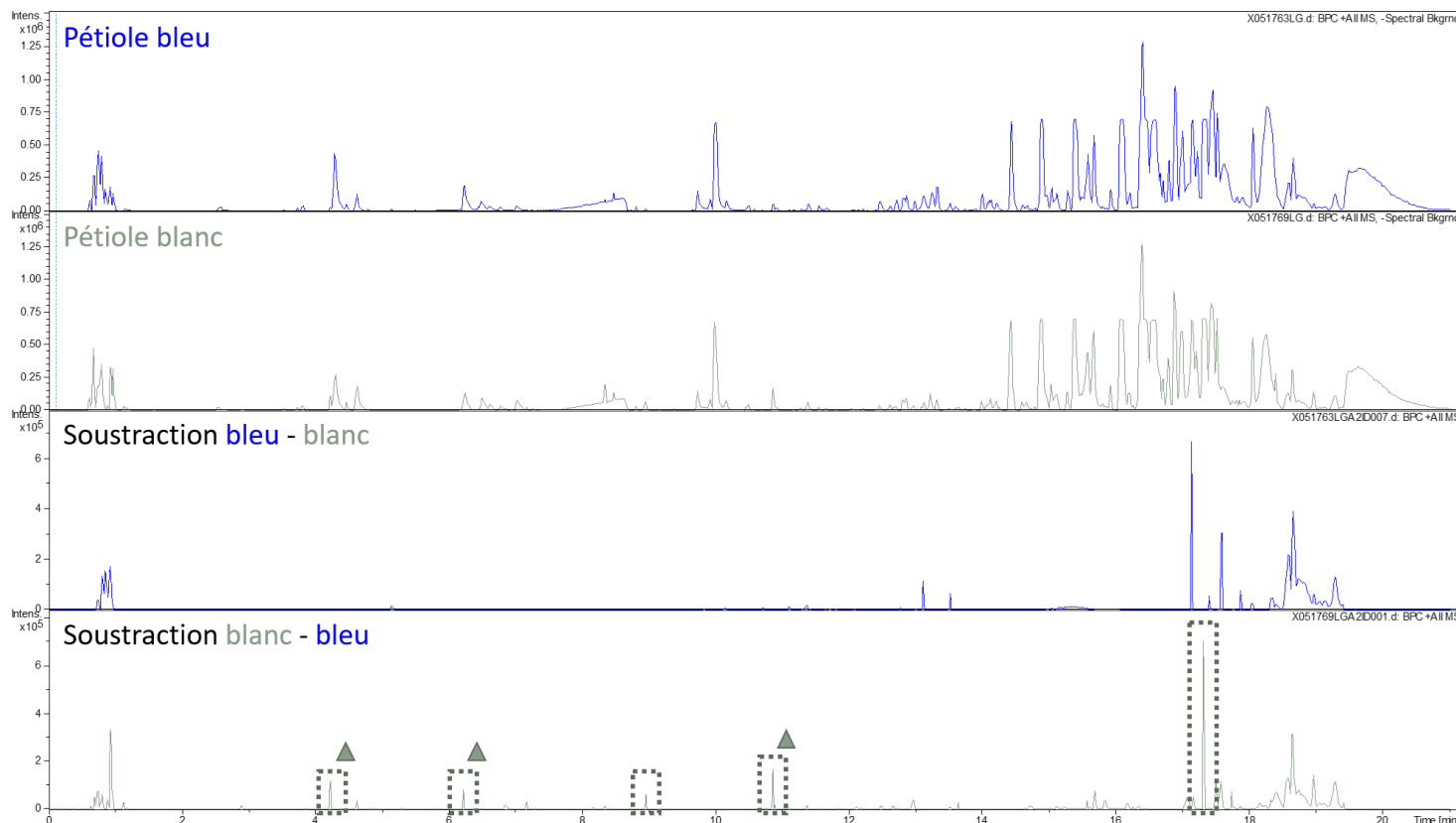
Ensuite nous nous sommes intéressés à l'extrait de pétioles sous lumière blanche car c'est le seul extrait de pétioles qui a véritablement montré une activité d'inhibition de la tyrosinase. Cet extrait a été comparé aux deux autres extraits de pétioles sous lumière rouge et sous lumière bleue. Dans un premier temps, la **Figure III-18** montre la comparaison réalisée à l'aide du logiciel MetaboliteDetect entre les extraits de pétioles sous lumière blanche et sous lumière rouge.



**Figure III-18** : Chromatogrammes des extraits de pétioles de bardane élicitée sous lumière rouge et sous lumière blanche obtenus par ESI-QTOF-MS et soustractions des chromatogrammes réalisées par le logiciel MetaboliteDetect. Les bandes orange mettent en évidence les pics de nos molécules d'intérêt, l'arctiine (1) et l'arctigénine (2)

Sur la première comparaison nous observons comme précédemment à la **Figure III-17** deux pics spécifiques à l'extrait de pétioles élicité sous lumière rouge correspondant aux pics de nos molécules d'intérêt, l'arctiine (bandeau 1) et l'arctigénine (bandeau 2). Cette observation est toujours en accord avec les résultats présentés plus tôt à la **Figure III-13** où ces deux molécules n'ont pu être détectées et quantifiées que dans l'extrait de pétioles sous lumière rouge. Sur la seconde comparaison dix pics plus ou moins intenses encadrés en gris correspondant à des molécules spécifiques de l'extrait de pétioles élicité sous lumière blanche ont pu être mis en évidence. L'extrait de pétioles de bardane élicitée sous lumière blanche montrant une activité d'inhibition de la tyrosinase à l'inverse de l'extrait à la lumière rouge nous pouvons émettre l'hypothèse que ces dix molécules mises en évidence par les encadrés gris peuvent être actives contre la tyrosinase et ainsi responsables de l'activité observée de l'extrait.

Pour tenter de confirmer cette hypothèse nous allons procéder à de nouvelles comparaisons de l'extrait de pétioles de bardane élicitée sous lumière blanche cette fois-ci avec l'extrait obtenu suite à l'élicitation sous lumière bleue. La **Figure III-19** regroupe les comparaisons entre les extraits de pétioles de bardane élicitée sous lumière blanche et sous lumière bleue.

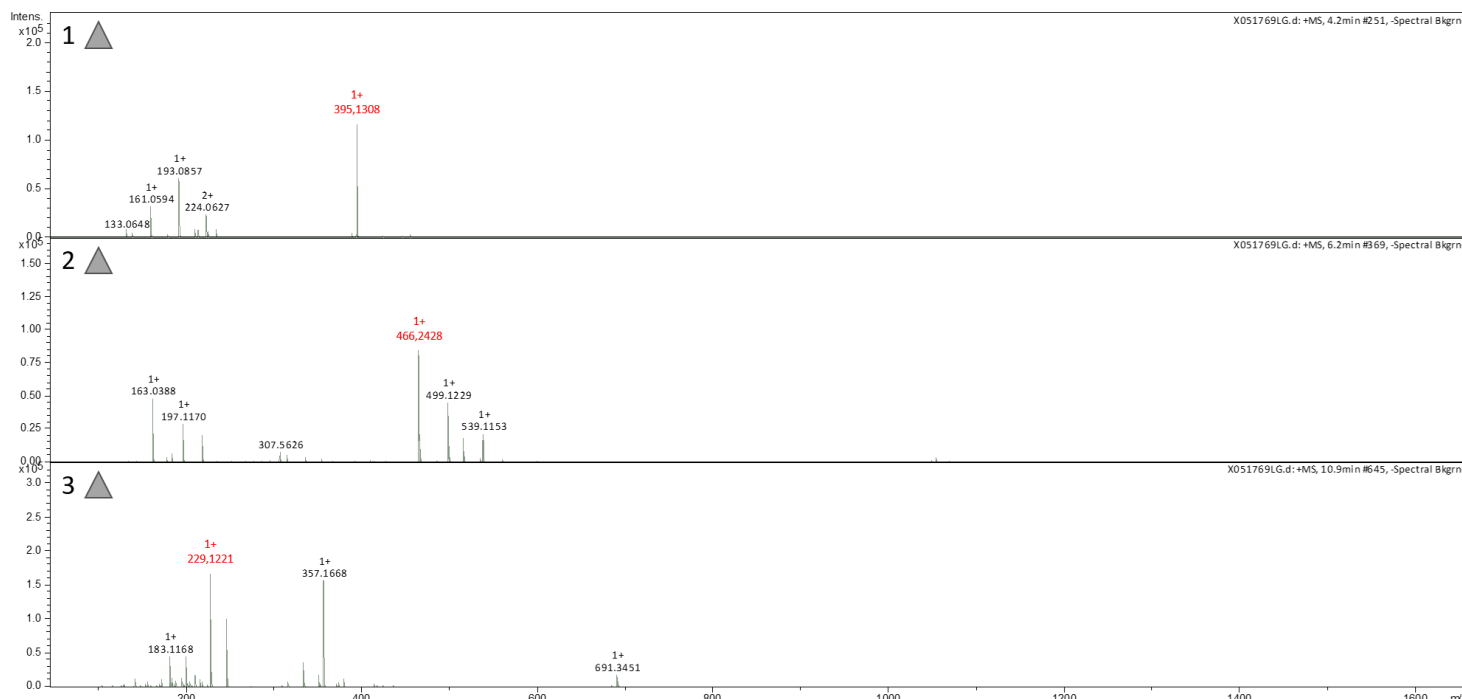


**Figure III-19 :** Chromatogrammes des extraits de pétioles de bardane élicitée sous lumière bleue et sous lumière blanche obtenus par ESI-QTOF-MS et soustractions des chromatogrammes réalisées par le logiciel MetaboliteDetect. Les ▲ indiquent les pics chromatographiques encadrés en gris identiques à ceux encadrés lors de la comparaison entre l'extrait blanc et l'extrait rouge à la figure précédente

Sur la première soustraction entre le chromatogramme de l'extrait sous lumière bleue et celui de l'extrait sous lumière blanche, nous observons quelques pics spécifiques à l'extrait de pétioles élicité sous lumière bleue mais ceux-ci sont plutôt de faible intensité hormis quelques pics se trouvant au-delà de 17 minutes d'analyse. En revanche pour la seconde soustraction on observe dans l'ensemble plus de pics spécifiques à l'extrait sous lumière blanche mais aussi plusieurs pics relativement plus intenses encadrés en gris. Comme énoncé précédemment et étant donné l'activité d'inhibition de la tyrosinase montré par l'extrait de pétioles sous lumière blanche, ces cinq molécules encadrées en gris pourraient être actives contre la tyrosinase. En regroupant ce résultat et celui de la soustraction de l'extrait sous lumière blanche avec celui sous lumière rouge de la **Figure III-18** nous pouvons remarquer que trois pics, indiqués par le symbole ▲, sont encadrés en gris dans les deux soustractions. Cela signifie que ces trois pics sont spécifiques à l'extrait de pétioles élicité sous lumière blanche et uniquement présents dans cet extrait.



Parmi l'ensemble des pics spécifiques à l'extrait de pétioles sous lumière blanche mis en évidence par les encadrés gris à la fois à la **Figure III-18** et à la **Figure III-19**, ces trois pics symbolisés par la marque  $\triangle$  sont ceux les plus susceptibles d'être actifs et pouvant jouer le rôle de potentiel inhibiteur de la tyrosinase et donc responsables de l'activité de l'extrait qui a pu être observée à la **Figure III-16**. La **Figure III-20** regroupe les spectres de masse des trois pics chromatographiques indiqués précédemment par des  $\triangle$ . Sur ces spectres de masse, les ions qui sont le résultat des soustractions sont notés en rouge.



**Figure III-20** : Spectres de masse des trois pics chromatographiques mis en évidence à la figure précédente, symbolisés par des  $\triangle$  et potentiellement responsables de l'activité de l'extrait vis-à-vis de la tyrosinase avec en rouge les ions résultats des soustractions

Afin d'étendre cette analyse aux autres extraits de bardane en hydroponie passive et de les comparer à notre extrait de pétioles de bardane élicitée sous lumière blanche qui est l'extrait le plus actif contre l'activité de la tyrosinase, nous avons recherché les extractions d'ions des trois ions, notés en rouge à la figure précédente, dans l'ensemble de nos extraits. Les extractions d'ions réalisées pour l'ion à  $m/z$  395,1308 montrent que cet ion est présent dans l'ensemble des extraits étudiés mais son intensité est la plus forte dans l'extrait de pétioles à la lumière blanche. Cette observation rejoint notre hypothèse que cet ion semble faire partie des ions responsables de l'activité anti-tyrosinase observée dans l'extrait de pétioles à la lumière blanche. Pour les extractions d'ions des ions à  $m/z$  466,2428 et  $m/z$  229,1221, leur intensité sont plus faibles dans les extraits de pétioles à la lumière rouge et à la lumière bleue ainsi que dans les extraits de racines où leur présence est même indétectable dans l'extrait à la lumière rouge. Ces résultats semblent en adéquation avec les différences d'activités contre

la tyrosinase observées entre ces extraits. En revanche, ces deux ions possèdent des intensités plus élevées dans les extraits de feuilles, et ne permettent donc pas d'expliquer les différences d'activités observées entre les extraits de feuilles et l'extrait de pétioles à la lumière blanche.

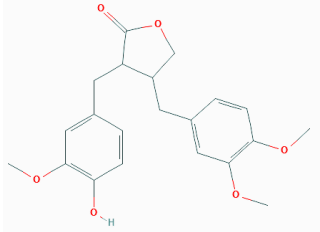
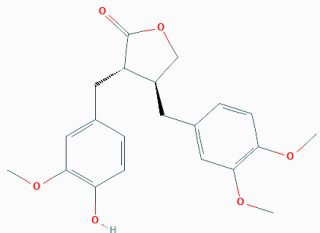
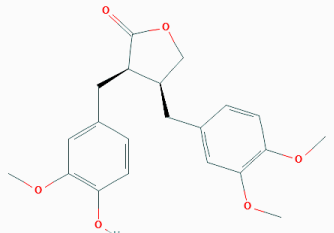
Pour résumer, ici seules les intensités de l'ion à  $m/z$  395,1308 semblent concorder avec les activités anti-tyrosinase mesurées dans nos extraits. Plus l'intensité de cet ion est importante dans un extrait, plus cet extrait montre une activité contre la tyrosinase comme c'est le cas dans l'extrait de pétioles à la lumière blanche.

Dans le but d'identifier ces trois ions, nous avons en premier lieu cherché au sein de la base de données LOTUS pour natural products occurrence database, accessible gratuitement en ligne, si ces ions avaient déjà été retrouvés dans la plante étudiée, la grande bardane. Lors de nos analyses, nous avons pu remarquer que les ions observés dans nos spectres de masse étaient la majeure partie du temps sous forme  $[M+Na]^+$  et quelque fois sous forme  $[M+H]^+$ . Nous sommes alors partis du principe pour chercher dans la base de données que les trois ions sur lesquels se portaient notre intérêt étaient sous l'une de ces deux formes. Le **Tableau III-2** regroupe les résultats d'identification de ces trois ions après recherches dans la base de données LOTUS.

Grâce à la base de données LOTUS, nous avons pu trouver des propositions d'identification pour notre ion à  $m/z$  395,1308. Cet ion serait sous forme  $[M+Na]^+$  et dans la base de données, trois molécules possèdent une masse de 372,15729 pouvant correspondre à notre ion. Ces trois molécules sont la L-arctigénine, la (+)-arctigénine et la (3R,4S)-4-[(3,4-Dimethoxyphenyl)methyl]-3-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]oxolan-2-one et possèdent des structures chimiques très semblables. Précédemment dans cette étude et dans les mêmes conditions d'analyse, un mélange d'arctiine et de (-)-arctigénine standards a été étudié. Or le temps de rétention de la (-)-arctigénine se situait entre 9 et 10 minutes et non pas à 4,2 minutes. On peut alors envisager que la molécule d'intérêt, plus polaire car sûrement glycosylée, à vue son ion moléculaire être fragmenté lors de l'ionisation en source en mode positif. Dans ce contexte, il est difficile d'attribuer le rôle de potentiel candidat inhibiteur à une structure définie mais nous pouvons émettre l'hypothèse que ce soit une génine glycosylée. Pour le confirmer, l'ionisation en mode négatif de nos extraits devra être envisagée afin de stabiliser l'ion moléculaire.

Pour les deux autres ions d'intérêts, aucune correspondance n'a malheureusement pu être effectuée dans la base de données LOTUS.

**Tableau III-2 :** Tableau regroupant les résultats d'identification après recherches dans la base de données LOTUS pour les trois ions d'intérêts

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Résultats trouvés sur la base de données LOTUS		
			Masse monoisotopique (Da)	Formule brute	Nom et Structure chimique
1	4,2	395,1308	372,15729	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	L-Arctigénine 
			372,15729	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	(+)-Arctigénine 
			(3R,4S)-4-[(3,4-Dimethoxyphenyl)methyl]-3-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]oxolan-2-one 		
2	6,2	466,2428	Pas de correspondance dans la base de données pour les formes [M+H] <sup>+</sup> et [M+Na] <sup>+</sup>		
3	10,9	229,1221	de ces ions		

Afin d'identifier plus spécifiquement l'ion à  $m/z$  395,1308 pour lequel nous avons pu trouver des correspondances sur la base de données LOTUS ainsi que les deux ions pour lesquels aucune correspondance n'a été trouvée dans cette même base de données, nous utiliserons les spectres de fragmentation MS/MS qui ont été réalisés à des énergies de collision allant de 25 à 50 eV mais aussi l'outil Smart Formula présent dans le logiciel DataAnalysis de Bruker. Cet outil va émettre des propositions de masses moléculaires et de formules brutes pour chacun des ions sélectionnés. Le **Tableau III-3** rassemble les propositions de formules brutes de l'outil Smart Formula pour les formes [M+H]<sup>+</sup> ainsi que les propositions d'identifications à partir des spectres de fragmentations MS/MS et après interrogations des bases de données en ligne Metlin et MassBank.

**Tableau III-3** : Propositions de formules brutes de l'outil Smart Formula pour la forme  $[M+H]^+$  et propositions d'identification des bases de données Metlin et MassBank à partir des spectres de fragmentation MS/MS pour les trois ions mis en évidence comme potentiellement responsables de l'activité tyrosinase des extraits de bardane cultivée en hydroponie passive et sous élicitation lumineuse

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Propositions de formules brutes obtenues pour la forme $[M+H]^+$ avec l'outil Smart Formula	Propositions d'identifications à partir des fragmentations MS/MS	
				Propositions de Metlin	Propositions de MassBank
1	4,2	395,1308	$C_{14}H_{22}N_2O_{11}$	Pas de proposition	5(S)-5-carboxystrictosidine $C_{28}H_{34}N_2O_{11}$
			$C_{15}H_{18}N_6O_7$		Imatinib $C_{29}H_{31}N_7O$
			$C_{12}H_{10}N_{16}O$		4(S)-5-carboxystrictosidine $C_{28}H_{34}N_2O_{11}$
			$C_{16}H_{14}N_{10}O_3$		Buprenorphine $C_{29}H_{41}NO_4$
			$C_{12}H_{18}N_{12}S_2$		Diatoxanthin $C_{40}H_{54}O_2$
			$C_{15}H_{26}N_2O_6S_2$		Ginkgolide C $C_{20}H_{24}O_{11}$
			$C_{16}H_{22}N_6O_2S_2$		Bacoside A3 $C_{47}H_{76}O_{18}$
			$C_{23}H_{22}O_4S$		Ginkgolide C $C_{20}H_{24}O_{11}$
			$C_{24}H_{18}N_4S$		Bacopside X $C_{46}H_{74}O_{17}$
			$C_{27}H_{14}N_4$		NP-006989(12) $C_{27}H_{30}O_{16}$
			$C_{16}H_{30}N_2OS_4$		

Suite *Tableau III-3*

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+H] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula	Propositions d'identifications à partir des fragmentations MS/MS	
				Propositions de Metlin	Propositions de MassBank
2	c6,2	466,2428	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	Tyr Gln Arg C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	Cephaeline C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
			C <sub>24</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>8</sub>		Quercetin-3,4'-O-di-beta-glucoside C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>
			C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>11</sub> O <sub>2</sub>		Atorvastatin C <sub>33</sub> H <sub>35</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
			C <sub>17</sub> H <sub>35</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> S		Taurolithocholate C <sub>26</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>5</sub> S
			C <sub>21</sub> H <sub>35</sub> N <sub>7</sub> OS <sub>2</sub>		Rifaximin C <sub>46</sub> H <sub>51</sub> N <sub>3</sub> O <sub>11</sub>
			C <sub>28</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>3</sub> S		Silybin B C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>
			C <sub>25</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>		Isosilybine B C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>
			C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>3</sub> S <sub>4</sub>		Quercetin 3-O-rutinoside C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>
3	10,9	229,1221	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	Pas de fragmentation disponible	Isosilybin A C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>
					Emetin C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>

Pour plus de simplicité, ici nous n'avons présenté seulement les propositions de formules brutes pour la forme  $[M+H]^+$ , les propositions pour la forme  $[M+Na]^+$  ainsi que les énergies de collision utilisées et les ions fragments MS/MS obtenus, avec leur  $m/z$  et leur intensité, sont présentés à l'**Annexe 1**. Pour les ions à  $m/z$  395,1308 et  $m/z$  466,2428 les spectres de fragmentation nous ont permis après soumission dans les bases de données Metlin et MassBank d'émettre des propositions d'identification pour ces ions. En revanche, aucune de ces propositions d'identification ne correspond à une proposition de formules brutes émises pour la forme  $[M+H]^+$  par l'outil Smart Formula du logiciel DataAnalysis de Bruker. Pour ces deux ions on ne peut donc pas identifier avec certitude la molécule présente dans notre extrait. Pour le troisième ion, à  $m/z$  229,1221 aucune fragmentation MS/MS n'était disponible, seul l'outil Smart Formula peut nous permettre d'identifier la molécule. Cet outil a pu nous fournir pour cet ion une unique proposition de formule brute  $C_{15}H_{16}O_2$  pour la forme  $[M+H]^+$ . Pour cette formule brute, on retrouve 75 propositions de molécules sur la base de données Metlin parmi lesquelles on peut retrouver par exemple la nabumétone, la cacalol, le mansonone C, le lindenenone ou encore le bisphénol A. N'ayant pas de spectre de fragmentation pour cet ion, nous ne pouvons statuer sur son identification parmi les 75 correspondances de la formule brute dans la base de données Metlin.

#### 4.1.4 En résumé

Lors de cette étude sur l'évaluation de l'apport du mode de culture et de l'élicitation lumineuse sur l'activité tyrosinase, nous avons dans un premier temps souhaité suivre la présence de l'arctiine et de l'arctigénine, deux molécules présentes dans la grande bardane et déjà brevetées dans la composition de produits cosmétiques pour leurs propriétés d'inhibition de la tyrosinase. Malheureusement ces deux molécules n'ont pu être détectées que dans les extraits de grande bardane cultivée en hydroponie passive. Leur teneur a été quantifiée dans le but de les corrélérer à l'activité d'inhibition de la tyrosinase de nos extraits.

Les extraits montrant le plus de capacité d'inhibition de la tyrosinase sont ceux issus de la culture en hydroponie active avec des inhibitions comprises entre 20 et 50%. Pour la grande bardane cultivée en hydroponie passive, les extraits de pétioles sont plus inhibiteurs que les extraits de racines ou de feuilles notamment sous élicitation à la lumière blanche. En revanche pour les extraits de cals de grande bardane, aucune activité d'inhibition significative de la tyrosinase n'a pu être mesurée. L'ensemble de ces résultats ne nous ont pas permis d'établir une corrélation entre la teneur en arctiine et arctigénine de nos extraits et leur activité d'inhibition de la tyrosinase. D'autres molécules semblent alors impliquées dans la capacité d'inhibition de la tyrosinase de nos extraits de grande bardane.

Bien qu'il y ait eu une étude ciblée, avec le suivi de l'arctiine et de l'arctigénine, et une étude non ciblée, par une approche différentielle, afin d'essayer de mettre en avant des propositions de candidats, il est très complexe d'établir des relations structure-activité. Malgré la non identification des candidats, la présence de trois molécules d'intérêt pourra être étudiée plus spécifiquement suite à cette étude en mettant en place une analyse par spectrométrie de masse plus large voire l'utilisation de l'approche de réseaux moléculaires mis en place dans le cadre du programme ValBioCosm' par le Docteur Souhila Messaili.

En parallèle, nous avons également employé cette même approche dans l'évaluation des modes de culture en particulier la culture en hydroponie active à l'échelle pilote pour l'effet protecteur anti-ROS. Dans le cadre de cette étude, une approche de criblage cellulaire a été réalisée par notre partenaire le Centre de Biophysique Moléculaire et notamment l'équipe du Docteur Patrick Baril dans le suivi de la toxicité et des activités sur cellules de kératinocytes HaCaT.

## 4.2 Partie 2 : Impact de l'élicitation sur l'activité antioxydante et identification de molécules responsables de cette activité

Dans la partie précédente, l'activité était centrée sur l'effet inhibiteur de la tyrosinase *in tubo* avec une comparaison sur l'apport du mode de culture, cals, hydroponie active et hydroponie passive, et sur la nature de l'élicitation, tout d'abord sur la production de deux molécules cibles, l'arctiine et l'arctigénine puis sur la corrélation entre la présence ou non de ces molécules et l'activité inhibitrice de nos extraits. Dans ce contexte, une approche non ciblée et différentielle a été mise en place afin de mettre en évidence d'éventuelle structure phytochimique responsable de cette activité.

C'est dans ce même contexte que nous avons eu l'opportunité d'évaluer l'apport d'une culture en hydroponie active élicitée ou non dans la protection anti-ROS *in tubo* mais également et surtout sur cellules de kératinocytes en collaboration avec notre partenaire le Docteur Patrick Baril du CBM d'Orléans. La toxicité ainsi que l'activité anti-ROS de 24 extraits, comprenant 2 conditions d'élicitation (lumière naturelle et lumière bleue en supplément de la lumière naturelle), 2 organes (racine et feuille) et 6 temps d'échantillonnage, ont ainsi été étudiées en comparaison aux 192 échantillons, à raison de 4 réplicats biologiques et 2 réplicats techniques pour chaque extrait, fait en spectrométrie de masse pour une potentielle étude métabolomique.

### 4.2.1 Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de bardane cultivée en hydroponie active

L'activité antioxydante de nos extraits a pu être évaluée grâce à des tests d'activité antioxydante *in tubo* et à des tests de criblage cellulaire réalisés *in vitro* avec des cellules de kératinocytes (HaCaT).

#### 4.2.1.1 Tests d'activité antioxydante *in tubo*

Différents tests d'activité *in tubo* ont été réalisés sur nos extraits, les tests DPPH et CUPRAC présentés au [Chapitre II](#). Dans ces tests le Trolox qui est un analogue hydrophile de la vitamine E est utilisé comme molécule de référence. La capacité antioxydante des extraits exprimés en équivalent Trolox correspondra alors à la concentration de Trolox en  $\mu\text{g/mL}$  ayant la même activité qu'une même concentration unitaire d'extrait.

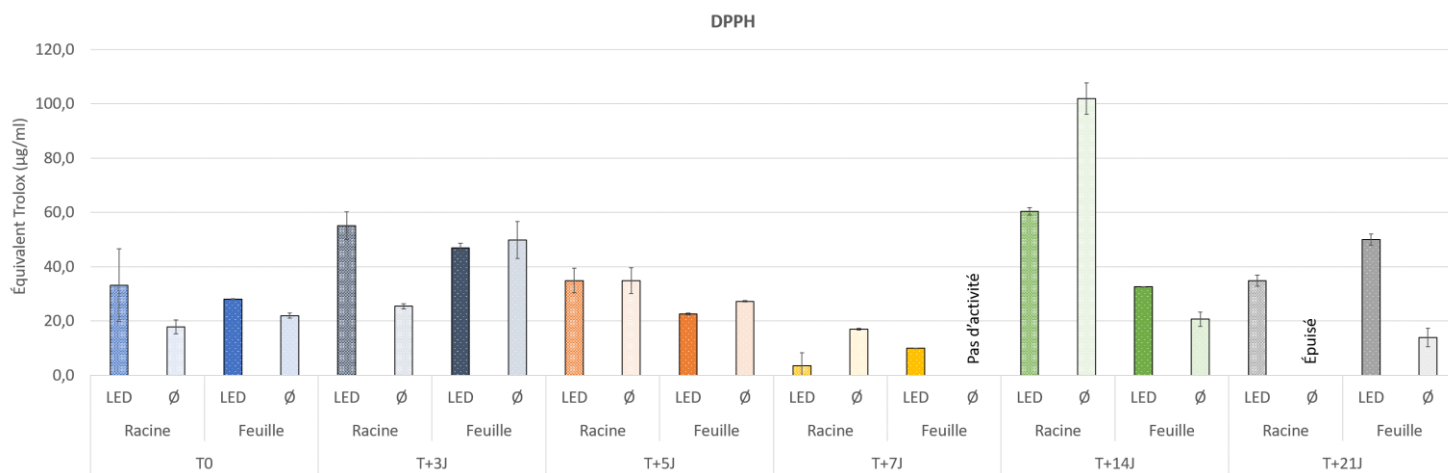
Il est à noter que lors de ces tests, malheureusement l'extrait de racines non élicité à la lumière bleue à 21 jours n'a pu être analysé par manque de quantité.

#### i) Test DPPH

Le test 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging Capacity réagit avec les composés susceptibles de donner des atomes d'hydrogène. Il est utilisé pour estimer la capacité de piégeage des radicaux libres des molécules antioxydantes présentent dans l'extrait qui par réaction de réduction



décolorent la solution de DPPH. La **Figure III-21** montrent les résultats de ce test en présence de nos extraits.



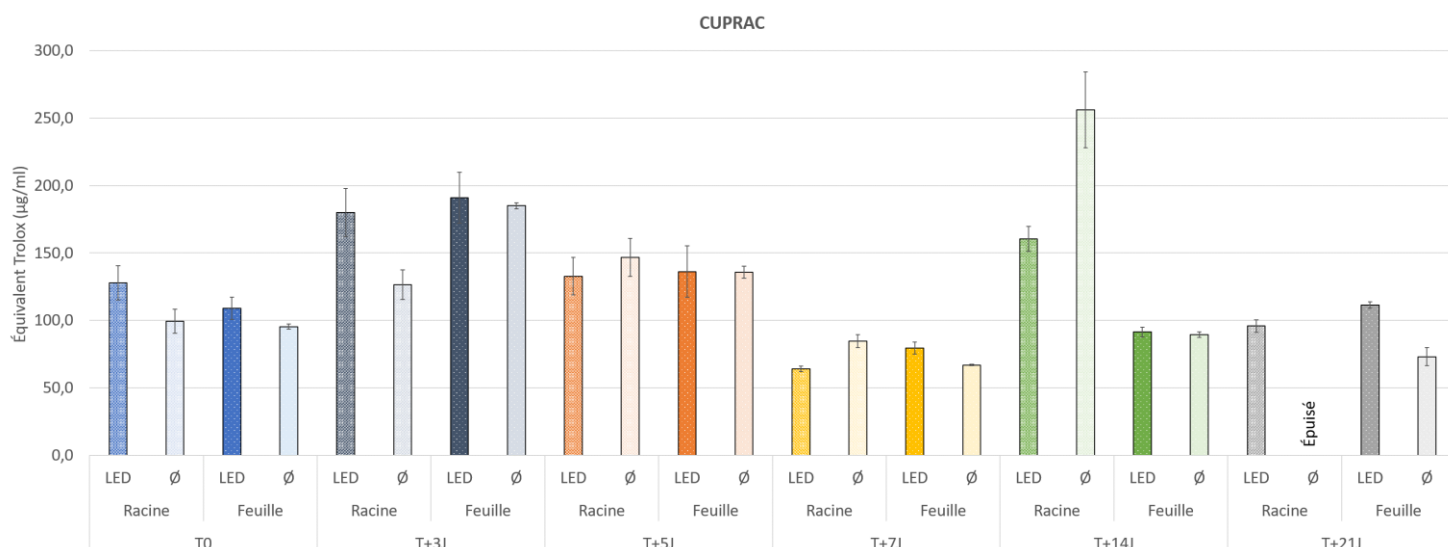
**Figure III-21** : Activité antioxydante exprimée en µg/mL d'équivalent Trolox mesurée avec le test DPPH pour les extraits de bardane cultivée en hydroponie active, n=3. LED : élicitation à la lumière bleue en complément de la lumière naturelle et Ø : lumière naturelle uniquement

Sur cette **Figure III-21** on remarque que la majorité des extraits ont une activité antioxydante comprise entre 20 et 60 µg/mL d'équivalent Trolox. Dans l'ensemble les activités antioxydantes de nos extraits avec le test DPPH varient d'environ 5 µg/mL d'équivalent Trolox pour l'extrait de racines sous élicitation lumineuse à 7 jours à environ 100 µg/mL d'équivalent Trolox pour l'extrait de racines à la lumière naturelle à 14 jours. Ces deux extraits apparaissent donc respectivement comme le moins antioxydant et le plus antioxydant avec ce test. Cette figure nous permet également de mettre en évidence une différence d'activité antioxydante en fonction de la durée d'élicitation. Avec le test DPPH les extraits de racines à 14 jours apparaissent comme les plus actifs avec des équivalents Trolox supérieurs à 60 µg/mL. De plus dans une grande majorité des cas, exception faite des extraits de racines à 7 et 14 jours, l'extrait à la lumière naturelle semble avoir la pire activité antioxydante avec un équivalent Trolox plus faible que l'extrait sous élicitation lumineuse.

Après avoir étudié l'activité antioxydante de nos extraits grâce au test DPPH, nous allons maintenant analyser l'activité de nos extraits avec le test CUPRAC.

#### ii) Test CUPRAC

Le test Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity permet de mettre en évidence des composés antioxydants capables de réduire l'ion cuivre II  $\text{Cu}^{2+}$  de couleur **bleu clair** en ion cuivre I  $\text{Cu}^+$  de couleur **orange** par transfert d'électrons. Les résultats de ce test sur nos extraits sont présentés à la **Figure III-22**.



**Figure III-22 :** Activité antioxydante exprimée en  $\mu\text{g/mL}$  d'équivalent Trolox mesurée avec le test CUPRAC pour les extraits de bardane cultivée en hydroponie active,  $n=3$ . LED : éllicitation à la lumière bleue en complément de la lumière naturelle et Ø : lumière naturelle uniquement

Sur cette **Figure III-22** on peut noter que la plupart des extraits ont une activité antioxydante comprise entre 100 et 200  $\mu\text{g/mL}$  d'équivalent Trolox. Dans l'ensemble les activités antioxydantes de nos extraits avec le test CUPRAC varient d'environ 60  $\mu\text{g/mL}$  d'équivalent Trolox pour l'extrait de racines sous éllicitation lumineuse à 7 jours à environ 250  $\mu\text{g/mL}$  d'équivalent Trolox pour l'extrait de racines à la lumière naturelle à 14 jours. Ces deux extraits, comme pour le test DPPH, apparaissent donc respectivement comme le moins antioxydant et le plus antioxydant avec ce test. De la même façon que sur la figure précédente sur cette figure nous pouvons mettre en évidence une différence d'activité en fonction de la durée d'éllicitation. Avec le test CUPRAC, les extraits à 7 jours apparaissent également comme les moins actifs avec des équivalents Trolox inférieurs à 90  $\mu\text{g/mL}$ . De plus et pareillement qu'avec le test DPPH l'extrait à la lumière bleue semble avoir une meilleure activité antioxydante avec un équivalent Trolox plus élevé que l'extrait sans éllicitation lumineuse, à la lumière naturelle, à l'exception des extraits de racines à 7 et 14 jours où l'inverse est observé.

Les observations effectuées sur les résultats de ce test CUPRAC sur nos extraits sont dans l'ensemble identiques à celles réalisées lors du test DPPH sur les mêmes extraits. Les extraits à 7 jours semblent être les extraits ayant la plus faible capacité antioxydante. De plus pour chaque organe étudié et à tous les jours d'éllicitation, les extraits à la lumière naturelle ont les plus petits équivalents Trolox en comparaison des extraits à la lumière bleue. Grâce à ces résultats d'activités, nous allons être en mesure d'étudier spécifiquement ces modalités du point de vue de l'empreinte phytochimique obtenue par spectrométrie de masse lors d'une approche différentielle comme précédemment à la **Partie 1** sur l'activité tyrosinase.

Dans le cadre de notre projet, nous avons eu l'opportunité de comparer ces résultats de première intention *in tubo* avec un modèle cellulaire *in vitro* apportant une plus grande robustesse des effets protecteurs. En plus de l'évaluation de l'activité, il a également été possible d'évaluer la toxicité ou l'innocuité des extraits à différentes concentrations. Ces résultats permettront d'apporter des données essentielles à nos partenaires du consortium.

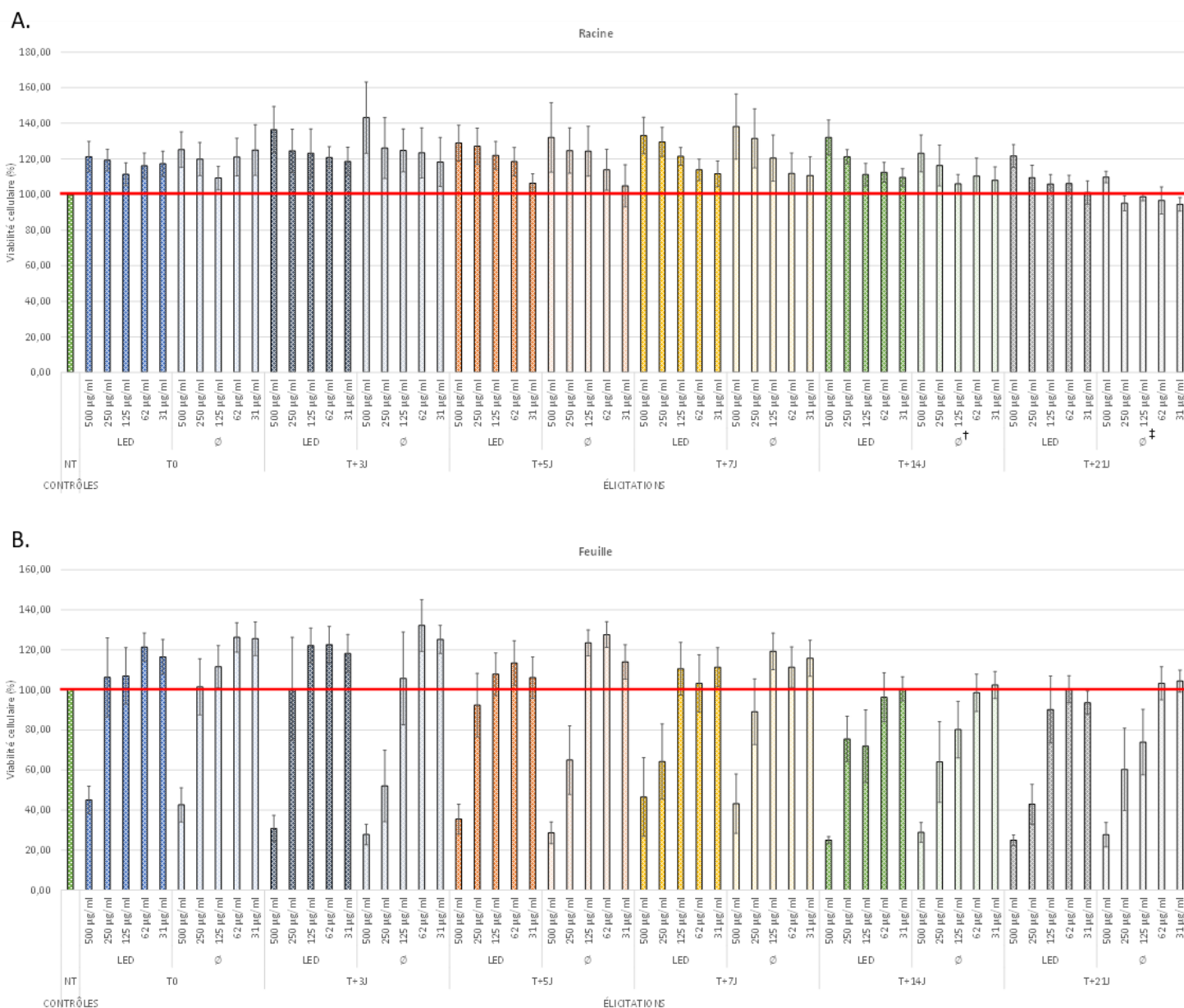
#### *4.2.1.2 Criblage cellulaire in vitro sur des cellules de kératinocytes*

Avant de réaliser le test de protection contre les ROS, l'innocuité de nos extraits a été évaluée sur des cellules de kératinocytes HaCaT.

##### *i) Étude de l'innocuité des extraits sur les cellules de kératinocytes HaCaT*

Le test de XTT permet de vérifier que nos extraits ne sont pas cytotoxiques pour les cellules utilisées et aussi de déterminer à partir de quelle concentration, les extraits sont bien tolérés par les cellules. Cinq concentrations ont été étudiées pour chacun des extraits : 500, 250, 125, 62 et 31 µg/mL. La **Figure III-23** regroupe les résultats de viabilité cellulaire déterminée à l'aide du test XTT pour chacun des extraits de bardane cultivée en hydroponie active.

Si l'on commence par étudier la **Figure III-23.A** on peut remarquer qu'exception faite des extraits à T0 la viabilité cellulaire est la plus élevée en présence des extraits les plus concentrés pour toutes les conditions d'élicitation. On peut également noter que les viabilités cellulaires les plus faibles, qui sont aux alentours de 100%, sont observées pour les extraits à T+21J avec élicitation à la lumière bleue mais avec un effet plus marqué pour les extraits à la lumière naturelle. Dans l'ensemble, les extraits de racines de bardane cultivée en hydroponie active semblent être bien tolérés par les cellules de kératinocytes à toutes les concentrations utilisées.



**Figure III-23 :** Évaluation de la cytotoxicité par le test de XTT des extraits de racines (A) et de feuilles (B) de bardane cultivée en hydroponie active à différentes concentrations et exprimée en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport aux cellules non traitées, 4 expériences indépendantes avec  $n=3$ . NT : non traitée, LED : élicitation à la lumière bleue en complément de la lumière naturelle, Ø : lumière naturelle uniquement, + : 2 expériences indépendantes avec  $n=3$ , ‡ : 1 expérience indépendante avec  $n=3$  et trait rouge : limite de 100%

Pour les extraits de feuilles présentés à la **Figure III-23.B** on remarque que contrairement aux observations faites avec les extraits de racines, ici la viabilité cellulaire est la plus élevée en présence des extraits les moins concentrés. Les extraits de feuilles à la plus forte concentration de 500  $\mu\text{g/mL}$  ne permettent d'obtenir qu'une viabilité cellulaire comprise entre 20 et 40%. Comme observé pour les extraits de racines la viabilité cellulaire diminue au cours du temps de culture. Pour les extraits de feuilles, seules les plus faibles concentrations sont bien tolérées par les cellules de kératinocytes. De plus sur ces extraits de feuilles on peut noter un effet qui n'a pas été observé sur les extraits de racines, l'élicitation à la lumière bleue permet de diminuer la toxicité des extraits aux plus fortes concentrations

en comparaison de la lumière naturelle. En effet aux temps T+3J et T+5J et pour les concentrations de 500 et 250 µg/mL on remarque une viabilité cellulaire plus élevée pour les extraits à la lumière bleue en comparaison des extraits à la lumière naturelle. Les profils phytochimiques de ces extraits seront étudiés et comparés afin de conclure sur une différence significative ou non entre les extraits à la lumière naturelle et à la lumière bleue à ces temps d'échantillonnage.

Suite à ces résultats, nous avons pu voir que certaines concentrations d'extraits étaient bien tolérées par les cellules. Nous allons maintenant étudier l'activité de protection contre les ROS des extraits à une concentration de 125 µg/mL qui est une des concentrations bien tolérée par les cellules à la fois pour les extraits de racines et pour les extraits de feuilles.

*ii) Évaluation de la protection contre les ROS des extraits de bardane cultivée en hydroponie active*

L'activité de protection contre les ROS de nos extraits a pu être déterminée grâce à l'application d'un stress extérieur, l'application de rayonnements ultraviolets, favorisant la production de ROS au sein des cellules. Nous allons alors pouvoir déterminer cette quantité de ROS produits en présence de nos extraits par le suivi de la fluorescence à 490-535 nm qui sera le reflet de l'oxydation par les ROS de la 2',7'-Dichlorodihydrofluorescéine diacétate (DCF-DA) en 2',7'-Dichlorofluorescéine (DCF). En effet, plus il y aura de ROS produits, plus les molécules de DCF-DA seront oxydées en DCF et donc plus on mesurera de fluorescence. La **Figure III-24** regroupe les résultats de protection contre les ROS des extraits à 125 µg/mL de racines et de feuilles de bardane cultivée en hydroponie active déterminés sur des cellules de kératinocytes *in vitro*.

Sur cette **Figure III-24** on peut noter en premier lieu que les extraits de feuilles de bardane semblent avoir un effet plus protecteur contre les ROS que les extraits de racines. En effet, pour les extraits de feuilles l'ensemble des extraits qu'ils proviennent des plantes élicitées ou non à la lumière bleue présentent tous un effet de protection contre les ROS allant de 7,5% jusqu'à environ 60% de protection. Tandis que pour les extraits de racines, seul l'extrait à la lumière naturelle sans élicitation à la lumière bleue à 21 jours montre un effet protecteur contre les ROS. Cette observation n'est pas en corrélation directe avec la littérature où des extraits de racines de bardane ont été montrés comme ayant la capacité de capter les ROS (Duh 1998, Tian et *al.* 2015, Skowrońska et *al.* 2021). Cette différence pourrait provenir du mode de culture en hydroponie active car même les extraits de bardane cultivée à la lumière naturelle ne possèdent pas cet effet protecteur.



**Figure III-24** : Protection contre les ROS exprimée en pourcentage par rapport aux cellules irradiées contrôles pour les extraits de racines (A) et de feuilles (B) de bardane cultivée en hydroponie active sous élicitation à la lumière bleue (bleu) ou sous lumière naturelle (orange), 3 expériences indépendantes avec  $n=5$ . LED : élicitation à la lumière bleue en complément de la lumière naturelle, Ø : lumière naturelle uniquement

Concernant les résultats des extraits de racines à la **Figure III-24.A**, on peut remarquer que pour les extraits des plants cultivés à la lumière naturelle la capacité de protection contre les ROS diminue lors des 3 premiers jours de culture de -6,3% à -24,7% puis augmente progressive de 3 jours à 14 jours de culture jusqu'à -13,3% pour finalement augmenter plus fortement entre 14 et 21 jours jusqu'à 41,7%. Pour les extraits de plants cultivés sous l'élicitation lumineuse bleue, le même type d'observation est réalisé, la capacité de protection contre le ROS diminue sur les 7 premiers jours de l'élicitation de -12,9% à -38,9% puis augmente légèrement de 7 à 14 jours jusqu'à -37% pour augmenter plus fortement de 14 à 21 jours jusqu'à -11,3%. Dans cette figure, les écartypes illustrés par les barres d'erreur sont relativement importants, en effet les barres d'erreur pour un temps donné se croisent pour les extraits à la lumière naturelle et sous élicitation lumineuse.

Pour les extraits de feuilles à la **Figure III-24.B** les tendances ne sont pas les mêmes que pour les racines. Pour les extraits à la lumière naturelle on remarque une légère augmentation de 4% entre les extraits à T0 et ceux à 3 jours. Une diminution progressive est ensuite observée jusqu'au septième jour de culture qui atteint 12,7% de protection contre les ROS. Et enfin une forte augmentation est relevée pour les extraits à 14 et 21 jours jusqu'à atteindre 59,3% de protection à 21 jours de culture. Pour les extraits de plantes cultivée sous la lumière d'élicitation bleue, une diminution de 19,5% à 7,5% de protection est d'abord observée entre les extraits à T0 et ceux à 3 jours puis une augmentation sous forme de plateau est à remarquer. Un premier plateau est observé pour les extraits à 5 et 7 jours avec une valeur de protection contre les ROS aux alentours de 29%. Le second plateau est représenté pour une valeur de protection comprise entre 42% et 45% pour les extraits à 14 et 21 jours. Sur cette figure, les écartypes représentés par les barres d'erreur sont plus petits que ceux qui ont pu être observés dans la figure du dessus pour les extraits de racines cependant les barres d'erreur pour un même temps de culture se croisent toujours pour les extraits obtenus à la lumière naturelle et sous élicitation à la lumière bleue.

Dans cette **Figure III-24** on ne peut pas établir de réelles différences entre les résultats observés pour les extraits à la lumière naturelle et ceux sous élicitation lumineuse en revanche des tendances peuvent être établies pour les extraits de racines et les extraits de feuilles indépendamment de l'exposition lumineuse. Ici nous avons pu voir que seuls les extraits de feuilles semblent présenter une capacité de protection contre les ROS en dépit de ce que nous avons pu observer dans la littérature (Duh 1998, Tian et *al.* 2015, Skowrońska et *al.* 2021).

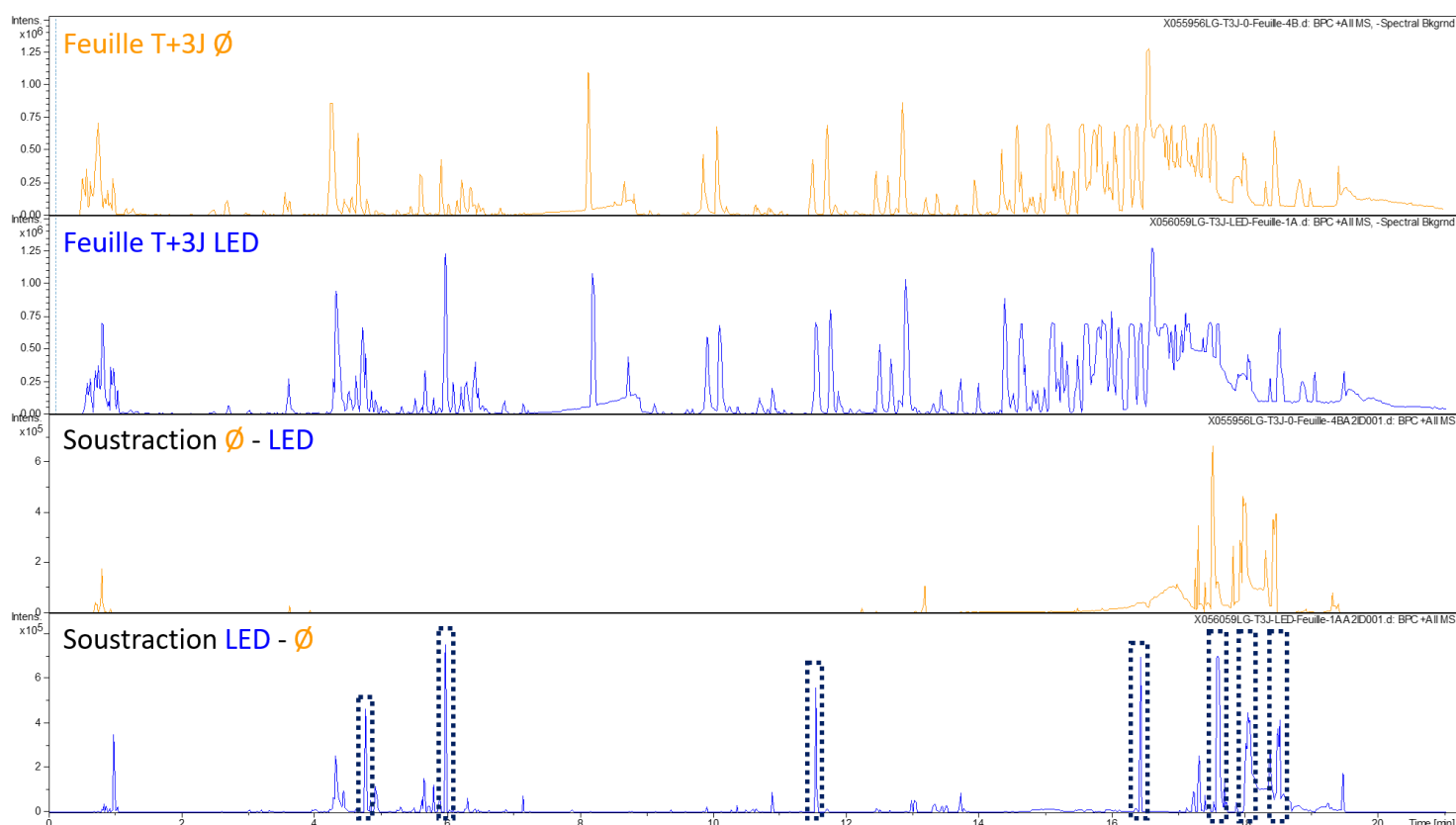
Aux vues de ces résultats et des différences observées entre les temps d'élicitation, la lumière utilisée et l'organe analysé pour la capacité des extraits à protéger les cellules contre les ROS nous avons voulu tenter de déterminer et d'identifier les molécules qui pouvaient être à l'origine de cette capacité observée pour certains de nos extraits.

#### **4.2.2 Identification des molécules responsables de la capacité de protection des kératinocytes contre les ROS**

Dans le but d'identifier les molécules responsables dans nos extraits de la capacité de protection des cellules de kératinocytes contre les ROS *in vitro*, nous allons comparer certains de nos extraits deux à deux comme dans la partie sur l'activité anti-tyrosinase ci-dessus. Pour cette comparaison, le logiciel MetaboliteDetect de l'entreprise Bruker sera de nouveau utilisé afin de permettre la soustraction des chromatogrammes des extraits que nous aurons choisis. Nous allons dans un premier temps nous attarder sur les différences observées lors de l'étude sur la cytotoxicité de nos extraits puis nous comparerons les extraits par rapport aux observations réalisées sur l'analyse de protection des cellules de kératinocytes contre les ROS.

#### 4.2.2.1 Molécules impliquées dans la cytotoxicité des extraits et sa diminution observée en présence des extraits sous lumière bleue

Comme nous avons pu le voir précédemment, l'ensemble de nos extraits était bien toléré par les cellules de kératinocytes car peu voire pas cytotoxiques. Certains extraits et notamment de feuilles pouvaient en revanche présenter un effet cytotoxique sur ces cellules mais uniquement à forte concentration. Cependant nous avons pu remarquer pour les extraits échantillonnés à 3 et 5 jours de culture et à une concentration de 250 µg/mL un effet bénéfique de l'élicitation sous lumière bleue qui permettait de diminuer la cytotoxicité des extraits en comparaison des extraits des plants cultivés uniquement à la lumière naturelle. Les différences étant plus marquantes à 3 jours de culture, nous avons dans un premier temps souhaité comparer ces extraits de feuilles échantillonnés à 3 jours de culture et ayant été cultivés à la lumière naturelle ou sous lumière bleue. Les résultats des comparaisons sont présentés à la **Figure III-25**.

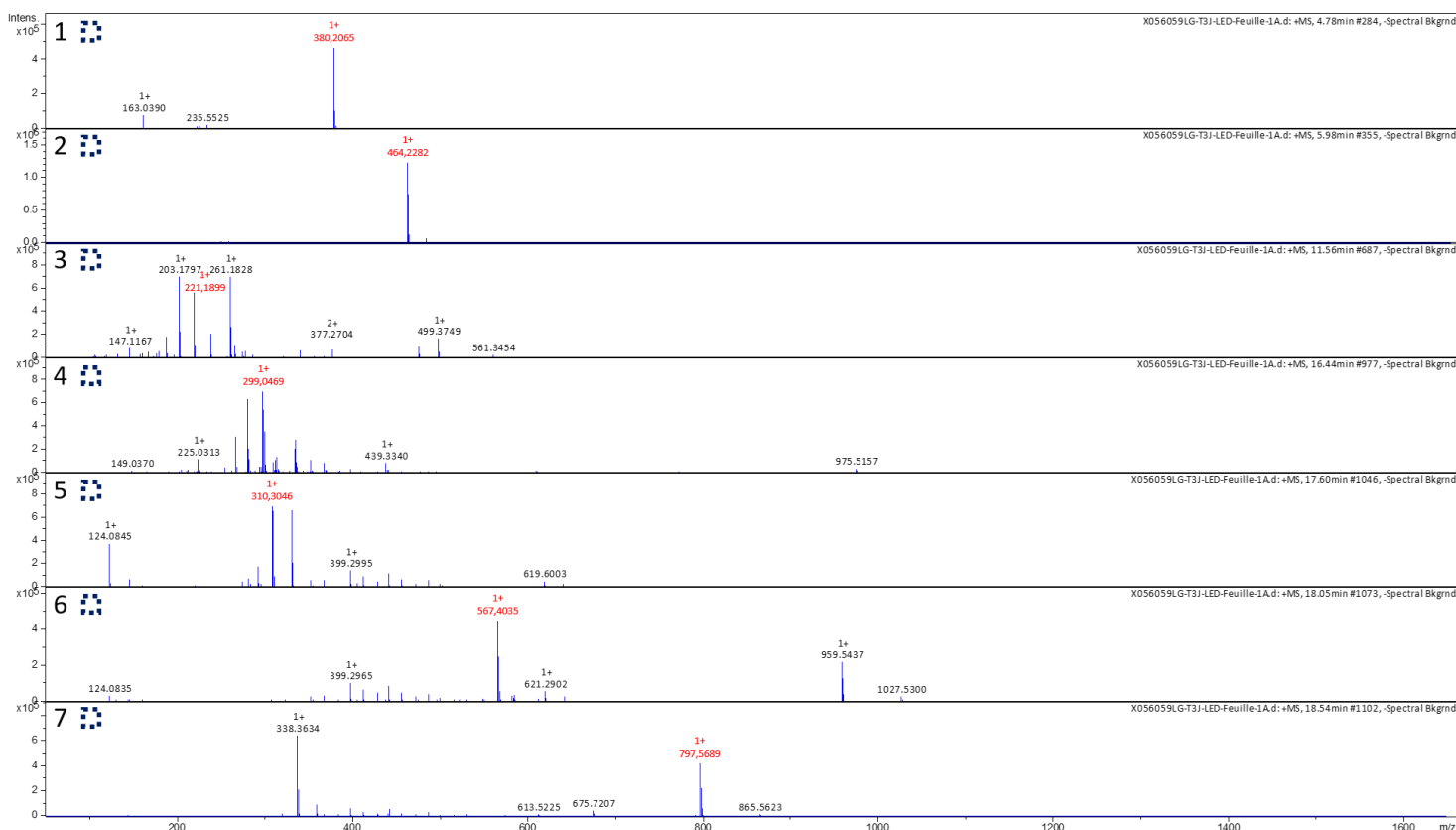


**Figure III-25** : Chromatogrammes des extraits de feuilles de bardane, cultivée en hydroponie active sous lumière naturelle (Ø) ou sous lumière bleue (LED) et échantillonnés à 3 jours de culture obtenus par ESI-QTOF-MS et soustractions des chromatogrammes réalisées par le logiciel MetaboliteDetect

Sur ces comparaisons, nous observons que l'extrait sous lumière bleue (LED) est plus riche en composés que l'extrait à la lumière naturelle (Ø) car le chromatogramme de la soustraction LED - Ø comporte plus de pics que celui de la soustraction Ø - LED qui en comporte très peu. Sur la seconde soustraction on remarque également 7 pics intenses encadrés en bleu correspondant à des molécules spécifiques à l'extrait de feuilles élicité sous lumière bleue. Lors de l'analyse de la cytotoxicité de nos



extraits sur cellules de kératinocytes, nous avons pu constater une diminution de la toxicité à forte concentration pour l'extrait obtenu après élicitation à la lumière bleue en comparaison de l'extrait à la lumière naturelle (cf. **Figure III-23.B**). Dans ce contexte, les pics intenses spécifiques à l'extrait sous lumière bleue mis en évidence et encadrés en **bleu** pourraient être les molécules responsables de cet effet observé à fortes concentrations. La **Figure III-26** regroupe les spectres de masse de ces pics chromatographiques indiqués précédemment par des encadrés **bleus**. Sur ces spectres de masse, nous avons relevés en **rouge** les ions qui sont le résultat des soustractions présentées à la **Figure III-25**.



**Figure III-26** : Spectres de masse des 7 pics chromatographiques mis en évidence à la figure précédente par des encadrés **bleus** et potentiellement responsables de la diminution de la toxicité de l'extrait de feuilles de bardane à la lumière bleue (LED) vis-à-vis des cellules de kératinocytes, en comparaison de l'extrait de feuilles à la lumière naturelle au même temps d'échantillonnage, avec en **rouge** les ions résultats des soustractions

Dans le but d'identifier ces ions, nous avons comme précédemment cherché au sein de la base de données LOTUS si ces ions avaient déjà été décrits dans la plante étudiée, en partant de notre hypothèse que ces ions sont soit sous forme  $[M+H]^+$  ou sous forme  $[M+Na]^+$ . Malheureusement pour ces sept ions, aucune correspondance n'a été trouvée dans la base de données LOTUS. Pour identifier ces sept pics nous allons alors nous appuyer sur les spectres de fragmentation MS/MS de ces ions ainsi que sur les propositions de formules brutes de l'outil Smart Formula. Le **Tableau III-4** rassemble ainsi les propositions de formules brutes pour la forme  $[M+H]^+$  et les propositions d'identifications pour ces sept ions.

**Tableau III-4** : Propositions de formules brutes de l'outil Smart Formula pour la forme  $[M+H]^+$  et propositions d'identification des bases de données Metlin et MassBank à partir des spectres de fragmentation MS/MS pour les sept ions potentiellement responsables de la diminution de la cytotoxicité observée avec les extraits de bardane cultivée en hydroponie active sous lumière bleue

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Propositions de formules brutes obtenues pour la forme $[M+H]^+$ avec l'outil Smart Formula	Propositions d'identifications à partir des fragmentations MS/MS	
				Propositions de Metlin	Propositions de MassBank
1	4,78	380,2065	$C_{20}H_{29}NO_6$	Pas de proposition	Imidacloprid-urea $C_9H_{10}ClN_3O$
			$C_{17}H_{21}N_{11}$		Plumericin $C_{15}H_{14}O_6$
			$C_{21}H_{25}N_5O_2$		Pyriproxyfen $C_{20}H_{19}NO_3$
			$C_{21}H_{33}NOS_2$		Tramadol $C_{16}H_{25}NO_2$
					Pethoxamid $C_{16}H_{22}ClNO_2$
2	5,98	464,2282		Pas de proposition	Imidacloprid-guanidine $C_9H_{11}ClN_4$
					Brefeldin-A $C_{16}H_{24}O_4$
					Eleutherol $C_{14}H_{12}O_4$
					Propanolol $C_{16}H_{21}NO_2$
					Isoplumericine $C_{15}H_{14}O_6$
			$C_{25}H_{37}NO_3S_2$		Imidacloprid-urea $C_9H_{10}ClN_3O$
			$C_{25}H_{29}N_5O_4$		Plumericin $C_{15}H_{14}O_6$
			$C_{18}H_{37}N_7OS_3$		Pyriproxyfen $C_{20}H_{19}NO_3$
			$C_{24}H_{33}NO_8$		Napropamide $C_{17}H_{21}NO_2$
			$C_{18}H_{29}N_{11}O_2S$		Taurodeoxycholate $C_{26}H_{45}NO_6S$
			$C_{17}H_{33}N_7O_6S$		Eleutherol $C_{14}H_{12}O_4$
			$C_{14}H_{25}N_{17}S$		Propanolol $C_{16}H_{21}NO_2$
			$C_{21}H_{25}N_{11}O_2$		Pethoxamid $C_{16}H_{22}ClNO_2$
			$C_{16}H_{37}N_3O_{10}S$		Taurochenodeoxycholate $C_{24}H_{45}NO_6S$
			$C_{10}H_{25}N_{17}O_5$		Brefeldin-A $C_{16}H_{24}O_4$

Suite **Tableau III-4**

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+H] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula	Propositions d'identifications à partir des fragmentations MS/MS	
				Propositions de Metlin	Propositions de MassBank
3	11,56	221,1899	<b>C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O</b>	<b>Farnesal C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O</b>	Coniferyl aldehyde C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>
					4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
					3,4-Dimethoxycinnamic acid C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
					Maslinic acid C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>
					Carbazochrome sulfonate C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S
4	16,44	299,0469	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> S <sub>3</sub>	Pas de fragmentation disponible	
			C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> S <sub>4</sub>		
			C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S		
			C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> N <sub>8</sub> OS		
			C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>		
			C <sub>18</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		
			C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub>		
5	17,60	310,3046	Pas de proposition de formule brute	<b>Oleoyl Ethyl Amide C<sub>20</sub>H<sub>39</sub>NO</b>	Erucamide C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> NO
					delta-undecalactone C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
					gamma-dodecalactone C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>
					gamma-undecalacton C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
					delta-tridecalactone C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
					delta-decalactone C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
					gamma-decalactone C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
					boldenon-undecylenate C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>
					delta-dodecalactone C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>
					N,N-Diethyl-3-methoxybenzamide C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>


Suite **Tableau III-4**

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	<i>m/z</i>	Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+H] <sup>+</sup> avec l'outil Smart  Formula	Propositions d'identifications à partir des fragmentations MS/MS	
				Propositions de Metlin	Propositions de MassBank
6	18,05	567,4035	C <sub>40</sub> H <sub>54</sub> S	Pas de proposition	Bufalin C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>
			C <sub>37</sub> H <sub>58</sub> S <sub>2</sub>		Lycopene-5,6-diol C <sub>40</sub> H <sub>58</sub> O <sub>2</sub>
			C <sub>36</sub> H <sub>54</sub> O <sub>5</sub>		Zeaxanthin C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub>
			C <sub>32</sub> H <sub>50</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>		Taurocholate C <sub>26</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>7</sub> S
			C <sub>29</sub> H <sub>62</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>3</sub>		4-androstene-3,17-dione C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>
			C <sub>29</sub> H <sub>54</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S		Testosterone C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
			C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S		Cyclopamine C <sub>27</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>2</sub>
			C <sub>25</sub> H <sub>50</sub> N <sub>12</sub> OS		Hydrocortisone C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>
			C <sub>25</sub> H <sub>58</sub> N <sub>8</sub> S <sub>3</sub>		4,4'-diaponeurosporene C <sub>30</sub> H <sub>42</sub>
7	18,54	797,5689	C <sub>21</sub> H <sub>50</sub> N <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Pas de proposition	17 alpha-hydroprogesterone C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>
			C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>		Bacopaside II C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>
			C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>		Asiaticoside C <sub>48</sub> H <sub>78</sub> O <sub>19</sub>
			C <sub>49</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub>		Soyasaponin BB C <sub>48</sub> H <sub>78</sub> O <sub>18</sub>
			C <sub>41</sub> H <sub>72</sub> N <sub>12</sub> O <sub>2</sub> S		Chrysanthellin B C <sub>58</sub> H <sub>94</sub> O <sub>26</sub>
			C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S		Bacoside A3 C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>
			C <sub>48</sub> H <sub>80</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>		Hederacoside C C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>26</sub>
			C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> OS		Soyasaponin Ba C <sub>48</sub> H <sub>78</sub> O <sub>19</sub>
			C <sub>41</sub> H <sub>80</sub> N <sub>8</sub> OS <sub>3</sub>		Soyasapogenol B base + O-HexA-pen-Hex, O-Hex C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>23</sub>
			C <sub>41</sub> H <sub>88</sub> N <sub>4</sub> S <sub>5</sub>		Torulene C <sub>40</sub> H <sub>54</sub>
					Ginsenoside F1 C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>9</sub>

Comme précédemment et pour plus de simplicité, les propositions de formules brutes pour la forme [M+Na]<sup>+</sup> ainsi que les énergies de collision utilisées et les ions fragments MS/MS obtenus, avec leur *m/z* et leur intensité, sont présentés à l'**Annexe 2**.

Pour tous ces ions, excepté l'ion à  $m/z$  299,0469 pour lequel aucun ion fragment n'a pu être observé, les spectres de fragmentation MS/MS ont permis d'émettre des propositions d'identification après soumission dans les bases de données Metlin et MassBank. Cependant, pour cinq de ces ions aucune des propositions d'identification ne correspond à une proposition de formules brutes émises par l'outil Smart Formula pour la forme  $[M+H]^+$ . Pour ces cinq ions, on ne peut donc pas conclure sur leur identification. Pour l'ion à  $m/z$  221,1899 en revanche, la proposition de formule brute pour la forme  $[M+H]^+$  de Smart Formula  $C_{15}H_{24}O$  correspond à la proposition d'identification de la base de données Metlin à partir du spectre de fragmentation (Figure III-27) qui est le farnesal (Figure III-28.A), un sesquiterpène. Cette molécule résulte de l'oxydation du farnesol catalysée par la farnesol déshydrogénase et intervient dans la voie de biosynthèse de l'hormone juvénile III (Figure III-28.B). Cette voie de biosynthèse est généralement retrouvée chez les insectes où l'hormone juvénile III est capitale dans la régulation de processus physiologiques critiques comme la métamorphose ou la reproduction. Le farnesal ainsi que l'hormone juvénile III sont également présents dans certaines plantes comme respectivement par exemple la patate douce (*Ipomea batatas*) et une espèce de carex (*Cyperus iria*) (Satyaveanthan et al. 2021). Au sein des plantes on attribue à l'hormone juvénile III un rôle dans les mécanismes de défense de la plante contre les herbivores ou encore dans les interactions plante-insecte ou plante-plante (Toong et al. 1988, Bede et al. 1998).



Figure III-27 : Exemple de spectre de masse MS en bleu au temps de rétention 11,56 min avec l'ion à  $m/z$  221,1899 symbolisé par un  et du spectre de fragmentation MS/MS de l'ion à  $m/z$  221,1899 en bleu ciel

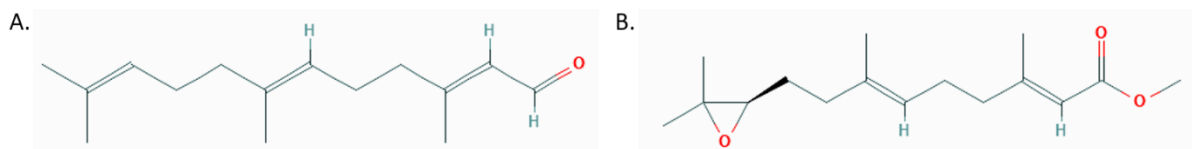


Figure III-28 : Structures chimiques du farnésal (A) et de l'hormone juvénile III (B)

Pour l'ion à  $m/z$  299,0469 plusieurs propositions de formule brute nous ont apporté une ou des correspondances en particulier sur la base de données Metlin, cependant en absence de spectre de fragmentation nous ne pouvons statuer sur l'identification de cet ion.

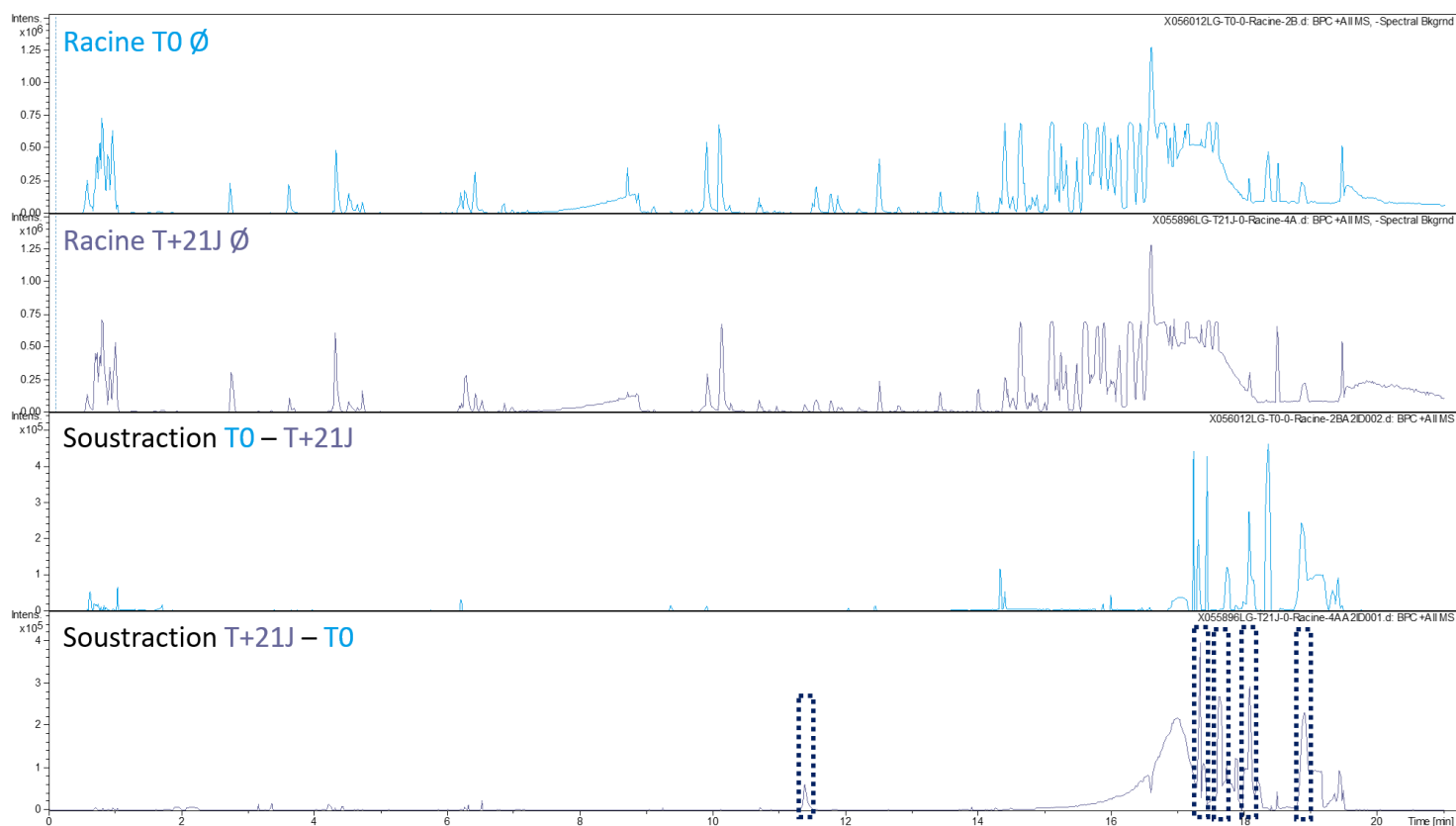
Après avoir comparé ces extraits et avoir pu émettre des propositions de formules brutes pour ces ions potentiellement responsables de la diminution de la cytotoxicité observée entre les extraits à la lumière bleue et ceux à la lumière naturelle après 3 jours d'éllicitation lumineuse, nous allons maintenant étudier les phénomènes d'augmentation de la capacité de protection des kératinocytes de nos extraits contre les ROS.

#### 4.2.2.2 Molécules impliquées dans l'augmentation de la capacité de protection contre les ROS au cours du temps de culture

Dans un premier temps, nous allons nous focaliser sur l'augmentation de la capacité de protection contre les ROS observée au cours du temps de culture. En effet qu'importe l'organe étudié, racines ou feuilles, nous avons pu observer une augmentation de cette capacité de protection contre les ROS au cours de l'expérience d'éllicitation lumineuse (cf. Figure III-24). Cette observation a été réalisée pour les feuilles dans les deux conditions d'éclairage et dans le cas des racines seulement pour les plants de bardane cultivés uniquement à la lumière naturelle. Afin d'étudier cette augmentation au cours du temps et sachant que les différences sont les plus marquées pour les extraits provenant de la culture à la lumière naturelle seule, nous avons choisi de comparer les extraits échantillonnés au départ (T0) et à la fin (T+21J) de la culture en condition de lumière naturelle. De plus, ces comparaisons seront réalisées à la fois dans les extraits de racines et dans les extraits de feuilles.

##### i) Étude dans les racines

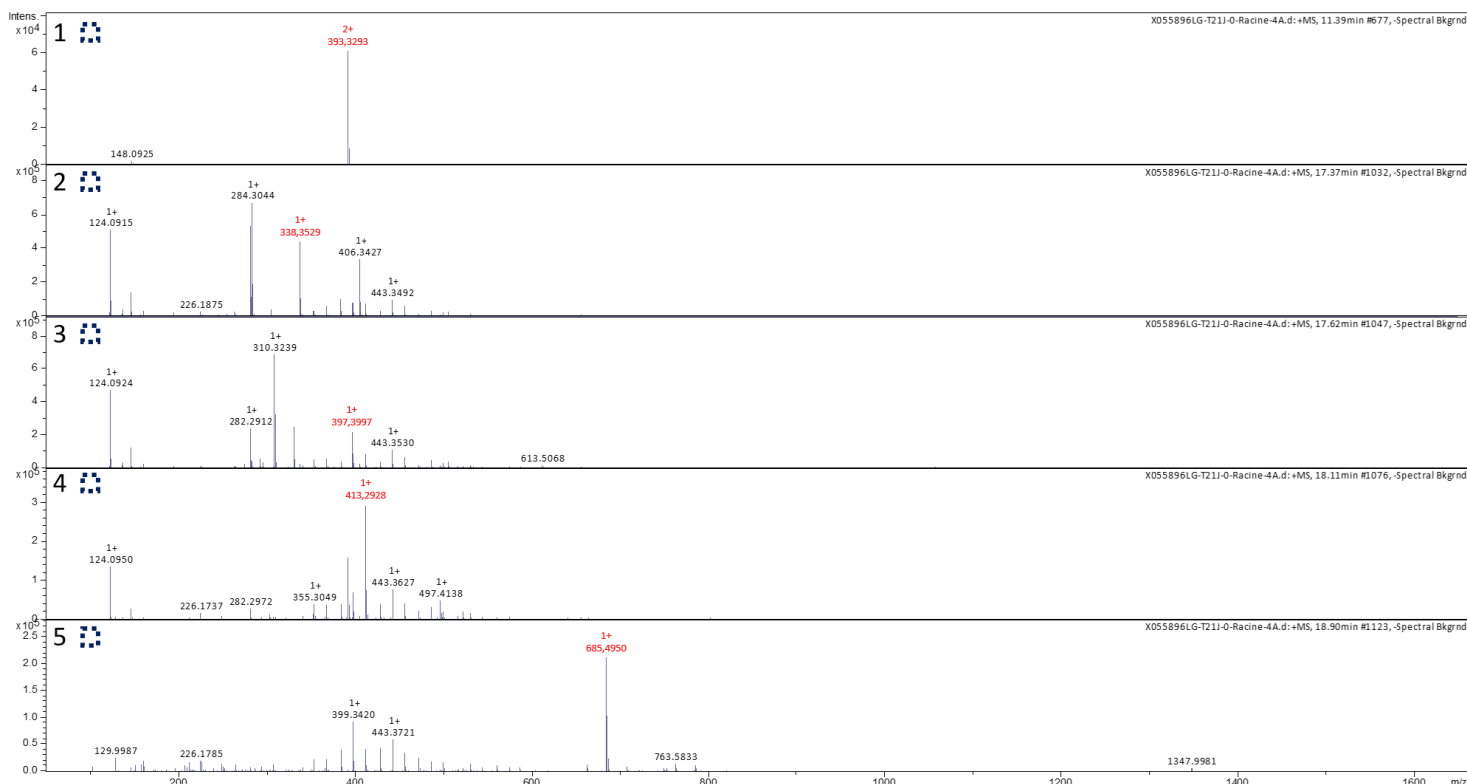
Concernant les extraits de racines de bardane issue de la culture en hydroponie active à la lumière naturelle, les comparaisons entre les extraits échantillonnés à T0 et à T+21J sont présentées à la Figure III-29.



**Figure III-29 :** Chromatogrammes des extraits de racines de bardane, cultivée en hydroponie active sous lumière naturelle (Ø) et échantillonnés au début (T0) ou après 21 jours de culture (T+21J) obtenus par ESI-QTOF-MS et soustraction des chromatogrammes réalisées par le logiciel MetaboliteDetect

Ces soustractions nous permettent de voir que les deux extraits de racines à la lumière naturelle (Ø) échantillonnés au début de l'expérience et après 21 jours de culture sont quasiment aussi riches l'un que l'autre. Lors de cette étude, les molécules sur lesquelles se portent notre intérêt sont les molécules spécifiques à l'extrait de racines échantillonné à 21 jours de culture. En effet, lors de l'analyse de la protection des kératinocytes contre les ROS l'extrait de racines après 21 jours de culture présentait une plus forte capacité de protection que l'extrait de racines échantillonné au début de la culture (cf. **Figure III-24.A**). De ce fait, les molécules spécifiques à l'extrait à 21 jours de culture pourraient être celles responsables de cette augmentation de la protection contre les ROS avec le temps, au cours de la culture.

Ainsi cinq pics chromatographiques spécifiques à l'extrait après 21 jours de culture ont pu être mis en évidence par des encadrés bleus. La **Figure III-30** regroupe les spectres de masses de ces cinq pics chromatographiques, les ions notés en rouge sont ceux restant après la soustraction des chromatogrammes.

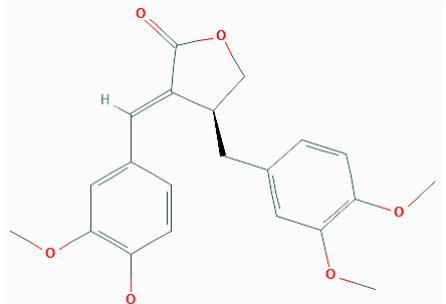
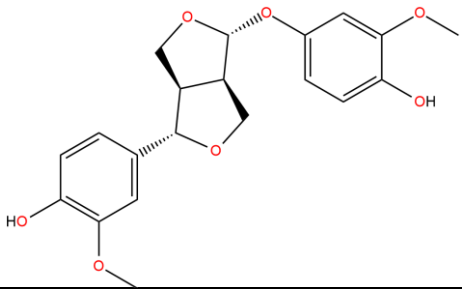
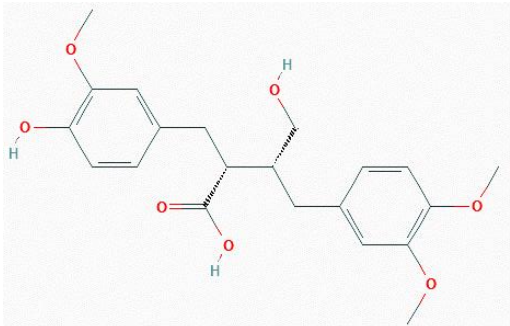


**Figure III-30** : Spectres de masse des 5 pics chromatographiques mis en évidence à la figure précédente par des encadrés bleus et potentiellement responsables de l'augmentation de la protection des kératinocytes contre les ROS observée entre l'extrait de racines au début de la culture et l'extrait de racines après 21 jours de culture sous lumière naturelle, avec en rouge les ions résultats des soustractions

Afin d'identifier ces cinq ions, nous avons recherché des correspondances dans la base de données LOTUS. Le **Tableau III-5** regroupe les résultats d'identification de ces cinq ions après recherche dans la base de données.



**Tableau III-5 :** Tableau regroupant les résultats d'identification après recherches dans la base de données LOTUS pour les cinq ions d'intérêts

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Résultats trouvés sur la base de données LOTUS		
			Masse monoisotopique (Da)	Formule brute	Nom et Structure chimique
1	11,39	393,3293	370,14164	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	(3E,4S)-4-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-3-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylidene]oxolan-2-one 
2	17,37	338,3529	Pas de correspondance dans la base de données pour les formes [M+H] <sup>+</sup> et [M+Na] <sup>+</sup>		
3	17,62	397,3997	374,136555	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	4-[(1s,3ar,4r,6ar)-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenoxy)-hexahydrofuro[3,4-c]furan-1-yl]-2-methoxyphenol 
4	18,11	413,2928	390,167855	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>	Acide arctigénique 
5	18,90	685,4950	Pas de correspondance dans la base de données pour les formes [M+H] <sup>+</sup> et [M+Na] <sup>+</sup>		

Grâce à cette base de données LOTUS, nous avons pu proposer une identification pour les ions à  $m/z$  393,3293,  $m/z$  397,1365 et  $m/z$  413,2938 qui seraient tous trois sous forme  $[M+Na]^+$ .

Pour l'ion à  $m/z$  393,3293 nous serions en présence de la molécule (3E,4S)-4-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-3-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylidene]oxolan-2-one qui a été décrite dans la bardane, *Arctium lappa* L., lors d'une étude sur les effets antiprolifératifs et apoptotiques sur des cellules leucémiques des lignanes butyrolactones extraites d'*Arctium lappa* L. (Matsumoto et al. 2006) et possède une structure proche de celle de la (+)-7,8-didehydroarctigenin, aussi appelée carthamogenin.

Pour l'ion à  $m/z$  397,3997, la base de données LOTUS nous donne comme correspondance la molécule ayant pour nom IUPAC 4-[(1s,3ar,4r,6ar)-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenoxy)-hexahydrofuro[3,4-c]furan-1-yl]-2-methoxyphenol. Cette molécule possède une structure proche de celle du pinorésinol, un lignane retrouvé par exemple dans les graines de lin (*Linum usitatissimum* L.) et de sésame (*Sesamum indicum*) (During et al. 2012) et qui possède de nombreuses propriétés biologiques telles que le piégeage des radicaux libres, une activité antitumoral notamment contre les tumeurs du sein, une activité anti-inflammatoire par l'inhibition du monoxyde d'azote (NO) et des médiateurs de l'inflammation ainsi que des effets antifongiques, neuroprotecteurs et hypoglycémiant (López-Biedma et al. 2016).

L'ion à  $m/z$  413,2928 correspondrait quant à lui à l'acide arctigénique d'après la base de données LOTUS. L'acide arctigénique a été isolé à partir des exsudats de graines de bardane (*Arctium lappa* L.) en germination et posséderait un rôle important dans l'allélopathie stimulatrice des graines de bardane pendant le stade de germination des graines (Higashinakasu et al. 2005). L'acide arctigénique semble également être la molécule responsable de l'activité anti-diabétique d'*Arctium lappa* L. après des études réalisées chez des rats Goto-Kakizaki, un modèle de rats non obèse avec un diabète de type 2 spontané couramment employé pour évaluer le développement du diabète de type 2 et ses complications (Xu et al. 2015).

Pour les deux autres ions à  $m/z$  338,3529 et  $m/z$  685,4950, nous n'avons pu trouver aucune correspondance dans la base de données.

Afin d'identifier les deux ions pour lesquels aucune correspondance n'a pu être trouvée dans la base de données LOTUS, nous allons utiliser les spectres de fragmentation MS/MS réalisés à des énergies de collision de 25, 35 et 45 eV ainsi que l'outil Smart Formula de DataAnalysis qui va permettre de proposer des formules brutes. Les spectres de fragmentations ainsi que les propositions de formules brutes pour chacun de ces deux ions sont rassemblés au **Tableau III-6**. Les propositions de formule brute pour la forme  $[M+Na]^+$  ainsi que les énergies de collision utilisées et les ions fragments MS/MS obtenus, avec leur  $m/z$  et leur intensité, sont quant à eux présentés à l'**Annexe 3**.

**Tableau III-6** : Propositions de formules brutes de l'outil Smart Formula pour la forme  $[M+H]^+$  et propositions d'identification des bases de données Metlin et MassBank à partir des spectres de fragmentation MS/MS pour les deux ions potentiellement responsables de l'augmentation de la protection des kératinocytes contre les ROS au cours du temps de culture dans les racines et pour lesquels aucune correspondance n'a été trouvé dans la base de données LOTUS

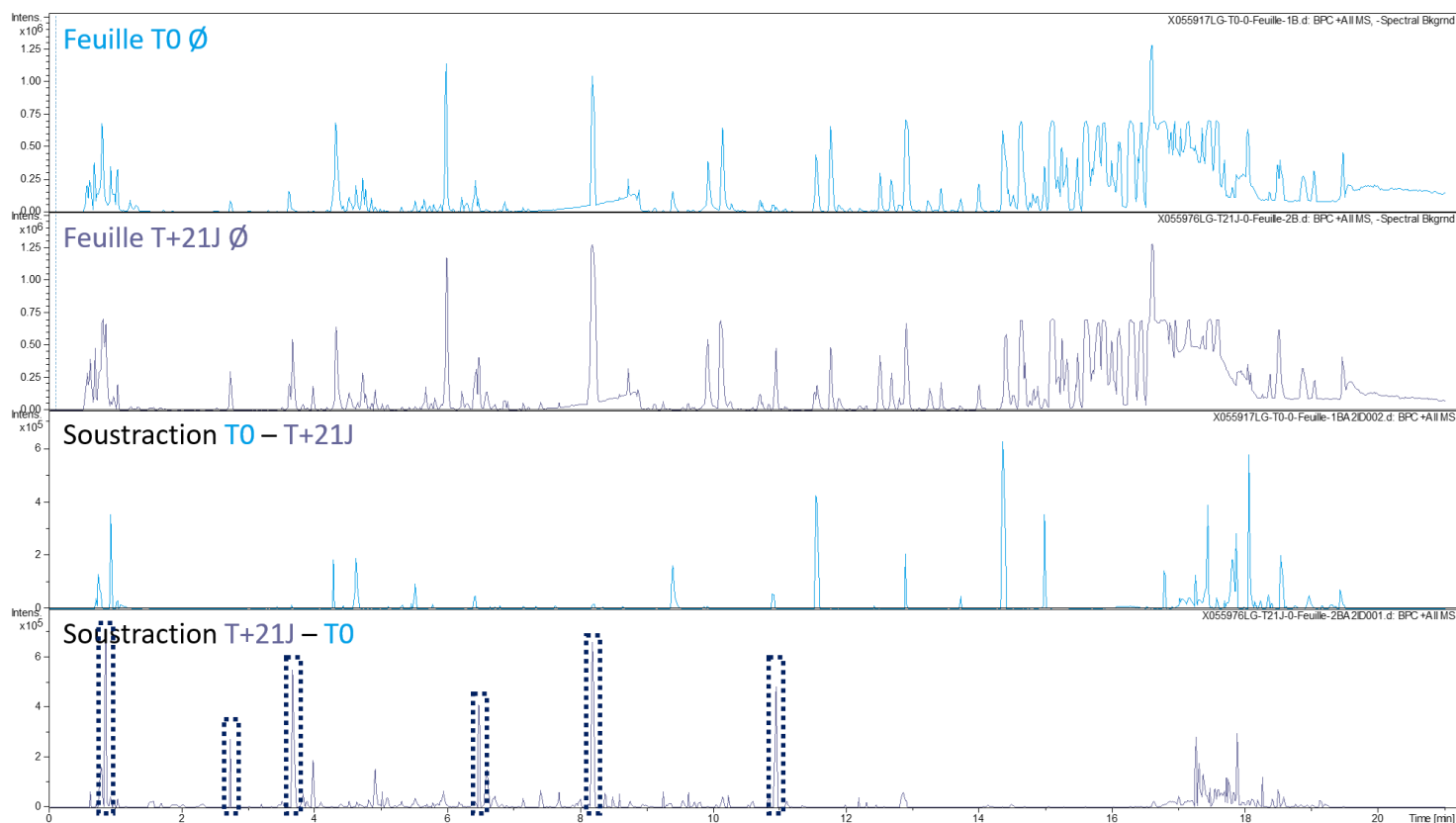
Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Propositions de formules brutes obtenues pour la forme $[M+H]^+$ avec l'outil Smart Formula	Propositions d'identifications à partir des fragmentations MS/MS	
				Propositions de Metlin	Propositions de MassBank
2	17,37	338,3529	$C_{21}H_{43}N_3$	Pas de proposition	Canrenone $C_{22}H_{38}O_3$
					Glycolithocholic acid $C_{26}H_{43}NO_4$
					Prednisone $C_{21}H_{26}O_5$
					Taurolithocholate $C_{26}H_{45}NO_5S$
					Cymarine $C_{30}H_{44}O_9$
					Desonide $C_{24}H_{32}O_6$
					Lithocholenic acid $C_{24}H_{38}O_3$
					Budesonide $C_{25}H_{34}O_6$
					Fluticasone propionate $C_{25}H_{31}F_3O_5S$
5	18,90	685,4950	$C_{44}H_{64}N_2O_4$	Pas de proposition	Neriifolin $C_{30}H_{46}O_8$
			$C_{45}H_{60}N_6$		
			$C_{37}H_{64}N_8O_2S$		Subsessiline $C_{43}H_{48}N_4O_6$
			$C_{36}H_{68}N_4O_6S$		Azadirachtin $C_{35}H_{44}O_1$
			$C_{37}H_{72}N_4OS_3$		

Pour ces deux ions à  $m/z$  338,3529 et  $m/z$  685,4950 les spectres de fragmentation nous ont permis après soumission dans la base de données MassBank d'émettre des propositions d'identification. Cependant, aucune proposition d'identification pour ces deux ions ne concorde avec une proposition de formule brute pour la forme  $[M+H]^+$ . Pour ces ions, on ne dispose donc que de propositions d'identification tandis que pour les trois autres ions à  $m/z$  393,3293,  $m/z$  397,3997 et  $m/z$  413,2928 grâce à la base de données LOTUS nous disposons d'une identification pour chacun de ces ions.

Les mêmes observations sur l'augmentation de la protection des kératinocytes contre les ROS ont été faites sur les extraits de feuilles.

### ii) Étude dans les feuilles

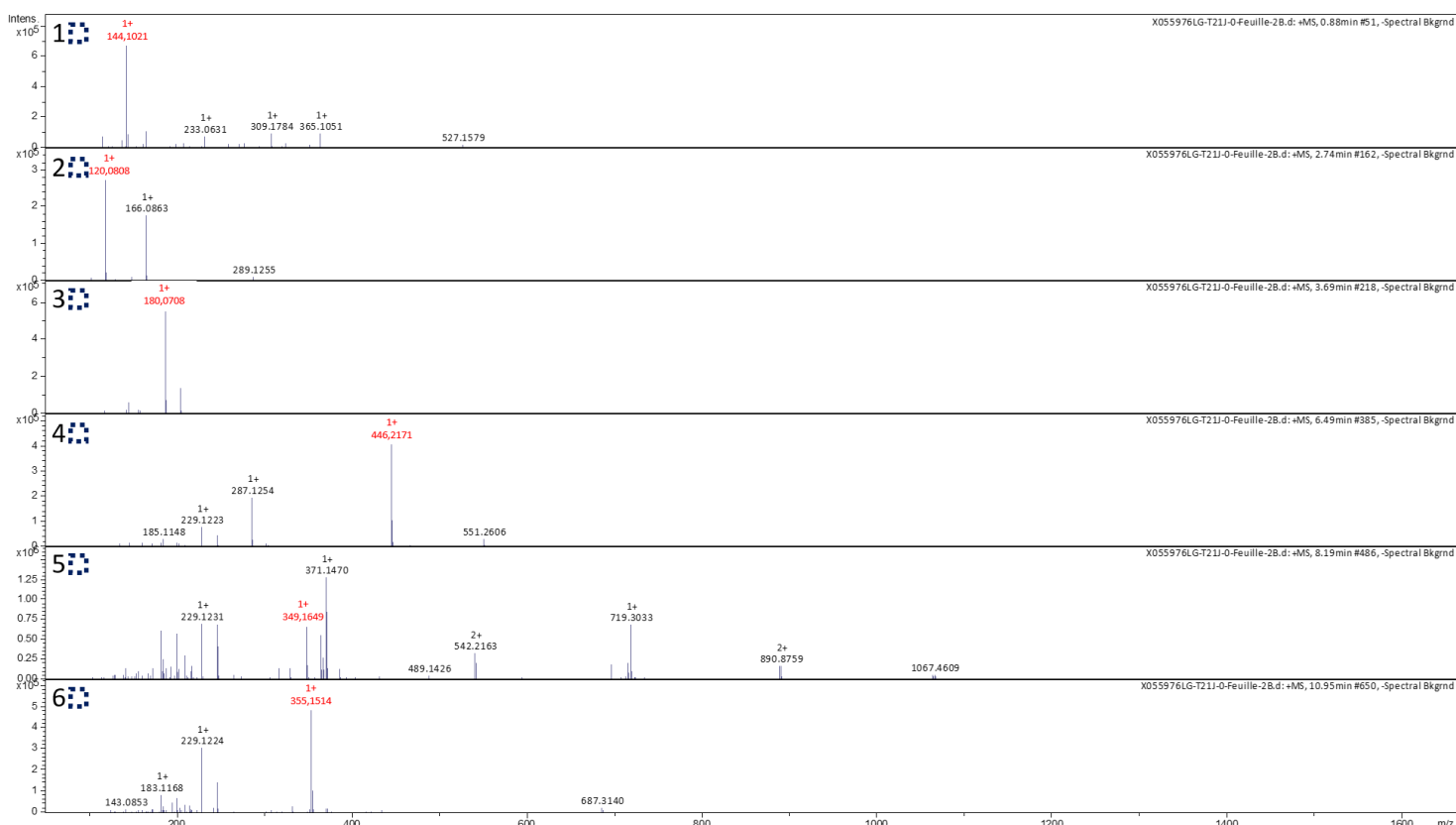
Les mêmes comparaisons que pour les racines ont cette fois-ci été réalisées pour les extraits de feuilles de bardane (**Figure III-31**).



**Figure III-31** : Chromatogrammes des extraits de feuilles de bardane, cultivée en hydroponie active sous lumière naturelle (Ø) et échantillonnés soit au départ de la culture (T0) soit après 21 jours de culture (T+21J) obtenus par ESI-QTOF-MS et soustractions des chromatogrammes réalisées par MetaboliteDetect

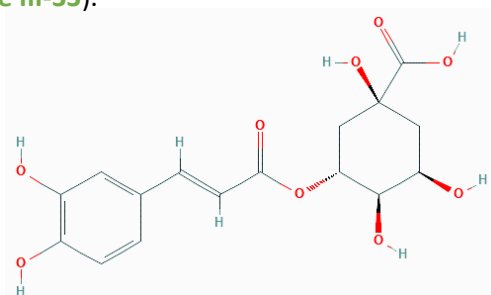
Comme à l'étude précédente sur les extraits de racines, les soustractions réalisées entre les extraits de feuilles à la lumière naturelle (Ø) échantillonnés au début de la culture ou après 21 jours sont quasiment identiques du point de vue de la richesse des pics. Lors de l'analyse de la protection des kératinocytes face aux ROS, l'extrait de feuilles échantillonné après 21 jours de culture possédait

une plus grande capacité de protection que l'extrait de feuilles échantillonné au **début** de la culture (cf. **Figure III-24.B**). C'est pourquoi lors de ces soustractions, les molécules nous intéressant sont celles spécifiques à l'extrait échantillonné à **21 jours** de culture car elles pourraient être celles responsables de cette augmentation de protection au cours de la culture. Nous avons ainsi pu mettre en évidence et encadrés en **bleu** six pics chromatographiques. Les spectres de masses de ces six pics chromatographiques sont regroupés à la **Figure III-32** avec en **rouge** les ions résultant de la soustraction entre les chromatogrammes.



**Figure III-32** : Spectres de masse des 6 pics chromatographiques mis en évidence à la figure précédente par des encadrés bleus et potentiellement responsables de l'augmentation de la protection des kératinocytes contre les ROS observée entre l'extrait de feuilles au début de la culture et l'extrait de feuilles après 21 jours de culture sous lumière naturelle, avec en rouge les ions résultats des soustractions

Pour identifier ces six ions, nous avons recherché des correspondances dans la base de données LOTUS. Malheureusement sur les six ions recherchés, une seule correspondance a pu être trouvée dans la base de données pour le sixième ion, l'ion à  $m/z$  355,1514. Cet ion était sous forme  $[M+H]^+$  et correspondrait à l'acide chlorogénique ayant pour masse monoisotopique 354,3094 Da et pour formule brute  $C_{16}H_{18}O_9$  (**Figure III-33**).



**Figure III-33** : Structure chimique de l'acide chlorogénique

Pour identifier les ions pour lesquels nous n'avons pas pu trouver de correspondance dans la base de données LOTUS, les spectres de fragmentations MS/MS réalisés à différentes énergies de collision et l'outil Smart Formula seront utilisés. Le **Tableau III-7** regroupe les fragmentations et les propositions de formules brutes pour la forme  $[M+H]^+$  pour les cinq ions.

**Tableau III-7** : Propositions de formules brutes pour la forme  $[M+H]^+$  de l'outil Smart Formula et propositions d'identification des bases de données Metlin et MassBank à partir des spectres de fragmentation MS/MS pour les cinq ions potentiellement responsables de l'augmentation de la protection des kératinocytes contre les ROS au cours du temps de culture dans les feuilles et pour lesquels aucune correspondance n'a été trouvé dans la base de données LOTUS

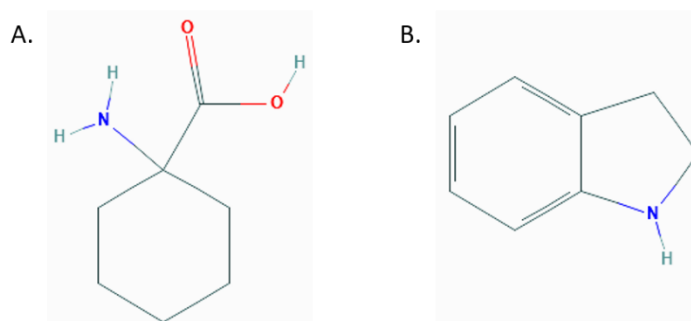
Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Propositions de formules brutes obtenues pour la forme $[M+H]^+$ avec l'outil Smart Formula	Propositions d'identifications à partir des fragmentations MS/MS	
				Propositions de Metlin	Propositions de MassBank
1	0,88	144,1021	$C_7H_{13}NO_2$	Pas de fragmentation disponible	
2	2,74	120,0808	$C_8H_9N$	Pas de fragmentation disponible	
3	3,69	188,0708	$C_{11}H_9NO_2$	Indoleacrylic acid $C_{11}H_9NO_2$ 3-amino-2-naphthoic acid $C_{11}H_9NO_2$	L-tryptophan $C_{11}H_{12}N_2O_2$ Abrine $C_{12}H_{14}N_2O_2$ Tryptophan $C_{11}H_{12}N_2O_2$ Pindolol $C_{14}H_{20}N_2O_2$ Vasicine $C_{11}H_{12}N_2O$ Etodolac $C_{17}H_{21}NO_3$ Serotonin $C_{10}H_{12}N_2O$ L-oxonoreleagine $C_{11}H_{10}N_2O$ Enalapril $C_{20}H_{28}N_2O_5$ Crotamiton $C_{13}H_{17}NO$

Suite **Tableau III-7**

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+H] <sup>+</sup> avec l’outil Smart Formula	Propositions d’identifications à partir des fragmentations MS/MS				
				Propositions de Metlin	Propositions de MassBank			
4	6,49	446,2171	C <sub>24</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>7</sub>	Pas de proposition	Nimesulide C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S			
			C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> N <sub>11</sub> O		3,3-pentamethylene-4-butyrolactam C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> NO			
			C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>		5-chlorobenzotriazole C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ClN <sub>3</sub>			
			C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub> S		1-chlorobenzotriazole C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ClN <sub>3</sub>			
			C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> N <sub>7</sub> S <sub>2</sub>		Idosfamide C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P			
			C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>2</sub> S <sub>2</sub>		Propanolol C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>			
			C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> N <sub>7</sub> S <sub>3</sub>		Chlorpropham C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> ClNO <sub>2</sub>			
			C <sub>17</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>3</sub>		Ethylbeta-carboline C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>			
					Harman C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>			
					Napropamide C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>			
5	8,19	349,1649	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Thr Thr Gln C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	4-Androstene-3,17-dione C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>			
			C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	Gln Thr Thr C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	Propanolol C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>			
			C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> OS <sub>2</sub>	Asp Ser Lys C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	Norethindrone C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>			
				Ser Lys Asp C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	Brefeldin-A C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>			
				Cys Arg Ala C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	Gestoden C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>			
				Ser Asp Lys C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	Norgestrel C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>			
				Thr Gln Thr C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	Testosterone C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>			
				Lys Ser Asp C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	Plumericin C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>			
								Pyriproxyfen C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>
								Napropamide C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>

Comme dans les cas précédents, les propositions de formule brute pour la forme  $[M+Na]^+$  ainsi que les énergies de collision utilisées et les ions fragments MS/MS obtenus, avec leur  $m/z$  et leur intensité, sont présentés à l'**Annexe 4**.

Pour deux des ions recherchés, les ions à  $m/z$  144,1021 et à  $m/z$  120,0808, nous ne possédons pas de spectres de fragmentation MS/MS seul l'outil Smart Formula va nous permettre de les identifier. Une seule proposition de formule brute a été émise pour chacun de ces ions par l'outil Smart Formula pour la forme  $[M+H]^+$ , respectivement  $C_7H_{13}NO_2$  et  $C_8H_9N$ . Après des recherches dans la base de données Metlin nous avons trouvé de nombreuses correspondances pour chacune de ces formules brutes à savoir 75 correspondances pour la formule brute  $C_7H_{13}NO_2$  parmi lesquelles par exemple la molécule 1-aminocyclohexanecarboxylic acid (**Figure III-34.A**) et 43 correspondances pour la formule brute  $C_8H_9N$  dont par exemple l'indoline (**Figure III-34.B**). Avec le grand nombre de correspondances pour chacun de ces deux ions, nous ne pouvons pas identifier avec certitude la molécule correspondant à chacun d'eux.

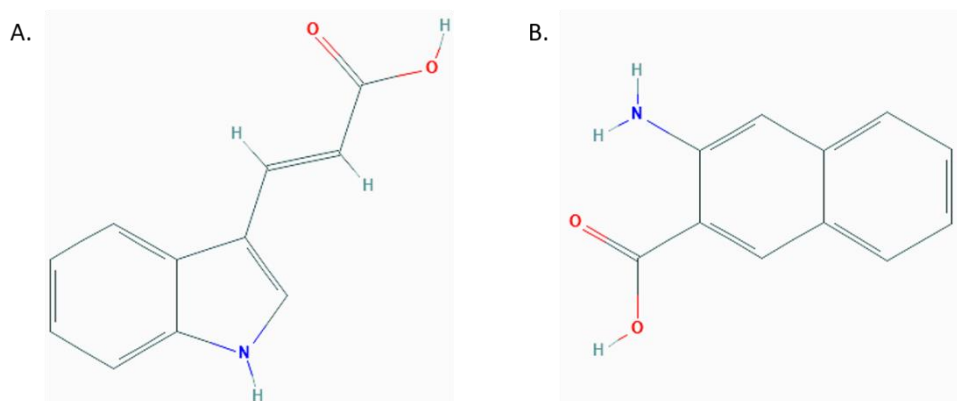


**Figure III-34** : Structures chimiques du 1-aminocyclohexanecarboxylic acid (A) et de l'indoline (B), des exemples parmi les nombreuses correspondances de leur formule brute respectivement  $C_7H_{13}NO_2$  et  $C_8H_9N$ , dans la base de données Metlin pour l'identification des ions à  $m/z$  144,1021 et  $m/z$  120,0808

Pour les trois autres ions à  $m/z$  188,0708,  $m/z$  446,2171 et  $m/z$  349,1649 nous avons pu trouver des correspondances dans les bases de données Metlin et/ou Massbank grâce aux spectres de fragmentations MS/MS. Seules les propositions d'identifications de Metlin pour l'ion à  $m/z$  188,0708 correspondaient à la proposition de formule brute de Smart Formula pour la forme  $[M+H]^+$ . Cet ion aurait donc pour formule brute  $C_{11}H_9NO_2$  et serait probablement soit l'acide indole acrylique (**Figure III-35.A**) soit l'acide 3-amino-2-naphtoïque (**Figure III-35.B**). Dans le but de déterminer entre ces deux molécules laquelle correspond à notre ion à  $m/z$  188,0708 il serait nécessaire d'étudier les standards de ces molécules dans les mêmes conditions que notre analyse.

Pour les deux ions restants, à  $m/z$  446,2171 et  $m/z$  349,1649, les spectres de fragmentations grâce aux bases de données utilisées nous ont permis d'émettre plusieurs propositions d'identifications pour ces deux ions. En revanche aucune de ces propositions d'identifications ne correspond aux propositions de formules brutes de Smart Formula pour la forme  $[M+H]^+$  de ces deux ions.





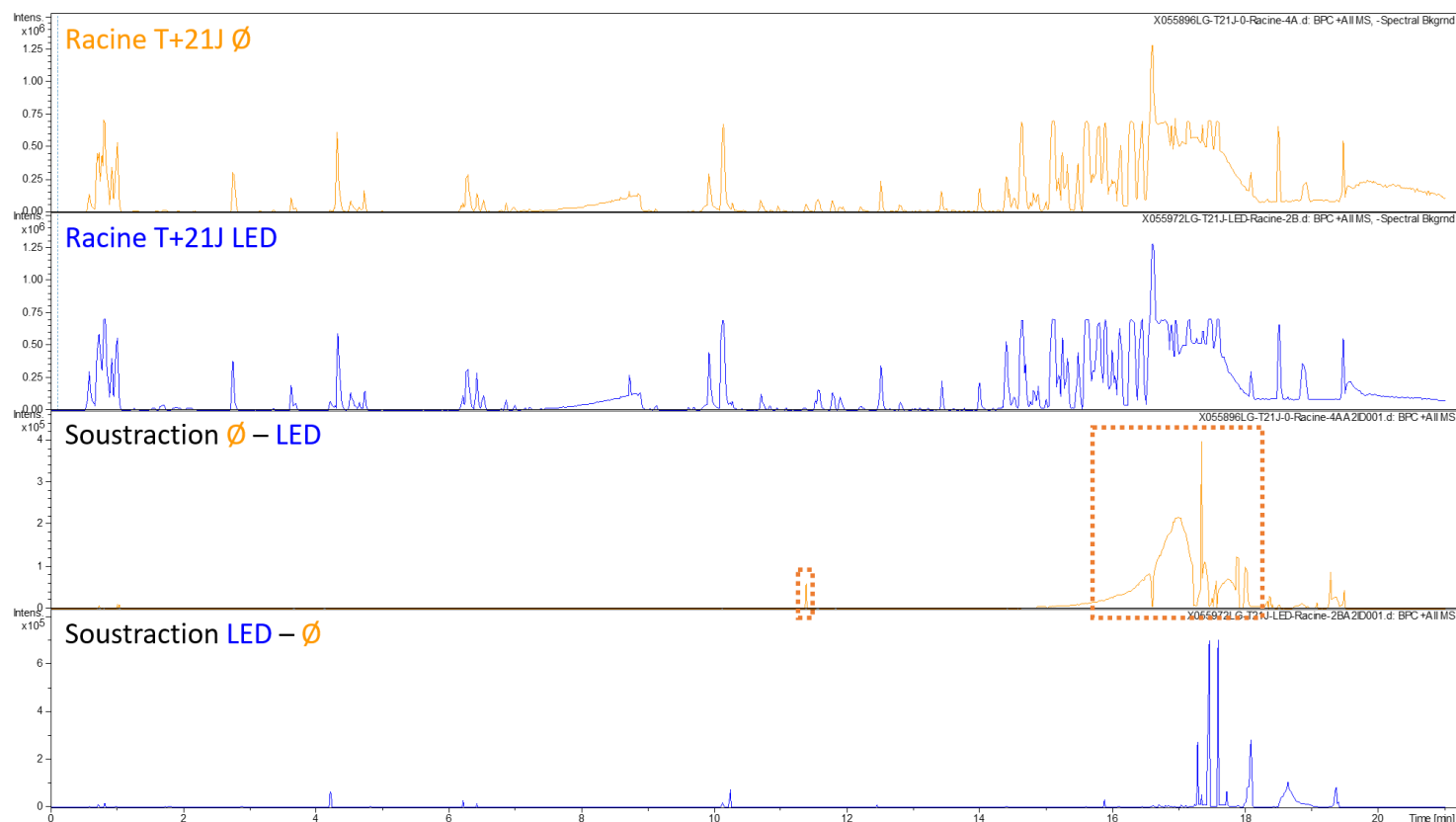
**Figure III-35** : Structures chimiques de l'acide indole acrylique (A) et de l'acide 3-amino-2-naphtoïque (B), les deux propositions d'identifications pour l'ion à  $m/z$  188,0708 fournies par la base de données Metlin

Après avoir réalisé ces comparaisons et avoir pu émettre des propositions d'identification pour ces ions potentiellement responsables de l'augmentation de la capacité de protection des kératinocytes contre les ROS au cours de la culture, nous allons maintenant nous intéresser à la mise en évidence et l'identification de molécules pouvant être responsables des différences de capacité de protection observées en fonction de la modalité d'éclairage employée.

#### 4.2.2.3 Molécules impliquées dans les différences de capacité de protection observées en fonction de la lumière utilisée

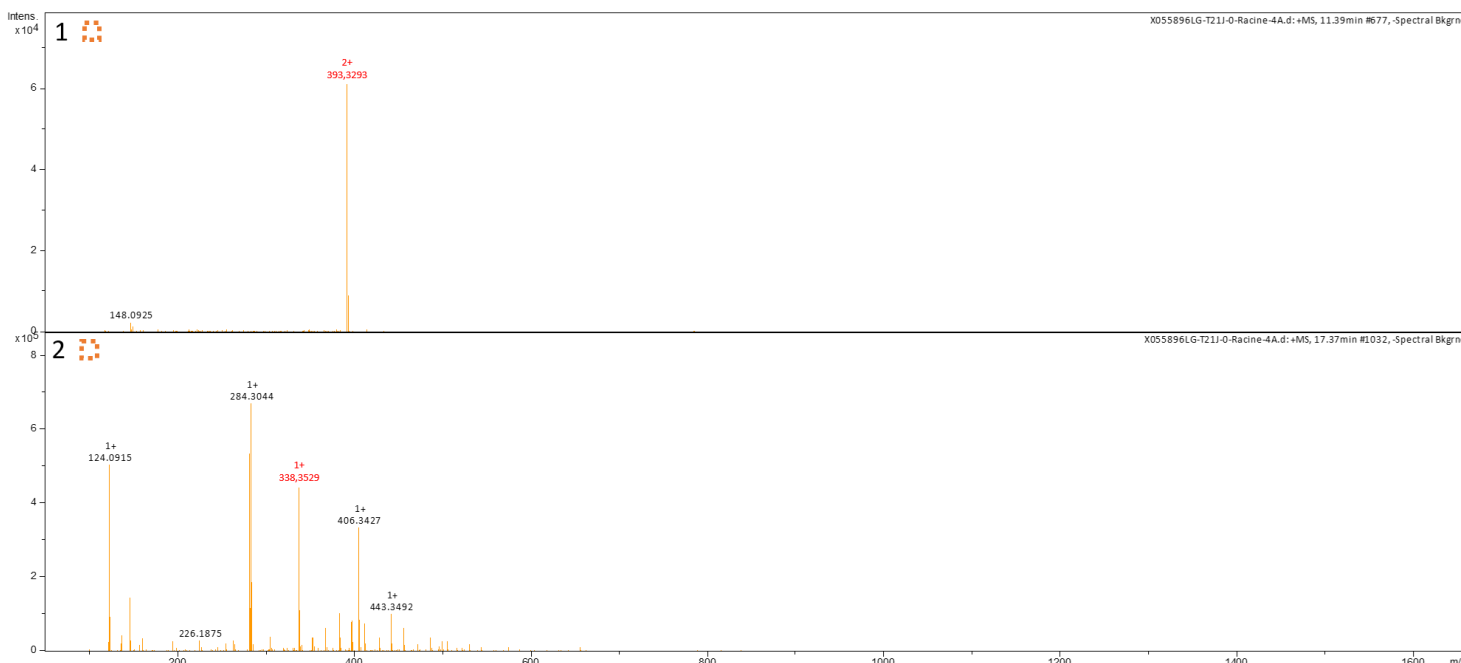
Nous avons pu remarquer, lors du test de protection des kératinocytes contre les ROS qu'en fonction de l'organe étudié les différences entre les extraits à la lumière naturelle et à la lumière bleue n'étaient pas les mêmes. En effet pour les extraits de racines, les extraits à la lumière naturelle semblent, à n'importe quel temps d'échantillonnage, plus protecteurs que les extraits à la lumière bleue. De plus la différence entre les capacités de protection de l'extrait à la lumière naturelle et celui à la lumière bleue augmente au cours du temps de culture de 6,59% de différence entre les deux au début de la culture à 53,05% de différence après 21 jours de culture (cf. **Figure III-24.A**). En revanche pour les extraits de feuilles, hormis la différence de 0,51% au début de la culture entre l'extrait à la lumière naturelle et celui à la lumière bleue pour l'ensemble des autres temps d'échantillonnage la différence entre les extraits des deux modalités d'éclairage reste entre 10,35%, calculée à 14 jours de culture et 17,09%, relevée à 21 jours de culture. Il est à noter qu'à 3 et 21 jours de culture ce sont les extraits à la lumière naturelle qui sont les plus protecteurs tandis qu'à 5, 7 et 14 jours de culture ce sont les extraits à la lumière bleue (cf. **Figure III-24.B**). Dans le but d'étudier ces différences de capacité de protection des kératinocytes observées notamment dans les extraits de racines, nous avons décidé de comparer les extraits à la lumière naturelle et à la lumière bleue échantillonnés à 21 jours, car c'est à ce temps que les différences sont les plus marquantes. Ces comparaisons seront réalisées pour les extraits de racines car pour les extraits de feuilles la différence entre les extraits à 21 jours à la lumière naturelle et à la lumière bleue est très faibles.

Pour les extraits de racines de bardane issus de la culture en hydroponie active sous lumière naturelle et sous lumière bleue, les comparaisons des extraits échantillonnés à 21 jours de culture (T+21J) sont présentées à la **Figure III-36**.



**Figure III-36** : Chromatogrammes des extraits de racines de bardane, cultivée en hydroponie active sous lumière naturelle (Ø) ou sous lumière bleue (LED) et échantillonnés à 21 jours de culture obtenus par ESI-QTOF-MS et soustractions des chromatogrammes réalisées par MetaboliteDetect

Sur ces soustractions, nous observons que l'extrait de racines à 21 jours de culture sous lumière naturelle (Ø) est moins riche en composés que l'extrait à la lumière bleue (LED) au même temps de culture. En effet, le chromatogramme de la soustraction Ø - LED comporte moins de pics que celui de la soustraction LED - Ø qui en comporte plus. Précédemment, nous avons pu mettre en évidence que l'extrait de racines après 21 jours de culture sous lumière naturelle possédait une plus forte capacité de protection des kératinocytes contre les ROS, de l'ordre de 41,7%, à l'inverse de l'extrait à la lumière bleue dont la capacité de protection était de -11,3%. Dans ce contexte, les molécules intenses spécifiques à l'extrait sous lumière naturelle et encadrés en orange peuvent être responsables de la différence mesurée entre les capacités de protection des kératinocytes des deux extraits de racines sous les deux conditions d'éclairage. Les spectres de masses de ces deux pics chromatographiques sont regroupés à la **Figure III-37** avec en rouge les ions résultant de la soustraction des chromatogrammes.

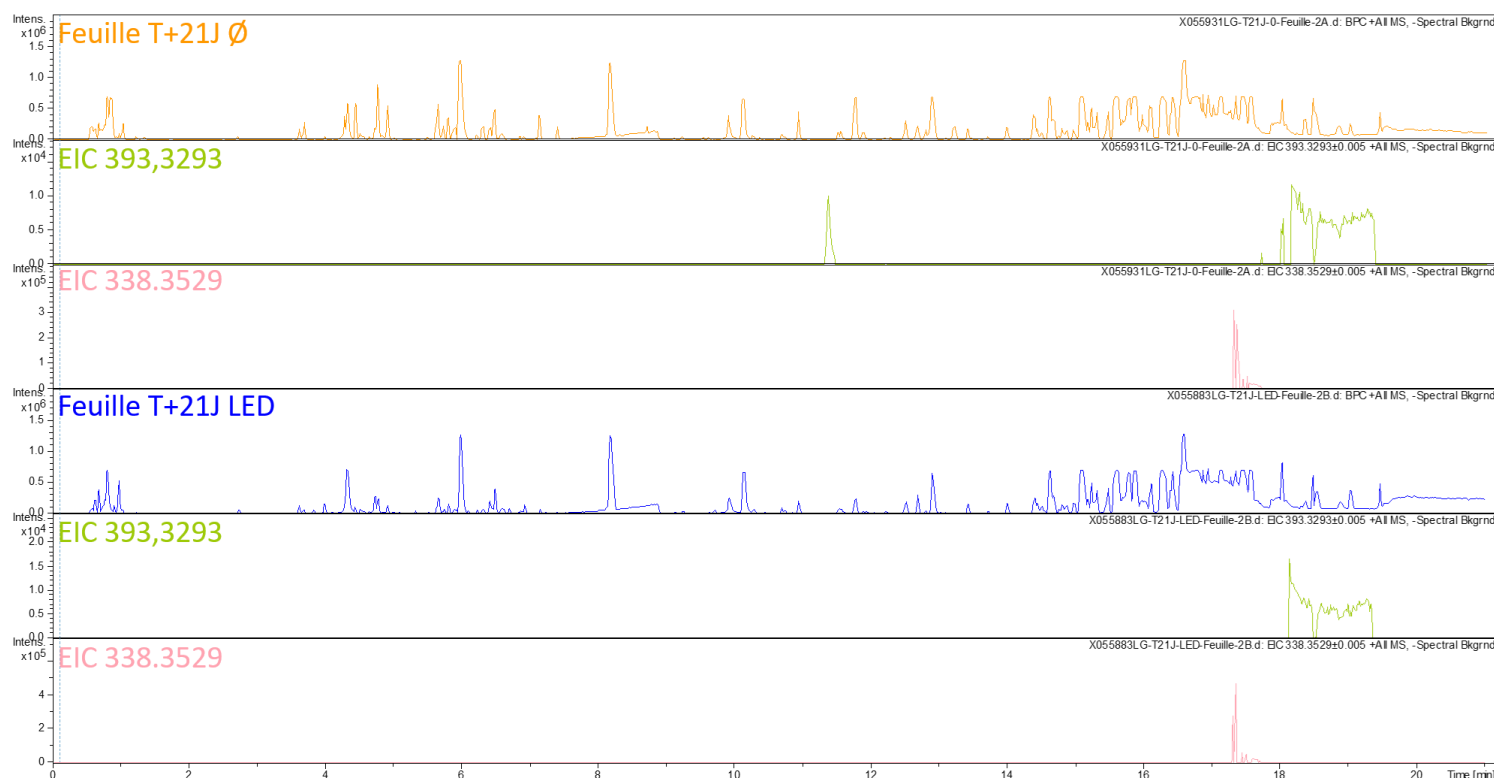


**Figure III-37** : Spectres de masse des deux pics chromatographiques mis en évidence à la figure précédente par des encadrés orange et potentiellement responsables de la différence observée entre les capacités de protection des extraits de racines échantillonnés à 21 jours de culture sous lumière naturelle ou sous lumière bleue, avec en rouge les ions résultats des soustractions

Avant d'identifier les ions correspondant aux pics spécifiques de l'extrait de racines à la lumière naturelle encadrés en orange potentiellement responsables de la différence entre les capacités de protection observées entre les deux conditions d'éclairage, nous avons souhaité nous assurer que ces ions n'étaient pas présents dans les extraits de feuilles au même temps d'échantillonnage et pour les deux conditions d'éclairage. En effet, à l'inverse des extraits de racines aux deux modalités d'éclairage, pour les extraits de feuilles de bardane aucune différence n'a pu être observée entre les capacités de protection contre les ROS des deux conditions d'éclairage. La **Figure III-38** représente les chromatogrammes des extraits de feuilles échantillonnés à 21 jours de culture à la lumière naturelle et à la lumière bleue ainsi que les extractions d'ions des deux ions, à  $m/z$  393,3293 et à  $m/z$  338,3529.

Sur cette **Figure III-38**, on remarque que l'ion à  $m/z$  393,3293 est détecté dans l'extrait de feuilles de bardane cultivée à la lumière naturelle mais pas dans l'extrait cultivé sous la lumière bleue. En revanche, son intensité est 6 fois moins élevée que dans l'extrait de racines de bardane aux mêmes conditions,  $1 \times 10^4$  dans l'extrait de feuilles contre  $6 \times 10^4$  dans l'extrait de racines (cf. **Figure III-37**). Cette différence d'intensité pourrait expliquer qu'aucune différence de capacité de protection n'a été observée dans les extraits de feuilles entre les deux conditions d'éclairage tandis qu'elle a pu être observée entre les extraits de racines. Concernant l'ion à  $m/z$  338,3529, il est détecté dans les extraits de feuilles de bardane, pour les deux conditions d'éclairage. Il est à noter que l'intensité de cet ion dans les extraits de feuilles de bardane est équivalente à celle mesurée dans l'extrait de racines de

bardane sous lumière naturelle, à raison de  $3 \times 10^5$  et  $5 \times 10^5$  dans les extraits de feuilles respectivement sous lumière naturelle et sous lumière LED et  $4,5 \times 10^5$  dans l'extrait de racines sous lumière naturelle (cf. **Figure III-37**). Dans ce cas, seule la présence de l'ion à  $m/z$  393,3293 semble expliquer la différence que nous avons pu observer entre les capacités de protection des kératinocytes contre les ROS des extraits de racines de bardane en fonction de la condition d'éclairage employée.



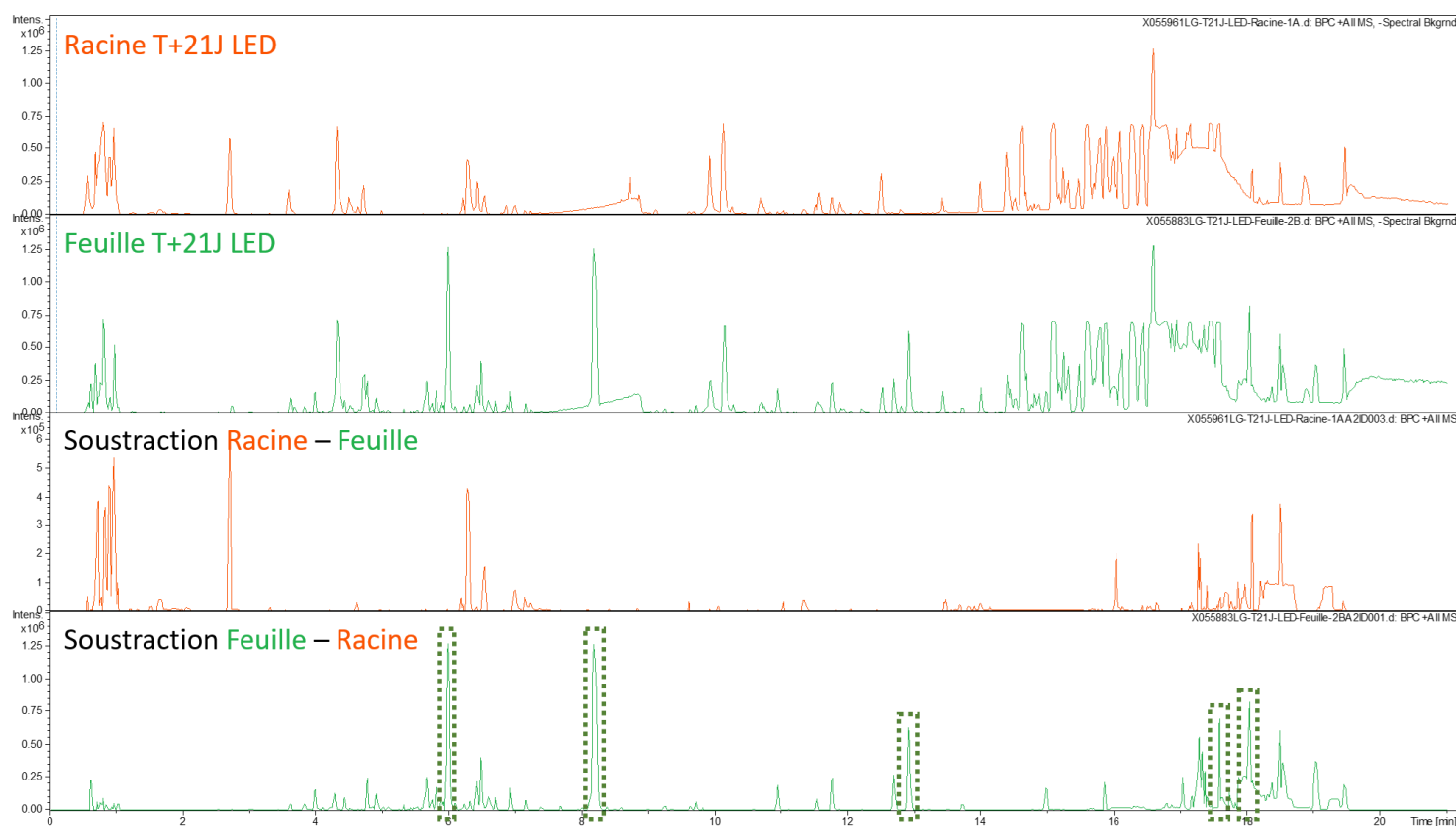
**Figure III-38 :** Chromatogrammes des extraits de feuilles de bardane, cultivée en hydroponie active sous lumière naturelle (Ø) ou sous lumière bleue (LED) et échantillonnés à 21 jours de culture obtenus par ESI-QTOF-MS et extractions d'ions des deux ions mis en évidence dans les racines de bardane dans les mêmes conditions de culture et potentiellement responsables des différences de capacité de protection contre les ROS observées entre les deux conditions d'éclairage. La précision pour extraire l'EIC de chaque ion est de  $\pm 0,005$   $m/z$

Pour identifier cet ion, nous avons recherché dans la base de données LOTUS des correspondances. L'ion à  $m/z$  393,3293 serait sous forme  $[M+Na]^+$  et correspondrait à la molécule (3E,4S)-4-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-3-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylidene]oxolan-2-one ayant pour masse monoisotopique 370,14164 Da et pour formule brute  $C_{21}H_{22}O_6$ . Cette molécule a déjà été identifiée plus tôt dans notre étude, lors de l'étude sur l'augmentation de la capacité de protection contre les ROS des extraits de racines au cours du temps de la culture (cf **Tableau III-5**). Cette molécule a été décrite dans *Arctium lappa* L. lors d'une étude menée sur les effets antiprolifératifs et apoptotiques des lignanes butyrolactones extraites de cette plante sur des cellules leucémiques (Matsumoto et al. 2006) et possède une structure proche de celle de la (+)-7,8-didehydroarctigenin, aussi appelée carthamogenin.

Après avoir réalisé ces comparaisons et avoir pu émettre une proposition d'identification pour cet ion potentiellement responsable des différences de capacité de protection observées entre les deux modalités d'éclairage, nous allons à présent étudier les différences de capacité de protection observées en fonction de l'organe de la plante étudié.

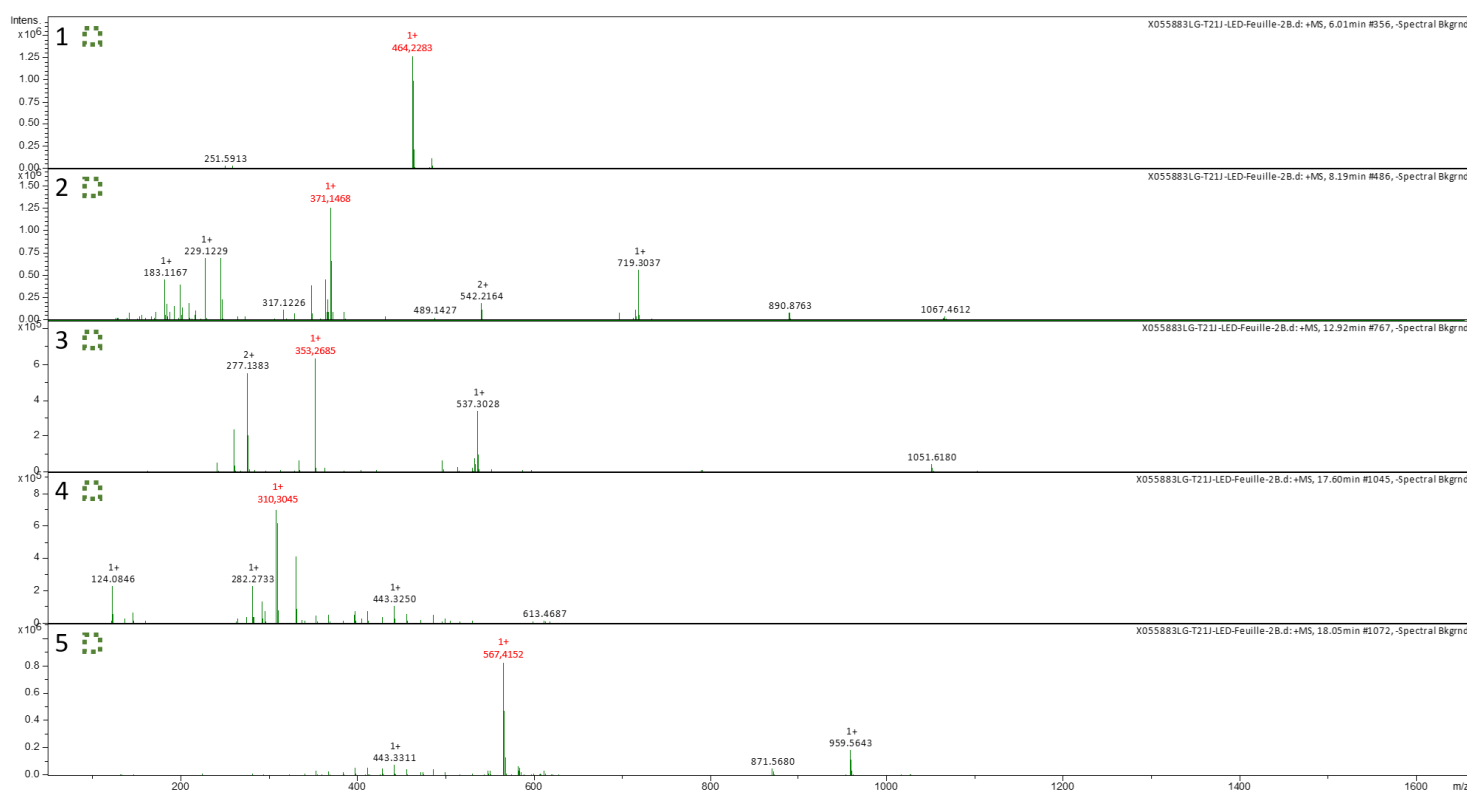
#### 4.2.2.4 Molécules impliquées dans les différences de capacité de protection observées en fonction de l'organe étudié

Lors de l'analyse de protection des kératinocytes contre les ROS, nous avons pu noter que l'ensemble des extraits de feuilles échantillonnés aux différents temps de culture possédait une capacité de protection contre les ROS quel que soit la condition d'éclairage, avec une protection la plus importante à 21 jours de culture. En revanche pour les extraits de racines de bardane une capacité de protection des kératinocytes n'a pu être réellement observée qu'à 21 jours de culture et seulement pour l'extrait à la lumière naturelle (cf. **Figure III-24**). Les différences de capacité de protection des kératinocytes contre les ROS entre les deux organes étudiés étant les plus marquées à 21 jours de culture et n'ayant observé aucune différence entre les deux modalités d'éclairage, nous avons décidé d'utiliser les extraits de feuilles et de racines de bardane échantillonnés à 21 jours de culture sous lumière bleue pour effectuer nos comparaisons (**Figure III-39**).



**Figure III-39** : Chromatogrammes des extraits de *feuilles* et de *racines* de bardane, cultivée en hydroponie active sous lumière bleue (LED) et échantillonnés à 21 jours de culture obtenus par ESI-QTOF-MS et soustractions des chromatogrammes réalisées par le logiciel MetaboliteDetect

Sur ces comparaisons, nous observons que l'extrait de feuilles à 21 jours de culture sous lumière bleue est plus riche en composés que l'extrait de racines à ces mêmes conditions. En effet, le chromatogramme de la soustraction **Feuille - Racine** comporte plus de pics que celui de la soustraction **Racine - Feuille** qui en comporte moins. De plus, les pics présents sur le chromatogramme de la comparaison **Feuille - Racine**, et donc spécifiques à l'extrait de feuilles de bardane, sont beaucoup plus intenses que ceux de la soustraction **Racine - Feuille**. Précédemment, nous avons pu mettre en évidence que les extraits de feuilles de bardane possédaient une capacité de protection des kératinocytes contre les ROS d'environ 40% pour les extraits sous lumière bleue tandis que les extraits de racines ne présentaient pas de capacité de protection contre les ROS dans les mêmes conditions. Dans ce contexte, les molécules intenses spécifiques à l'extrait de feuilles pouvant être mis en évidence et encadrés en **vert** peuvent être responsables de la capacité de protection des kératinocytes observée pour les extraits de feuilles. Les spectres de masses de ces cinq pics chromatographiques sont regroupés à la **Figure III-40** avec en **rouge** les ions résultant de la soustraction des chromatogrammes.



**Figure III-40** : Spectres de masse des cinq pics chromatographiques mis en évidence à la figure précédente par des encadrés **vert** et potentiellement responsables de la différence observée entre les capacités de protection des extraits de racines et de feuilles sous lumière bleue et échantillonnés à 21 jours de culture, avec en **rouge** les ions résultats des soustractions

Dans le but d'identifier ces ions, nous avons comme précédemment cherché au sein de la base de données LOTUS si ces ions avaient déjà été décrits dans la plante étudiée, en partant de notre hypothèse que ces ions sont soit sous forme  $[M+H]^+$  ou sous forme  $[M+Na]^+$ . Malheureusement une correspondance n'a été trouvée que pour un seul ion, l'ion à  $m/z$  371,1468. Cet ion serait sous forme

$[M+H]^+$  et correspondrait à la molécule (3E,4S)-4-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-3-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylidene]oxolan-2-one ayant une masse monoisotopique de 370,14164 Da et pour formule brute  $C_{21}H_{22}O_6$ . Cette molécule a déjà été identifiée plus tôt dans notre étude, lors des études sur l'augmentation de la capacité de protection des extraits au cours du temps de culture et en fonction de la modalité d'éclairage utilisée (cf. **Tableau III-5** et **Figure III-37**).

Afin d'identifier les quatre autres ions nous allons nous appuyer sur les spectres de fragmentation MS/MS de ces ions et sur l'outil Smart Formula du logiciel DataAnalysis. Le **Tableau III-8** rassemble les propositions de formule brutes pour la forme  $[M+H]^+$  ainsi que les propositions d'identification obtenues grâce aux spectres de fragmentation et après recherches dans les bases de données Metlin et MassBank pour chacun des quatre ions. Les propositions de formule brute pour la forme  $[M+Na]^+$  ainsi que les énergies de collision utilisées et les ions fragments MS/MS obtenus, avec leur m/z et leur intensité, sont quant à eux notés à l'**Annexe 5**.

**Tableau III-8** : Propositions de formules brutes de l'outil Smart Formula pour la forme  $[M+H]^+$  et propositions d'identification des bases de données Metlin et MassBank à partir des spectres de fragmentation MS/MS pour les quatre ions potentiellement responsables des différences de protection des kératinocytes contre les ROS observées en fonction de l'organe étudié et pour lesquels aucune correspondance n'a été trouvée dans la base de données LOTUS

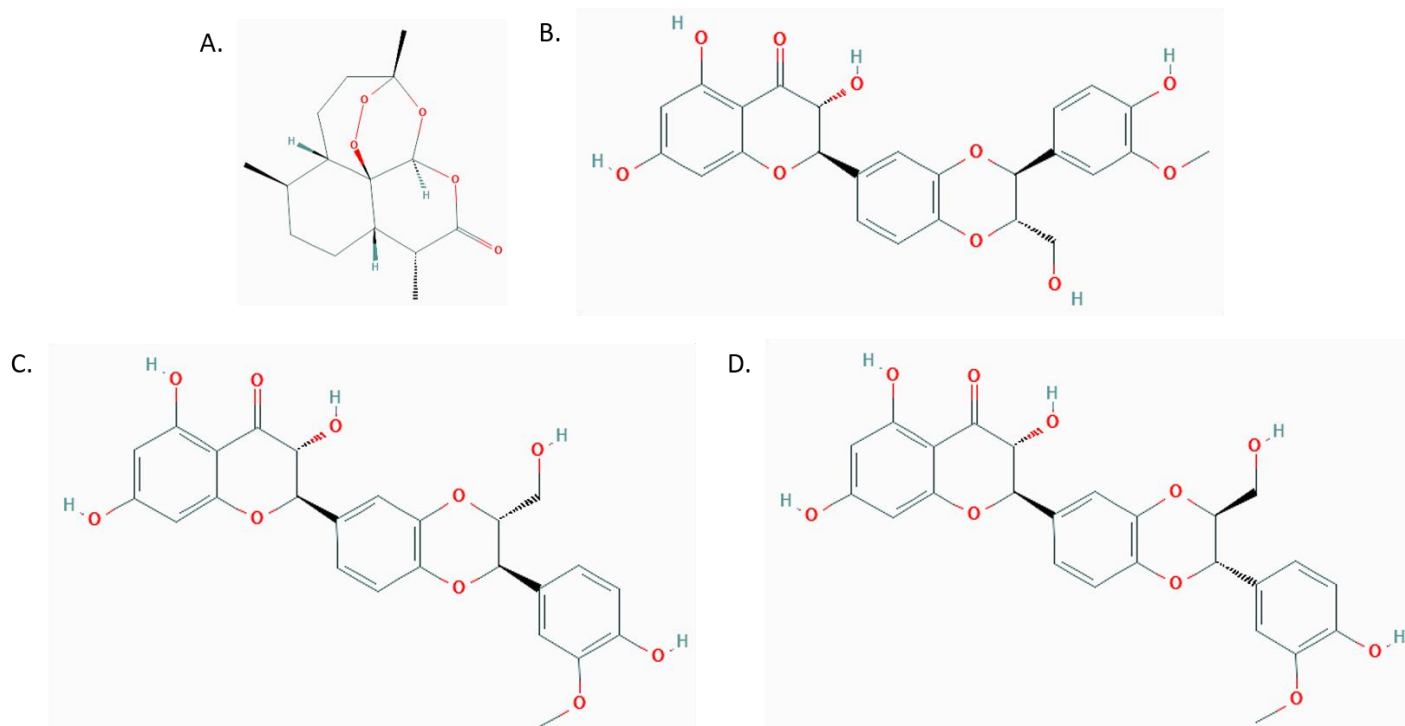
Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Propositions de formules brutes obtenues pour la forme $[M+H]^+$ avec l'outil Smart Formula	Propositions d'identifications à partir des fragmentations MS/MS	
				Propositions de Metlin	Propositions de MassBank
1	6,01	464,2283	$C_{25}H_{37}NO_3S_2$	Pas de proposition	Taurodeoxycholate $C_{26}H_{45}NO_6S$
			$C_{18}H_{37}N_7OS_3$		Taurochenodeoxycholate $C_{26}H_{45}NO_6S$
			$C_{25}H_{29}N_5O_4$		Emetine $C_{29}H_{40}N_2O_4$
			$C_{24}H_{33}NO_8$		Silybin B $C_{25}H_{22}O_{10}$
			$C_{18}H_{29}N_{11}O_2S$		Tauroursodeoxycholic acid $C_{26}H_{45}NO_6S$
			$C_{17}H_{33}N_7O_6S$		Hypaconitine $C_{33}H_{45}NO_{10}$
			$C_{14}H_{25}N_{17}S$		Isosilybin B $C_{25}H_{22}O_{10}$
			$C_{16}H_{37}N_3O_{10}S$		Quercetin-3-O-rutinoside $C_{27}H_{30}O_{16}$
			$C_{21}H_{28}N_{11}O_2$		Isosilybin A $C_{25}H_{22}O_{10}$
3	12,92	353,2685	$C_{10}H_{25}N_{17}O_5$	9,11-methane-epoxy prostaglandin F1 $\alpha$ $C_{21}H_{36}O_4$	Valartan $C_{24}H_{29}N_5O_3$
					Isoxsuprine $C_{18}H_{23}NO_3$
					Nandrolone $C_{18}H_{26}O_2$
					Artemisinin $C_{15}H_{22}O_5$
					Boldenone undecylenate $C_{30}H_{44}O_3$
			$C_{22}H_{32}N_4$		N,O-desmethyltramadol $C_{15}H_{23}NO_2$
			$C_{21}H_{36}O_4$		O-desmethyltramadol $C_{15}H_{23}NO_2$
					4-aminoantipyrine $C_{15}H_{23}NO_2$
					Brefeldin-A $C_{16}H_{24}O_4$
					Hypnophilin $C_{15}H_{20}O_3$
					Atenolol $C_{14}H_{22}N_2O_3$



Suite **Tableau III-8**

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+H] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula	Propositions d'identifications à partir des fragmentations MS/MS	
				Propositions de Metlin	Propositions de MassBank
4	17,60	310,3045	Pas de proposition	Oleoyl Ethyl Amide C <sub>20</sub> H <sub>39</sub> NO	Erucamide C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> NO
					delta-undecalactone C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
					gamma-dodecalactone C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>
					gamma-undecalactone C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
					delta-tridecalactone C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
					delta-decalactone C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
					gamma-decalactone C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
					Boldenone undecylenate C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>
					delta-dodecalactone C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>
					N,N-diethyl-3-methoxybenzamide C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>
5	18,05	567,4152	Pas de proposition	Pas de proposition	Bufalin C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>
					Lycopene-5,6-diol C <sub>40</sub> H <sub>58</sub> O <sub>2</sub>
					Zeaxanthin C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub>
					Taurocholate C <sub>26</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>7</sub> S
					4-androstene-3,17-dione C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>
					Testosterone C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
					Nandrolone C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>
					Cyclopamine C <sub>27</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>2</sub>
					Hydrocortisone C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>
					4,4'-Diaponeurosporene C <sub>30</sub> H <sub>42</sub>

Pour ces quatre ions, nous avons pu obtenir de nombreuses propositions de formules brutes grâce à l'outil Smart Formula mais également de nombreuses propositions d'identification à l'aide des spectres de fragmentations MS/MS et des bases de données principalement MassBank mais aussi Metlin. Malgré ces nombreuses propositions pour ces quatre ions, nous ne pouvons pas les identifier avec certitude car pour chacun de ces ions, aucune proposition d'identification ne correspond à une proposition de formule brute de la forme  $[M+H]^+$ . Cependant il est intéressant de noter que parmi les propositions d'identification obtenues pour ces ions nous pouvons retrouver l'artémisinine ainsi que la silybine B et les isosilybines A et B (Figure III-41), des métabolites spécialisés extraits de plantes comme l'armoise annuelle (*Artemisia annua* L.) ou le chardon Marie (*Silybum marianum* L. Gaertn.).



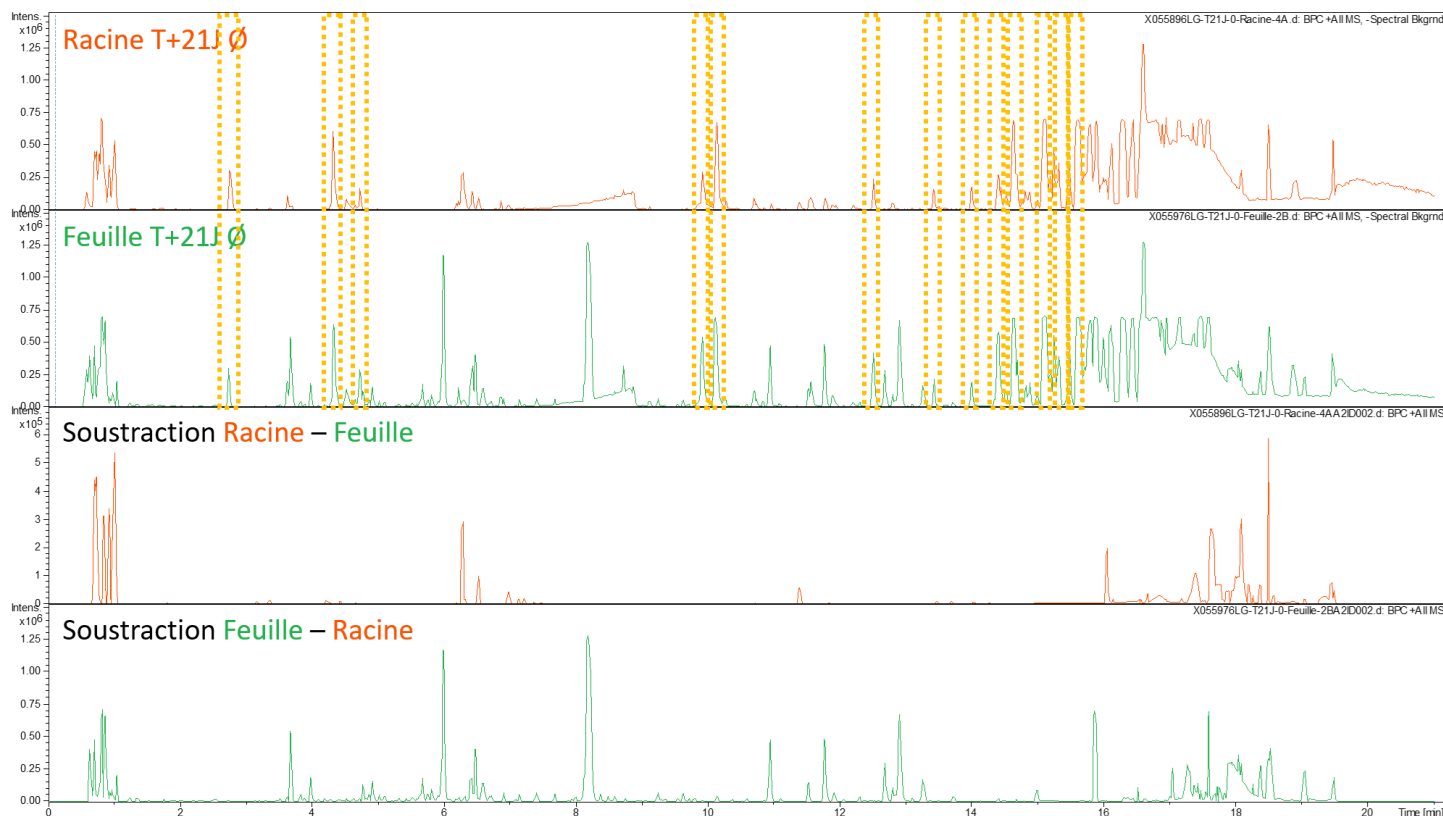
**Figure III-41 :** Structures chimiques de l'artémisine (A), de la silybine B (B) et des isosilybines A (C) et B (D), exemples de molécules parmi les propositions d'identification pour les ions mis en évidence comme potentiellement responsable des différences de capacité de protection contre les ROS observées entre les extraits de racines et les extraits de feuilles de bardane

Afin de mettre en évidence d'autres molécules potentiellement responsables de cette capacité de protection de kératinocytes contre les ROS observée à la fois dans nos extraits de racines et de feuilles, nous avons souhaité comparer deux extraits possédant cette activité de protection.

#### 4.2.2.1 Molécules impliquées dans la capacité de protection des kératinocytes contre les ROS dans les extraits de bardane indépendamment de l'organe étudié

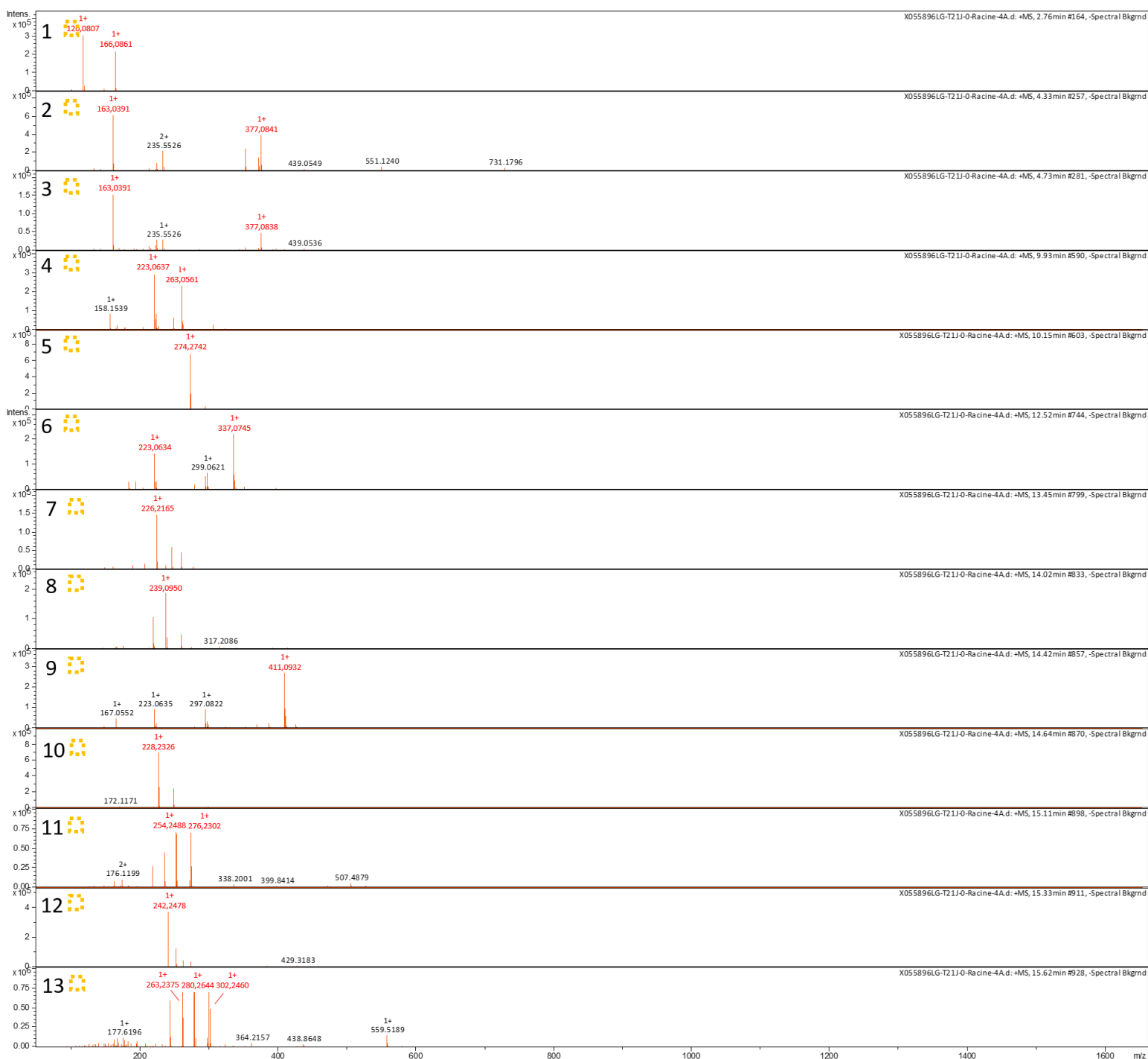
Nous avons choisi les extraits de racines et de feuilles de bardane cultivée en hydroponie active sous lumière naturelle et échantillonnés après 21 jours de culture. En effet, ces deux extraits possèdent un pourcentage de protection par rapport au contrôle de 41,7% pour l'extrait de racines et de 59,3% pour l'extrait de feuilles (Figure III-24). Cette comparaison va mettre en évidence les molécules communes aux deux extraits et potentiellement responsables de leurs capacités de protection des

kératinocytes contre les ROS évaluées précédemment. La **Figure III-42** regroupe les chromatogrammes des extraits de racines et de feuilles de bardane cultivée sous lumière naturelle et échantillonnés après 21 jours de culture ainsi que les soustractions de ces chromatogrammes obtenues à l'aide du logiciel MetaboliteDetect.



**Figure III-42** : Chromatogrammes des extraits de *feuilles* et de *racines* de bardane, cultivée en hydroponie active sous lumière naturelle (Ø) et échantillonnés à 21 jours de culture obtenus par ESI-QTOF-MS et soustraction des chromatogrammes réalisées par le logiciel MetaboliteDetect

Sur ces soustractions, nous pouvons noter que l'extrait de feuilles à 21 jours de culture sous lumière naturelle est plus riche en composés que l'extrait de racines à ces mêmes conditions. En effet, la soustraction *Feuille - Racine* présente plus de pics que la soustraction *Racine - Feuille* qui en comporte moins. Il est également à noter que les pics observés sur le chromatogramme de la soustraction *Feuille - Racine*, et donc spécifiques à l'extrait de feuilles, sont beaucoup plus intenses que ceux de la soustraction *Racine - Feuille*. Ici, ce ne sont pas les pics spécifiques à chacun de ces deux extraits qui nous intéressent mais nous voulons nous focaliser sur les pics communs à ces deux extraits. Dans ce contexte, nous avons pu mettre en évidence à l'aide d'encadrés **jaune** les pics chromatographiques communs aux deux extraits, au nombre de 13. Pour chacun de ces pics chromatographiques mis en évidence nous nous sommes assuré que les temps de rétention de ces pics ainsi que les spectres de masse correspondant à chacun d'entre eux étaient les mêmes dans les deux extraits. Les spectres de masses de ces treize pics chromatographiques issus du chromatogramme de l'extrait de racines sont regroupés à la **Figure III-43**.

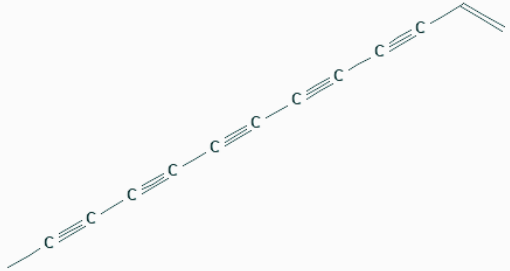
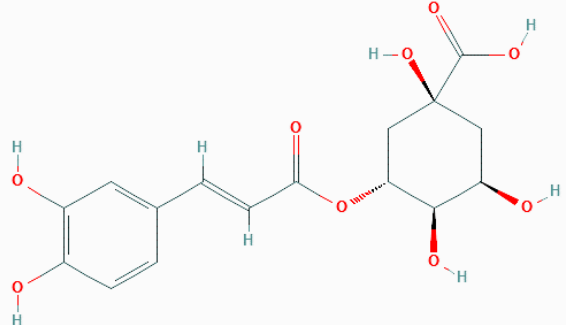


**Figure III-43 :** Spectres de masse des treize pics chromatographiques mis en évidence à la figure précédente par des encadrés jaune et potentiellement responsables de la capacité de protection des extraits de racines et de feuilles de bardane sous lumière naturelle et échantillonnés à 21 jours de culture, avec en rouge les ions que nous avons cherché à identifier

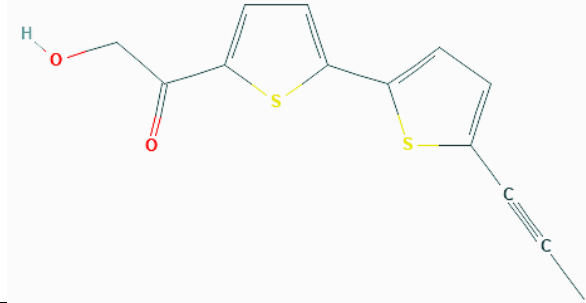
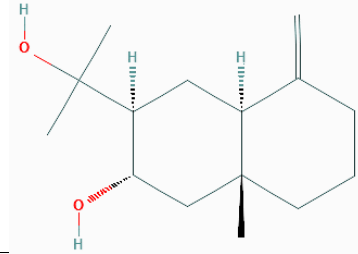
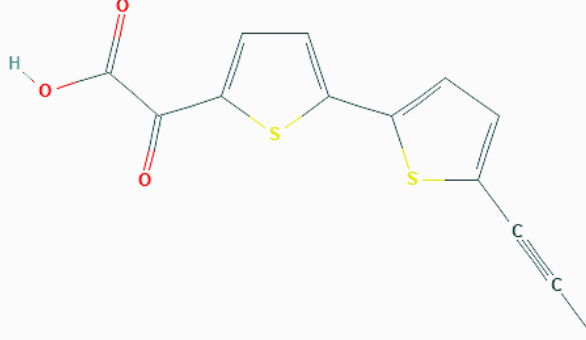
Nous avons choisi de nous focaliser sur les deux ions les plus intenses pour chaque spectre de masse sauf dans les cas des spectres numérotés 5, 7, 8, 9 et 10 pour lesquels un pic était majoritaire et pour le spectre numéro 13 où nous nous sommes focalisés sur les trois ions les plus intenses. Il est bon de remarquer que les spectres de masses numérotés 2 et 3, possédant des temps de rétention respectivement de 4,33 min et 4,73 min, sont très semblables, on retrouve les mêmes ions majoritaires mais avec des intensités plus faibles sur le spectre de masse numéro 3.

En tout nous avons tenté d’identifier 19 ions, nous avons comme précédemment cherché au sein de la base de données LOTUS si ces ions avaient déjà été décrits dans la bardane. Cette base de données LOTUS nous a permis d’identifier 5 ions parmi les 19 que nous cherchions à identifier. Le **Tableau III-9** regroupe les résultats d’identification de ces cinq ions après recherches dans la base de données.

**Tableau III-9 :** Tableau regroupant les résultats d’identification après recherches dans la base de données LOTUS pour cinq ions d’intérêts mis en évidence lors de la recherche de molécules communes aux extraits de racines et de feuilles de bardane à 21 jours de culture sous lumière naturelle et potentiellement responsable de leur capacité de protection des kératinocytes contre les ROS

Numéro du pic	Temps de rétention (min)	m/z	Résultats trouvés sur la base de données LOTUS				
			Masse monoisotopique (Da)	Formule brute	Nom et Structure chimique	Référence bibliographique associée	
2A et 3A	4,33 et 4,73	163,0391	162,04695	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub>	1-tridecene-3,5,7,9,11-pentayne		Takasugi et al. 1987
2B et 3B	4,33 et 4,73	377,0841	354,095085	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	Acide chlorogénique		Moritani et al. 1996

Suite **Tableau III-9**

Numéro du pic	Temps de rétention (min)	m/z	Résultats trouvés sur la base de données LOTUS				
			Masse monoisotopique (Da)	Formule brute	Nom et Structure chimique	Référence bibliographique associée	
4B	9,93	263,0561	262,01222	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	Arctinone A		Washino et al. 1986
8	14,02	239,095	238,19328	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	Arctiol		Naya et al. 1972
11B	15,11	276,2302	275,991485	C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	Acide arctique B		Washino et al. 1986

Parmi ces cinq molécules identifiées on retrouve en premier lieu le 1-tridecene-3,5,7,9,11-pentayne, une phytoalexine, c'est-à-dire une molécule synthétisée par certaine plante en réponse à un stress biotique, de type bactérien ou fongique par exemple, ou à un stress abiotique, de type salin ou lumineux entre autres. En effet, sa concentration est 30 fois plus élevée dans les racines de bardane suite à un stress salin en présence de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ) *in vitro*, ce qui suggère un rôle de cette molécule dans les mécanismes de défense de la plante (Takasugi et al. 1987). Ensuite, nous avons pu identifier l'acide chlorogénique, cette molécule aussi nommée l'acide 5-O-caffeoylquinique est un composé phénolique largement retrouvé dans notre alimentation notamment dans les grains de café mais aussi dans de nombreux fruits et légumes comme par exemple les aubergines, les artichauts, les carottes, les pommes, les pêches, les poires ainsi que dans des épices telles que le poivre (Lu et al. 2020). De nombreuses études ont montré que l'acide chlorogénique était un puissant antioxydant et agent anti-inflammatoire qui peut traverser la barrière hémato-encéphalique et ainsi agir de façon directe et/ou indirecte sur le système nerveux central. De plus en plus de recherches se concentrent aujourd'hui sur une relation entre la consommation via l'alimentation de l'acide chlorogénique et une réduction des risques de développement de maladies neurodégénératives telles que les accidents vasculaires cérébraux ischémiques et les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Lu et al. 2020). L'acide chlorogénique possède également des propriétés de protection gastrointestinale, rénale et hépatique et montre des effets anti-hypertenseurs, anti-cancérogénèse et anti-microbien (Lu et al. 2020). La troisième molécule qui a pu être identifiée est l'arctinone a, un composé acétylénique soufré. Cette molécule a été isolée et caractérisée par Washino et al. en 1986 à partir d'extraits de racines de bardane mais elle est peut également être retrouvée dans les feuilles. Lors d'une étude l'arctinone a extraite de feuilles de bardane a pu montrer des propriétés anti-fongiques contre des champignons de la pourriture du bois blanche (*Coriolus versicolor*) et brune (*Gloeophyllum trabeum*) (Rong et al. 2017). Concernant les deux autres molécules identifiées, l'arctiol et l'acide arctique b, elles ont été identifiées pour la première fois respectivement en 1972 par Naya et al. et en 1986 par Washino et al.. En revanche, nous n'avons pu trouver dans la littérature aucune étude montrant une quelconque propriété pour ces molécules.

Afin d'identifier les 14 autres ions, qui n'ont pu être identifiés grâce à la base de données LOTUS, nous allons nous appuyer sur les spectres de fragmentation MS/MS de ces ions et sur l'outil Smart Formula du logiciel DataAnalysis. Le **Tableau III-10** rassemble les propositions de formule brute pour la forme  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ainsi que les propositions d'identification obtenues grâce aux spectres de fragmentation et après recherches dans les bases de données Metlin et MassBank pour chacun des quatorze ions. Comme précédemment, les propositions de formule brute pour la forme  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ainsi que les énergies de collision utilisées et les ions fragments MS/MS obtenus, sont notés à l'**Annexe 6**.

**Tableau III-10 :** Propositions de formules brutes pour la forme  $[M+H]^+$  de l'outil Smart Formula et propositions d'identification des bases de données Metlin et MassBank à partir des spectres de fragmentation MS/MS pour les quatorze ions potentiellement responsables de la capacité de protection des kératinocytes contre les ROS observée dans les extraits de racines et de feuilles de bardane et pour lesquels aucune correspondance n'a été trouvée dans la base de données LOTUS

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Propositions de formules brutes obtenues pour la forme $[M+H]^+$ avec l'outil Smart Formula	Propositions d'identifications à partir des fragmentations MS/MS	
				Propositions de Metlin	Propositions de MassBank
1A	2,76	120,0807	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> N C <sub>8</sub> H <sub>6</sub>		Pas de fragmentation disponible
1B	2,76	166,0861	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	L-phenylalanine C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	Phenylalanine C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>
					Ala-Phe C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
					Anileridine C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
					L-phenylalanine C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>
					Carbetamide C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
					7-methoxy-4-methylcoumarin C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>
					Lidocaine-N-oxyde C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
					Seneciophylline C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>
					N-methylcorydaldine C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>
					Hordenine C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO
4A	9,93	223,0637	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	Pas de proposition	Denatonium [C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
					N-isopropyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub>
					Coumaphos C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClO <sub>5</sub> PS
					2-amino-1-methyl-6-phenylimidazole[4.5-b]pyridine (PhIP) C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub>
					3-oxo-C14 homoserine lactone C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub>
					Lauramidopropylbetaine [C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
					17-alpha-estradiol C <sub>18</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>
					17-beta-estradiol C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
					3'.7-dimethoxy-3-hydroxyflavone C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>
					Flurtamone C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>



Suite **Tableau III-10**

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+H] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula	Propositions d'identifications à partir des fragmentations MS/MS	
				Propositions de Metlin	Propositions de MassBank
5	10,15	274,2742	C <sub>16</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>2</sub> C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Pas de proposition	Triclabendazole C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>2</sub> OS
					Rhamnetin C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>
					Indole-3-acetyl-L-valine C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
					Petunidin-3-galactoside [C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> ] <sup>+</sup>
					Sanguinarine [C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
					Tiapride C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S
					Isorhamnetin C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>
					Fenoxycarb C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>
					Isorhamnetin-3-O-glucoside C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>
					Nandrolone C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>
6A	12,52	223,0634	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O C <sub>12</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O	Pas de proposition	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazole[4.5-b]pyridine (PhIP) C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub>
					3-oxo-C14 homoserine lactone C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub>
					17-alpha-estradiol C <sub>18</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>
					17-beta-estradiol C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
					Oseltamivir C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
					Coumaphos C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClO <sub>5</sub> PS
					Lauramidopropylbetaine [C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
					Dichlorfluaniid C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>
					Dimethalchlor C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>2</sub>
					Acetochlor C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> ClNO <sub>2</sub>
6B	12,52	337,0745	C <sub>25</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>	Pas de proposition	Pas de proposition disponible
			C <sub>25</sub> H <sub>5</sub> N		

Suite **Tableau III-10**

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+H] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula	Propositions d'identifications à partir des fragmentations MS/MS	
				Propositions de Metlin	Propositions de MassBank
7	13,45	226,2165	C <sub>14</sub> H <sub>27</sub> NO C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O	Pas de proposition	Pas de proposition disponible
9	14,42	411,0932	C <sub>28</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> S C <sub>31</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	Pas de proposition	Nicosulfuron C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S Risperidone C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> Fluvastatin C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> FNO <sub>4</sub> Flumethasone C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> F <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 2'-Deoxyadenosine-5'-diphosphate sodium salt C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub> P <sub>2</sub> Clobetasol C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> ClFO <sub>4</sub> Biochanin A 8-C-glucoside C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> Betamethasone dipropionate C <sub>28</sub> H <sub>37</sub> FO <sub>7</sub> Isoernandezine C <sub>39</sub> H <sub>44</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Flavone base + 1O, 1MeO, C-Hex C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>
10	16,64	228,2326	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> NO C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O		Pas de fragmentation disponible
11A	15,11	254,2488	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> NO C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O	Pas de proposition	Erucamide C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> NO gamma-dodecalactone C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> gamma-undecalactone C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> delta-dodecalactone C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>1</sub> delta-tridecalactone C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> delta-undecalactone C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> gamma-decalactone C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> delta-decalactone C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> alpha,beta-dihydroresveratrol C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> Bodenone undecylenate C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>

Suite *Tableau III-10*

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+H] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula	Propositions d'identifications à partir des fragmentations MS/MS	
				Propositions de Metlin	Propositions de MassBank
12	15,33	242,2478	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> NO C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> O	Pas de proposition	Terbutryn C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> S
					Acacetin C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
					Oxazepam C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
					Biochanin A C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
					Biochanin -7-O-glucoside C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>
					Bifonazol C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub>
					9-methoxy-2,2-dimethyl-6-hydro-2H-pyrano[5,6-c]quinolin-5-one C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>
					Aflatoxin B1 C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>
					Sempervirine C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>
					Boscalid C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O
13A	15,62	263,2375	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O	Pas de proposition	Ginsenoside compound K C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>8</sub>
					DL-4-hydroxyphenyllactic acid C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
					Testosterone propionate C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>
					Umbelloferone C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
					3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine (MDEA) C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>
					Bisoprolol C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub>
					Austricine C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>
					Claussequinone C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>
					Tyrosine C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>
					Catechine C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>

Suite *Tableau III-10*

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+H] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula	Propositions d'identifications à partir des fragmentations MS/MS	
				Propositions de Metlin	Propositions de MassBank
13B	15,62	280,2644	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> NO C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O	Pas de proposition	Artemisinin C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>
					Ginsenoside compound K C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>8</sub>
					Erucamide C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> NO
					Hypnophilin C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>
					Jasmonic acid C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>
					Catechine C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
					Maslinic acid C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>
					Paroxetine C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> FNO <sub>3</sub>
					Epicatchine C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
					Clausequinone C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>
13C	15,62	302,2460	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> NO C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O	Pas de proposition	Naproxen C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>
					Diazinon C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS
					Clofibrate C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> ClO <sub>3</sub>
					Methiocarb-sulfoxide phenol C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> S
					Methiocarb-sulfoxide C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub> S
					delta-decalactone C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
					fenthion-sulfoxide C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>
					Napropamide C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>
					Pyriproxyfen C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>
					Fenthion C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>

Pour l'ensemble des quatorze ions que nous cherchons à identifier, nous avons pu obtenir plusieurs propositions de formules brutes ou d'identification grâce aux différents outils utilisés. En revanche, parmi ces quatorze ions seul l'ion à  $m/z$  166,0861 montre une concordance entre les propositions de formules brutes et les propositions d'identification. Cet ion à  $m/z$  166,0861 serait la L-phénylalanine de formule brute  $C_9H_{11}NO_2$  et de masse monoisotopique 165,0790 Da. Dans plusieurs études la prise orale de L-phénylalanine couplée à une exposition aux UVA est apparue efficace dans le traitement du vitiligo (Antoniou et *al.* 1989, Schulpis et *al.* 1989), une maladie de l'épiderme caractérisée par des tâches de dépigmentation qui peuvent apparaître et s'étendre sur toutes les parties de la peau. De plus, une étude menée sur le colza (*Brassica napus*) a pu montrer qu'une application systémique de L-phénylalanine a permis d'augmenter la résistance de la plante contre les pigeons sauvages. En effet, les plantes traitées avec la L-phénylalanine ont reçu moins de coups de becs de la part des pigeons que les plantes contrôles (Grey et *al.* 1997). La L-phénylalanine peut donc être considérée comme un métabolite de défense de la plante.

Ici, nous avons pu mettre en évidence et identifier plusieurs molécules responsables de la capacité de protection des kératinocytes de nos extraits vis-à-vis des ROS indépendamment de l'organe étudié. En revanche de nombreux ions ont pu être mis en évidence mais n'ont pu être identifiés avec certitude, pour ceux-là nous possédons uniquement des propositions d'identification et/ou de formules brutes.

## 5 Conclusion

Les études menées dans ce chapitre avaient pour objectifs dans un premier temps de sélectionner à l'aide de tests *in tubo* chimiques, évaluant l'activité antioxydante, et biologiques, ciblant des enzymes impliquées dans le vieillissement cellulaire, une plante pour laquelle les activités des extraits pourraient être améliorées en employant de nouvelles méthodes de culture. C'est ainsi que notre choix s'est porté sur la grande bardane.

Dans un second temps, l'objectif était d'évaluer l'apport d'un modèle de culture innovant et biotechnologique *in vitro* tel que la culture de cals de bardane sur les activités antioxydantes et d'inhibition d'enzymes impliquées dans le vieillissement cellulaire via les mêmes tests chimiques et biologiques que précédemment. Cette seconde étude a permis de mettre en évidence que l'élicitation de cette culture de cals de bardane par la lumière bleue semblait favoriser la concentration en composés phénoliques totaux ainsi que l'activité antioxydante des extraits concernés.

Dans un troisième temps, les objectifs des deux études suivantes étaient d'évaluer l'impact des modes de culture et de l'élicitation sur des activités anti-tyrosinase et antioxydante et d'identifier les molécules responsables de ces activités dans les extraits.

Pour l'étude menée sur l'activité anti-tyrosinase, nous nous sommes appuyés sur les résultats des tests d'inhibition d'activité de la tyrosinase *in tubo* des extraits de bardane cultivée en hydroponie passive sous différentes lumières d'élicitation. Lors de cette étude nous avons pu observer que l'activité d'inhibition de la tyrosinase était plus élevée dans les extraits de pétioles que dans les extraits de racines ou de feuilles, de plus cette inhibition était d'autant plus marquée sous élicitation à la lumière blanche. Après comparaison des chromatogrammes grâce au logiciel MetaboliteDetect, nous avons pu mettre en évidence trois ions pouvant être responsables de l'activité anti-tyrosinase mesurée dans nos extraits de bardane pour lesquels nous avons soit pu émettre des propositions d'identification, grâce à la base de données LOTUS mais aussi grâce aux correspondances des spectres de fragmentation MS/MS dans les bases de données Metlin et MassBank, soit des propositions de formules brutes grâce à l'outil SmartFormula.

Enfin pour l'étude sur l'activité antioxydante les mêmes outils ont été mis en place suite aux résultats des tests de criblage cellulaire *in vitro* sur des cellules de kératinocytes de nos extraits de bardane cultivée en hydroponie active. Ici de nombreuses soustractions de chromatogrammes ont été réalisées grâce au logiciel MetaboliteDetect afin d'étudier séparément les différentes observations qui avaient pu être relevées suite aux résultats sur la protection des kératinocytes contre les ROS comme par exemple l'augmentation de la capacité de protection des extraits au cours du temps de la culture, la différence de capacité de protection entre les extraits issus de la culture à la lumière naturelle et

ceux sous lumière bleue ou encore la différence dans les capacités de protection entre les extraits de racines et de feuilles de bardane. Pour chacune des observations étudiées, nous avons pu mettre en évidence plusieurs ions potentiellement responsables de cette capacité de protection des kératinocytes contre les ROS. Pour certains de ces ions nous avons pu obtenir une identification, soit grâce aux correspondances dans la base de données LOTUS, soit grâce aux recherches dans les bases de données Metlin et MassBank à l'aide des spectres de fragmentation. Parmi ces ions nous pouvons retrouver des molécules déjà décrites dans la grande bardane comme l'acide arctigénique, l'acide chlorogénique, l'arctinone A, l'arctiol ou l'acide arctique B et des molécules qui n'ont pas été décrits précédemment dans cette plante comme le farnesal. Pour beaucoup d'autres ions mis en évidence seules des propositions d'identification et/ou de formule brute ont pu être émises.

Pour résumer ce chapitre a permis de présenter pour l'ensemble des études que nous avons menées, sur l'impact de la méthode de culture et de l'élicitation lumineuse sur l'activité anti-tyrosinase de nos extraits, ainsi que sur leur capacité de protection des kératinocytes contre les ROS, et ce malgré certaines identifications non résolues et des effets difficilement corrélés avec la littérature et les identifications, de nombreux ions que nous avons pu mettre en évidence et plusieurs molécules potentiellement responsables de ces activités étudiées qui ont pu être identifiées.

## Références bibliographiques

- Antoniou C., Schulpis H., Michas T., Katsambas A., Frajis N., Tsagaraki S., & Stratigos J. (1989).** Vitiligo Therapy with Oral and Topical Phenylalanine with UVA Exposure. *International Journal of Dermatology*, 28(8), 545-547. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1989.tb04613.x>
- Bede J. C., Goodman W. G., & Tobe S. S. (1998).** Insect Juvenile Hormone III in the Sedge, *Cyperus iria* L. : Distribution and Possible Biological Significance. *IUPAC*. <http://www.iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/bede.html>
- Duh P.-D. (1998).** Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linné): Its scavenging effect on free-radical and active oxygen. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(4), 455-461. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0248-8>
- During A., Debouche C., Raas T., & Larondelle Y. (2012).** Among Plant Lignans, Pinoresinol Has the Strongest Antiinflammatory Properties in Human Intestinal Caco-2 Cells. *The Journal of Nutrition*, 142(10), 1798-1805. <https://doi.org/10.3945/jn.112.162453>
- Grey C. B., Cowan D. P., Langton S. D., & Watkins R. W. (1997).** Systemic Application of L-Phenylalanine Increases Plant Resistance to Vertebrate Herbivory. *Journal of Chemical Ecology*, 23(5), 1463-1470. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006476.51106.44>
- Higashinakasu K., Yamada K., Shigemori H., & Hasegawa K. (2005).** Isolation and Identification of Potent Stimulatory Allelopathic Substances Exuded from Germinating Burdock (*Arctium lappa*) Seeds. *HETEROCYCLES*, 65(6), 1431. <https://doi.org/10.3987/COM-05-10361>
- Industries Cosmétiques. (2016).** La nouvelle réglementation cosmétique en Chine. *Industries Cosmétiques*, 9, 42-43
- López-Biedma A., Sánchez-Quesada C., Delgado-Rodríguez M., & Gaforio J. J. (2016).** The biological activities of natural lignans from olives and virgin olive oils : A review. *Journal of Functional Foods*, 26, 36-47. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.07.005>
- Matsumoto T., Hosono-Nishiyama K., & Yamada H. (2006).** Antiproliferative and apoptotic effects of butyrolactone lignans from *Arctium lappa* on leukemic cells. *Planta Medica*, 72, 276-278. <https://doi.org/10.1055/s-2005-916174>



- Moritani S., Nomura M., Takeda Y., & Miyamoto K. (1996).** Cytotoxic Components of *Bardanae Fructus* (Goboshi). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19(11), 1515-1517. <https://doi.org/10.1248/bpb.19.1515>
- Naya K., Tsuji K., & Haku U. (1972).** The constituents of *Arctium lappa* L. *Chemistry Letters*, 1(3), 235-236. <https://doi.org/10.1246/cl.1972.235>
- Rong B.-B., Xu G.-Q., & Wang L.-H. (2017).** Rapid extraction of active components from *Arctium lappa* leaves and its anti-fungal properties of wood rot fungi. *Journal of Beijing Forestry University*, 39(5), 109-116. <https://doi.org/10.13332/j.1000-1522.20170010>
- Satyaveanthan M.-V., Suhaimi S.-A., Ng C. L., Muhd-Noor N.-D., Awang A., Lam K. W., & Hassan M. (2021).** Purification, biochemical characterisation and bioinformatic analysis of recombinant farnesol dehydrogenase from *Theobroma cacao*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 161, 143-155. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.050>
- Schulpis C. H., Antoniou C., Michas T., & Stratigos J. (1989).** Phenylalanine plus Ultraviolet Light : Preliminary Report of a Promising Treatment for Childhood Vitiligo. *Pediatric Dermatology*, 6(4), 332-335. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.1989.tb00921.x>
- Skowrońska W., Granica S., Dziedzic M., Kurkowiak J., Ziaja M., & Bazyłko A. (2021).** *Arctium lappa* and *Arctium tomentosum*, Sources of *Arctii radix* : Comparison of Anti-Lipoxygenase and Antioxidant Activity as well as the Chemical Composition of Extracts from Aerial Parts and from Roots. *Plants*, 10(1), 78. <https://doi.org/10.3390/plants10010078>
- Takasugi M., Kawashima S., Katsui N., & Shirata A. (1987).** Two polyacetylenic phytoalexins from *Arctium lappa*. *Phytochemistry*, 26(11), 2957-2958. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84570-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84570-7)
- Tian X., Guo L.-P., Hu X.-L., Huang J., Fan Y.-H., Ren T.-S., & Zhao Q.-C. (2015).** Protective Effects of *Arctium lappa* L. Roots Against Hydrogen Peroxide-Induced Cell Injury and Potential Mechanisms in SH-SY5Y Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35(3), 335-344. <https://doi.org/10.1007/s10571-014-0129-7>
- Toong Y. C., Schooley D. A., & Baker F. C. (1988).** Isolation of insect juvenile hormone III from a plant. *Nature*, 333, 170-171. <https://doi.org/10.1038/333170a0>
- VanEtten H. D., Mansfield J. W., Bailey J. A., & Farmer E. E. (1994).** Two classes of plant antibiotics : Phytoalexins versus « phytoanticipins ». *Plant Cell*, 6(9), 1191-1192. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.9.1191>

**Washino T., Yoshikura M., & Obata S. (1986).** New Sulfur-containing Acetylenic Compounds from *Arctium lappa*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(2), 263-269.  
<https://doi.org/10.1080/00021369.1986.10867375>

**Xu Z., Gu C., Wang K., Ju J., Wang H., Ruan K., & Feng Y. (2015).** Arctigenic acid, the key substance responsible for the hypoglycemic activity of *Fructus Arctii*. *Phytomedicine*, 22(1), 128-137.  
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.11.006>

**Yokota T., Nishio H., Kubota Y., & Mizoguchi M. (1998).** The Inhibitory Effect of Glabridin from Licorice Extracts on Melanogenesis and Inflammation. *Pigment Cell Research*, 11(6), 355-361.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1998.tb00494.x>



## Conclusion générale & perspectives





L'objectif de cette thèse était d'étudier l'impact des conduites culturelles innovantes sur la production de métabolites actifs pour la cosmétique. Nos recherches cherchaient à valoriser la biodiversité locale pour diversifier les usages des végétaux, les outils et les techniques horticoles et à avoir une connaissance précise du patrimoine moléculaire des végétaux d'intérêt en développant des approches d'extraction éco-durable, de purification, d'analyse phytochimique et métabolomique performantes afin d'étendre l'innovation technologique d'objectivation de nouveaux actifs impliqués dans le contrôle du vieillissement cutané.

Suite à l'introduction de l'étude bibliographique dans le **Chapitre I**, sur les principaux groupes de métabolites spécialisés des plantes, des différents modes de culture traditionnels et innovants mis en place et sur la plante modèle étudiée dans ces travaux de thèse, la grande bardane (*Arctium lappa* L.), et aux développements dans le **Chapitre II** des différentes méthodologies et protocoles mis en œuvre, le **Chapitre III** était axé sur les résultats organisés en quatre études.

Notre première étude était consacrée à treize plantes locales et/ou cultivables localement en région Centre-Val de Loire sélectionnées par le consortium du projet ValBioCosm' et à leur réponse aux différents tests d'activités biologiques *in tubo* mis en place dans ces travaux. Les plantes choisies sont donc soit des plantes issues de la biodiversité sauvage, comme la chardon Marie ou la grande bardane, soit des coproduits agricoles, tel que les tourteaux de lin ou les sarments de vigne, soit des plantes d'intérêt horticole, par exemple l'échinacée pourpre et le coléus. Les premiers tests chimiques d'activités antioxydantes *in tubo* ont permis de mettre en avant l'hétérogénéité de réponse des extraits de ces plantes avec des extraits ayant des réponses faibles à l'ensemble des tests, comme l'extrait de racines de chicorée, ou des extraits montrant des capacités antioxydantes élevées indépendamment du test utilisé, tel que les extraits de graines de lin, de sarments de vigne ou de queues de cerise. De la même façon, les tests d'activités enzymatiques ayant pour cible des enzymes impliquées dans les processus de vieillissement cellulaire, tyrosinase, élastase et collagénase, ont montrés des disparités de réponse des extraits et ont servi à réaliser des classifications des extraits en fonction de leur activité inhibitrice envers chacune de ces trois enzymes. Il ressort de ces classifications que les extraits de graines de lin et de feuilles d'alchémille vulgaire possèdent un effet inhibiteur marqué vis-à-vis de la tyrosinase, de l'élastase et de la collagénase comparés aux extraits de racines de bardane, de racines d'échinacée pourpre et de feuilles de gentiane qui montrent les plus faibles capacités d'inhibition des enzymes étudiées. Suite à ces tests, la grande bardane a été choisie comme plante modèle pour les études d'optimisation des extraits par le changement du mode de culture et/ou des conditions de lumières.

La seconde étude s'intéresse à l'un des modes de culture hors sol et biotechnologique, la culture *in vitro* de cals. Cette culture de cals a été initiée à partir de feuilles de bardane et a été réalisée sous différentes élicitations lumineuses, sous lumière blanche, sous lumière rouge, sous lumière bleue et sous lumière infrarouge ainsi qu'une condition à l'obscurité qui a servi de condition contrôle. La teneur en composés phénoliques totaux, à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu, a été évaluée pour chacun des extraits de cals issus de ces élicitations lumineuses de même que les activités antioxydantes *in tubo* déterminées grâce à des tests chimiques. Ces tests ont permis de mettre en avant l'élicitation par la lumière bleue qui semble favoriser à la fois la teneur en composés phénoliques totaux dans les cals et engendre des extraits dont l'activité antioxydante est conséquente.

La troisième étude quant à elle, discutée dans la [Partie 1](#), était axée sur l'évaluation de l'impact à la fois du mode de culture, en comparant la culture de cals, réalisée par le laboratoire BBV de Tours, la culture en hydroponie passive et la culture en hydroponie active, mais aussi de l'élicitation lumineuse sur l'activité anti-tyrosinase d'extraits de grande bardane. Des études ont montré la capacité des extraits de grande bardane à posséder une activité anti-tyrosinase associée à deux molécules : l'arctiine et l'arctigénine. Aussi, nous avons tout d'abord cherché à identifier et quantifier ces deux molécules dans l'ensemble de nos extraits par UHPLC-HRMS. Parmi les trois modes de cultures, la détection de l'arctiine et de l'arctigénine n'a été obtenue que dans les extraits de bardane cultivée en hydroponie passive. La quantification de ces deux molécules dans ces extraits de bardane a permis de mettre en avant l'hétérogénéité d'accumulation de ces composés en fonction de l'organe observé et de la lumière d'élicitation appliquée. Suite à ces observations et à la réalisation de test *in tubo* d'activité envers la tyrosinase, aucune corrélation n'a été prouvée entre la présence d'arctiine et d'arctigénine et l'activité anti-tyrosinase des extraits. Nous avons alors comparé à l'aide du logiciel MetaboliteDetect de Bruker plusieurs chromatogrammes obtenus par UHPLC-ESI-QTOF-HRMS deux à deux dans le but de mettre en évidence et d'identifier une ou deux molécules responsables de l'activité anti-tyrosinase dans nos extraits de bardane cultivée en hydroponie passive. Grâce à ces comparaisons, trois molécules sont identifiées comme potentiellement responsables de l'activité anti-tyrosinase des extraits. Le premier ion a pu être qualifié comme étant une molécule similaire en termes de structure chimique à l'arctigénine. Pour les deux autres molécules, des propositions de formules brutes et/ou des identifications ont pu être avancées.

La quatrième étude, développée dans la Partie 2, est consacrée à l'impact de l'élicitation lumineuse sur l'activité antioxydante des extraits de bardane cultivée en hydroponie active. Des tests d'activités antioxydantes ont été réalisés, tout d'abord *in tubo* avec les tests chimiques DPPH et CUPRAC puis *in vitro* avec du criblage cellulaire sur des cellules de kératinocytes. Les tests chimiques d'activités antioxydantes ont permis de montrer que les extraits échantillonnés à 7 jours de culture sont ceux avec la plus faible capacité antioxydante. De plus pour chaque organe étudié, racine et feuille, les extraits à la lumière d'élicitation bleue démontrent en moyenne une propriété plus antioxydante que les extraits de plantes cultivées à la lumière naturelle au même jour d'échantillonnage. Concernant le test *in vitro* sur des cellules de kératinocytes, l'innocuité des extraits a en premier lieu été vérifiée à l'aide du test de XTT avant de réaliser le test d'activité qui se base sur la capacité des extraits à protéger les cellules de kératinocytes contre les ROS. Nous avons pu observer grâce à ce test que, pour un temps d'échantillonnage donné, les extraits de feuilles de bardane montraient toujours une capacité de protection contre les ROS supérieure à celle des extraits de racines. De plus la capacité de protection, dans le cas des extraits de feuilles, est croissante au cours du temps de culture passant de 20% à T0 à environ 50% à T+21 jours. Pour les extraits de racines, seul l'extrait à 21 jours issu de plantes cultivées sous lumière naturelle présente une capacité de protection de l'ordre de 40%. Pour l'ensemble des extraits, aucune différence significative n'est observée entre les deux modalités d'éclairage au même temps de culture et pour le même organe. Comme pour l'étude précédente, nous avons comparé les chromatogrammes obtenus par UHPLC-ESI-QTOF-HRMS deux à deux à l'aide du logiciel MetaboliteDetect afin d'identifier des molécules pouvant être responsables des effets observés sur la cytotoxicité des extraits et leur capacité protectrice antioxydante. Nous avons étudié les phénomènes de diminution de la cytotoxicité observée en présence des extraits de plantes cultivées sous lumière bleue, d'augmentation de la capacité de protection au cours du temps dans les extraits de racines et de feuilles, de différences de capacité de protection en fonction de la modalité d'éclairage utilisée ou en fonction de l'organe étudié. Pour l'ensemble de ces analyses de nombreuses propositions de formules brutes et d'identification ont pu être émises.

Ce travail de thèse avait pour objectif de démontrer la faisabilité d'un processus de développement méthodologique relevant du « génie des procédés », pour la modulation de la bioproduction de métabolites spécialisés d'intérêt cosmétique par des végétaux en intervenant sur leur mode de culture et leur environnement lumineux. Cette thèse propose des solutions quant à l'investigation d'une plante tant sur le plan analytique que biologique afin de définir des tendances de bioproduction de métabolites spécifiques.



Les modes de culture étudiés ont été choisis en voulant prendre en considération les avantages des méthodes de culture « indoor ». Ces méthodes de cultures sont facilement maitrisables, peuvent être modulées à *façon* par des paramètres de culture personnalisables et ne sont que très peu dépendantes des conditions climatiques. Elles présentent d'autant plus d'intérêt dans un contexte actuel écologique et éco-responsables de substituts aux méthodes de culture traditionnelles qui génèrent, pour certaines, des impacts négatifs sur l'environnement. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à deux modes de cultures hors sol qui ont été retenus en cohérence avec les compétences des équipes académiques et des partenaires industriels du projet :

- La culture *in vitro* d'où l'initiation de cultures de cals qui auront vocation à être stabilisées et à être utilisées pour le passage en suspension cellulaire vers des bioréacteurs. Après avoir personnellement et activement participé à l'initiation des cultures, la seconde phase concernant le passage en suspension cellulaire puis en bioréacteurs et la partie du laboratoire BBV de Tours.
- La culture hydroponique, tout d'abord à l'échelle du laboratoire avec l'hydroponie passive qui va permettre d'évaluer rapidement la capacité de la plante à croître dans ces conditions d'hydroponie. En effet toutes les plantes ne sont pas forcément cultivables en hydroponie ou certaines demandent plus ou moins de mise au point. Puis le passage en hydroponie active lors d'un transfert à l'échelle pilote avec notre partenaire le CDHR Centre-Val de Loire qui va engendrer un stress plus important du fait que les racines de la plante sont à nues. Ce transfert à notre partenaire du CDHR Centre-Val de Loire permet à la fois d'évaluer l'apport ou non de ce mode de culture pour les producteurs horticulteurs et pépiniéristes de la région en utilisant leurs serres dans des périodes creuses comme l'hiver par exemple, mais aussi de valoriser ce travail en transférant ce *process* de culture à ces producteurs horticulteurs et pépiniéristes adhérents au réseau ASTREDHOR afin de leur donner l'opportunité de diversifier leurs productions.

Le choix de ces deux modes de culture se justifie également sur le choix des plantes qui ont fait l'objet de nos recherches, telles que la grande bardane ou le chardon Marie par exemple, du fait qu'elles sont considérées comme adventices et/ou envahissantes nécessitant alors l'utilisation de désherbants plus ou moins efficaces lors de la rotation des cultures en champs. S'ajoute à cela un risque de dissémination élevé et donc de potentiels problèmes à prévoir avec les autres agriculteurs qui pourraient voir d'un très mauvais œil la culture en plein champs à l'échelle industrielle de ce type de plantes.

Nous avons également fait le choix, afin de moduler la production de métabolites spécialisés, d'intervenir sur leur environnement avec l'application d'un stress. Notre choix s'est naturellement porté sur un stress de type abiotique, en l'occurrence dans nos études la mise en place d'élévation lumineuse, qui est a priori plus aisée à mettre en œuvre et à contrôler en termes d'intensité, de qualité et de durée, et donc plus quantifiable et plus reproductible que le stress biotique. En effet, ce dernier nécessite de maîtriser le développement d'un organisme pathogène ou d'en extraire des molécules, qui ne sont pas toujours quantifiables, ou encore d'avoir recours à des molécules messagères qui peuvent ne pas être spécifiques de la source du stress envisagé. Parmi les sources de stress abiotique, la lumière est un paramètre de choix car il est peu coûteux et riche dans ces possibilités de réglages en termes d'intensité, de qualité et de durée notamment.

Les résultats obtenus dans ces travaux ont ainsi permis le développement de nouvelles méthodes de culture et d'élévation lumineuse de plantes pour des applications cosmétiques. Ces méthodes de culture apportent la possibilité d'utiliser des lieux de production non adaptés à la culture agricole comme des friches industrielles ou des toitures d'immeuble par exemple car ce sont des cultures dites hors sol. Tous les paramètres de cultures sont alors standardisés et maîtrisables et offrent la possibilité de produire de manière « verte » c'est-à-dire sans intrants, en culture biologique, même si aujourd'hui aucun label agriculture biologique n'existe tant pour les cultures *in vitro* que pour l'hydroponie. Les entreprises cosmétiques recherchent des circuits courts avec une traçabilité et un contrôle qualité efficaces pour répondre aux demandes du consommateur soucieux de l'environnement et de produits « made in France » ou locaux, ce qui est une valeur ajoutée. L'usage de techniques de cultures plus coûteuses que la production en champs peut être justifiée par des difficultés de culture de la plante dues par exemple à une saisonnalité différente de celle de la région d'origine de la plante. La production en continu sur l'année, la maîtrise de leur contenu en métabolites, la régularité de production, le contrôle des pathogènes, l'accès facilité aux différents organes de la plante sont autant d'avantages qui peuvent contrebalancer le surcoût. En effet, la possibilité d'envisager plusieurs récoltes par an, contrairement aux cultures classiques peut être un avantage en termes de productivité. Le surcoût de production pourra alors être compensé par le coût élevé des molécules, par exemple la vinblastine à 25 millions de dollar/kg, notamment grâce à un moyen de production plusieurs fois dans l'année avec des rendements fixes, car non dépendant des conditions climatiques. Dans ce contexte, lors de nos études nous avons notamment pu observer une activité d'inhibition de l'enzyme tyrosinase de l'ordre de 20 à 50% pour nos extraits de bardane cultivée en hydroponie active. De la même façon lors de la culture de la bardane en hydroponie passive, les extraits de feuilles exposées à la lumière rouge accumulaient beaucoup plus d'arctigénine mais surtout d'arctine que les autres extraits.

Alors que ces travaux de thèse constituent un point de départ dans l'étude des modes de culture et de l'élicitation lumineuse, de nombreuses investigations supplémentaires pourront être menées en prolongement.

Tout d'abord, lors des analyses UHPLC-ESI-QTOF-HRMS un seul mode d'ionisation a été utilisé, le mode d'ionisation positif. Ce mode d'ionisation a été choisi pour ses avantages d'informations structurales notamment du point de vue de la MS/MS et de la fragmentation in source. Ces avantages ont également été des inconvénients dans le cadre de la recherche d'indentification de molécule inconnue. L'analyse par ionisation en mode négatif aurait permis en premier lieu d'avoir une meilleure stabilité de l'ion parent et en second lieu d'éviter les adduits tels que le sodium. En effet, dans le cas de notre étude phytochimique, nous avons été soumis à des difficultés d'indentifications et de propositions de formule brute avec la présence d'adduits sodium difficiles à confirmer sans la présence de l'ion  $[M+H]^+$ . De plus, ces formes adduit sodium sont par la suite très compliquées à fragmenter.

De la même façon, une approche métabolomique a été initiée mais devra être confirmée et validée par des études complémentaires sur les outils statistiques utilisés.

Ensuite, il serait intéressant de développer l'étude sur l'activité anti-tyrosinase des extraits et d'identifier grâce à des interactions ligand/enzyme la ou les molécules de nos extraits responsables de cette activité. Pour cela, une étude de TLC-Bioautography pour Thin Layer Chromatography pourrait être appliquée. Ce type d'étude repose sur le couplage de la chromatographie sur couche mince (CCM) et d'une réaction biologique *in situ* sur le support. Le principe de cette méthodologie fait appel à une séparation par CCM des extraits à analyser suivi par une détection biologique par l'application d'une solution des cibles biologiques telles que l'enzyme tyrosinase. Après une réaction *in situ* sur la plaque CCM, les zones bioactives peuvent être visualisées avec et/ou sans étape de dérivation. Ces zones pourront par la suite être analysées directement sur plaque grâce à un couplage TLC-MS ou recueillies puis solubilisées en vue d'une analyse TLC-MS off-line.

De plus, une approche de criblage d'interaction enzymes-ligands basée sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS pourra être appliquée. Ce type d'approche appelée ENALDI pour Enzyme-coupled Nanoparticles-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry a été développée au

sein de l'équipe « Stratégies Analytiques, Affinités et Bioactifs » (SAAB) de l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) en 2014. Cette méthodologie repose sur le principe d'immobilisation d'enzymes sur un support solide magnétique compatible avec le mode d'ionisation SALDI pour Surface Assisted Laser Desorption/Ionisation. L'enzyme choisie est alors immobilisée sur des billes magnétiques grâce à la formation de liaison covalente. Cette méthodologie est aujourd'hui développée vis-à-vis des enzymes tyrosinase et élastase mais pourra être élargie à d'autres enzymes telles que la collagénase ou la hyaluronidase, deux enzymes impliquées dans la dégradation respectivement du collagène responsable de la fermeté de la peau et de l'acide hyaluronique qui assure l'hydratation.

Il sera important de compléter et de finaliser les données phytochimiques, biologiques et technico-économiques pour valider ou invalider l'intérêt d'une culture de la bardane en condition d'hydroponie active semi-industrielle de biomasse en serre, élicitée par la lumière bleue en complément de la lumière naturelle.

L'ensemble des techniques et protocoles réalisés dans ces travaux de thèse pourra être appliqué aux autres plantes du projet. Notamment le chardon Marie et l'échinacée pourpre, deux plantes qui ont été sélectionnées en deuxième choix derrière la grande bardane et pour lesquelles des cultures de cals et des cultures en hydroponie passive sous élévation lumineuse ont déjà été initiées.

Idéalement une biomasse doit s'intégrer au plus vite dans une approche de sourcing local et éco-responsable avec l'élaboration d'un abaque économique permettant une meilleure maîtrise des différents modes de production possibles de façon à rendre les procédures de production et d'obtention des extraits et/ou de molécules viables et rentables d'un point de vue économique. L'intégration au plus tôt de composantes technico-économiques telles que la traçabilité des filières végétales, la qualité, les coûts de production, le bilan énergétique et l'historique d'exploitation de la biomasse d'intérêt devra donc être abordée avec les partenaires industriels dès le début d'un futur projet. En effet, cette connaissance lorsqu'elle est connue très en amont, permet d'anticiper les stratégies à mettre en place pour réaliser un transfert d'échelle et ainsi de renforcer la participation des industriels dans la stratégie globale du projet. Les départements R&D de ces grands groupes opèrent leur stratégie de développement en interne, de façon autonome, selon des contraintes réglementaires, marketing et économiques qui vont bien au-delà de la considération scientifique et/ou académique.

Ce processus circulaire, répondant à une demande globale d'analyse de plantes avec des méthodologies clés en main, comprenant l'expérimentation de modes de culture variés associés à la modulation lumineuse ainsi que l'évaluation des contenus en métabolites et l'impact sur les activités biologiques a été appliqué à une plante modèle. Il est maintenant mis à la disposition de la communauté scientifique et industrielle, et permettra de poursuivre des objectifs tant appliqués, pour l'amélioration de la production d'un métabolite en quantité et en régularité, que fondamentaux, afin d'élucider des voies métaboliques de production de molécules de défenses.





# Annexes







**Annexe 1** : Tableau regroupant l'énergie de collision employée pour la fragmentation, la liste des ions fragments MS/MS avec leur m/z et leur intensité ainsi que les propositions de formules brutes de l'outil Smart Formula pour la forme [M+Na]<sup>+</sup> pour les trois ions mis en évidence comme potentiellement responsables de l'activité tyrosinase des extraits de bardane cultivée en hydroponie passive et sous élévation lumineuse

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Énergie de collision (eV)	Liste des ions fragments MS/MS		Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+Na] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula
				m/z	Intensité	
1	4,2	395,1308	25 à 50			C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>
						C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>10</sub> O <sub>3</sub>
				185,0412	2712	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
				232,0707	6046	C <sub>10</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S
				233,0775	5406	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> S
				395,1304	13298	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>
				396,1332	2517	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>
2	6,2	466,2428	25 à 50			C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> S
						C <sub>14</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> OS <sub>4</sub>
				100,0756	6307	
				128,0707	41549	
				129,0722	2301	
				163,0386	1152	C <sub>22</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>8</sub>
				186,0755	1295	C <sub>23</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>
				362,1961	3714	C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> N <sub>9</sub>
				420,2390	3564	C <sub>19</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>8</sub> S
				421,2405	1234	C <sub>23</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>
3	10,9	229,1221	Pas d'ions fragments disponibles	466,2427	30568	
				467,2466	8324	
				468,2489	1539	
						C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> S

**Annexe 2 :** Tableau regroupant l'énergie de collision employée pour la fragmentation, la liste des ions fragments MS/MS avec leur m/z et leur intensité ainsi que les propositions de formules brutes de l'outil Smart Formula pour la forme  $[M+Na]^+$  pour les sept ions mis en évidence comme potentiellement responsables de la diminution de la cytotoxicité observée avec les extraits de bardane cultivée en hydroponie active sous lumière bleue

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Énergie de collision (eV)	Liste des ions fragments MS/MS		Propositions de formules brutes obtenues pour la forme $[M+Na]^+$ avec l'outil Smart Formula
				m/z	Intensité	
1	4,78	380,2065	35	100,0758	4992	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> C <sub>19</sub> H <sub>35</sub> NOS <sub>2</sub>
				128,0707	29711	
				129,0730	2292	
				131,0851	556	
				133,0656	593	
				157,1019	580	
				159,1152	686	
				312,1447	550	
				334,2011	1687	
				380,2071	514	
2	5,98	464,2282	35	100,0759	4588	C <sub>23</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub> C <sub>20</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>3</sub> C <sub>16</sub> H <sub>39</sub> N <sub>7</sub> OS <sub>3</sub> C <sub>20</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> N <sub>9</sub> C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>8</sub> S C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> N <sub>11</sub> O <sub>2</sub> S C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> C <sub>15</sub> H <sub>35</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> S C <sub>12</sub> H <sub>31</sub> N <sub>11</sub> O <sub>7</sub> C <sub>9</sub> H <sub>23</sub> N <sub>21</sub> O
				128,0706	48978	
				129,0732	3229	
				131,0855	624	
				142,0793	586	
				157,1013	975	
				183,1171	828	
				186,0761	872	
				316,1897	883	
				362,1958	771	
				418,2214	7685	
				419,2251	1934	
				464,2276	3232	
				465,2311	945	
3	11,56	221,1899	25	105,0705	1027	Pas de proposition de formule brute
				119,0856	637	
				133,1008	459	
				147,1166	1003	

Suite *Annexe 2*

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Énergie de collision (eV)	Liste des ions fragments MS/MS		Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+Na] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula
				m/z	Intensité	
4	16,44	299,0469	Pas d'ions fragments disponibles			C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>8</sub> OS <sub>2</sub> C <sub>21</sub> H <sub>8</sub> O C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N <sub>12</sub> O <sub>2</sub> C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub>
5	17,60	310,3046	35	95,0836	484	Pas de proposition de formule brute
				97,0628	679	
				100,0742	470	
				107,0833	1596	
				109,1000	827	
				111,0782	829	
				114,0898	794	
				121,0989	1692	
				125,0939	544	
				135,1140	1375	
6	18,05	567,4035	35	149,1300	557	C <sub>35</sub> H <sub>60</sub> S <sub>2</sub> C <sub>35</sub> H <sub>52</sub> N <sub>4</sub> O C <sub>34</sub> H <sub>56</sub> O <sub>5</sub> C <sub>31</sub> H <sub>60</sub> O <sub>5</sub> S C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S C <sub>20</sub> H <sub>48</sub> N <sub>16</sub> O <sub>2</sub> C <sub>19</sub> H <sub>52</sub> N <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
				105,0667	1652	
				107,0822	1767	
				109,0975	1035	
				119,0817	3342	
				121,0972	2919	
				131,0820	1143	
				133,0967	2706	
				134,0997	469	
				135,1127	1370	
				137,0918	1338	
				143,0815	998	
				145,0966	3697	
				146,1015	598	
				147,1122	2498	
				157,0967	1982	
				159,1114	1464	
				169,0959	750	
				171,1114	1406	
				173,1276	1466	

Suite *Annexe 2*

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Énergie de collision (eV)	Liste des ions fragments MS/MS		Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+Na] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula
				m/z	Intensité	
Suite 6	18,05	567,4035	35	175,1427	855	
				181,0956	526	
				183,1110	1079	
				185,1268	1017	C <sub>35</sub> H <sub>60</sub> S <sub>2</sub>
				187,1433	784	C <sub>35</sub> H <sub>52</sub> N <sub>4</sub> O
				197,1268	1126	C <sub>34</sub> H <sub>56</sub> O <sub>5</sub>
				199,1423	558	C <sub>31</sub> H <sub>60</sub> O <sub>5</sub> S
				209,1267	658	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S
				211,1406	770	C <sub>20</sub> H <sub>48</sub> N <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
				221,1269	533	C <sub>19</sub> H <sub>52</sub> N <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
				223,1412	732	
				571,4017	1490	
7	18,54	797,5689	45	121,0990	628	
				135,1133	610	
				145,0472	473	
				185,0375	1355	
				203,0473	732	
				243,0781	844	
				261,2146	879	
				335,2495	2059	C <sub>50</sub> H <sub>78</sub> O <sub>6</sub>
				336,2531	790	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub>
				497,2979	1368	C <sub>51</sub> H <sub>74</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
				519,2795	50889	C <sub>43</sub> H <sub>78</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S
				520,2827	17180	C <sub>42</sub> H <sub>82</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S
				521,2860	3076	C <sub>51</sub> H <sub>82</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>
				635,4501	675	C <sub>43</sub> H <sub>86</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>3</sub>
				797,4972	115207	
				797,9125	1410	
				798,1672	832	
				798,5002	75054	
				799,5036	23682	
				800,5064	4989	
				801,5074	729	

**Annexe 3** : Tableau regroupant l'énergie de collision employée pour la fragmentation, la liste des ions fragments MS/MS avec leur m/z et leur intensité ainsi que les propositions de formules brutes de l'outil Smart Formula pour la forme  $[M+Na]^+$  pour les deux ions potentiellement responsables de l'augmentation de la protection des kératinocytes contre les ROS au cours du temps dans les racines et pour lesquels aucune correspondance n'a été trouvée dans la base de données LOTUS

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Énergie de collision (eV)	Liste des ions fragments MS/MS		Propositions de formules brutes obtenues pour la forme $[M+Na]^+$ avec l'outil Smart Formula
				m/z	Intensité	
2	17,37	338,3529	25	121,1050	474	Pas de proposition de formule brute
				135,1208	863	
				341,2754	445	
5	18,90	685,4950	25	429,0839	1124	C <sub>47</sub> H <sub>66</sub> O <sub>2</sub> C <sub>40</sub> H <sub>66</sub> N <sub>6</sub> S C <sub>39</sub> H <sub>70</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S
				430,0836	567	
				684,1937	876	
				685,4269	81215	
				686,4303	43592	
				687,4335	10095	
				688,439	1336	
				703,4389	842	
				726,4522	2892	
				727,4576	1401	

**Annexe 4 :** Tableau regroupant l'énergie de collision employée pour la fragmentation, la liste des ions fragments MS/MS avec leur m/z et leur intensité ainsi que les propositions de formules brutes de l'outil Smart Formula pour la forme  $[M+Na]^+$  pour les cinq ions potentiellement responsables de l'augmentation de la protection des kératinocytes contre les ROS au cours du temps dans les feuilles et pour lesquels aucune correspondance n'a été trouvée dans la base de données LOTUS

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Énergie de collision (eV)	Liste des ions fragments MS/MS		Propositions de formules brutes obtenues pour la forme $[M+Na]^+$ avec l'outil Smart Formula
				m/z	Intensité	
1	0,88	144,1021		Pas d'ions fragments disponibles		Pas de proposition de formule brute
2	2,74	120,0808		Pas d'ions fragments disponibles		Pas de proposition de formule brute
3	3,69	188,0708	35	115,0536	836	Pas de proposition de formule brute
				117,0578	520	
				118,0654	1198	
				143,0726	813	
4	6,49	446,2171	45	100,0756	993	C23H29N5NaO3 C19H37NNaO7S C23H37NNaO2S2
				103,0544	1310	
				105,0696	1656	
				115,0540	1083	
				117,0702	1501	
				119,0848	583	
				121,0652	534	
				128,0698	12508	
				129,0707	2683	
				131,0849	1855	
				135,0798	564	
				141,0703	1896	
				142,0769	2066	
				143,0860	1624	
				145,0650	676	
				145,1005	680	
				153,0697	1782	
				154,0862	32544	
				155,0872	4387	
				156,0909	759	
				157,1007	1110	
				167,0846	602	
				168,0932	2129	
				182,0813	1089	
				183,1165	1871	
				200,0921	5649	

Suite *Annexe 4*

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Énergie de collision (eV)	Liste des ions fragments MS/MS		Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+Na] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula
				m/z	Intensité	
5	8,19	349,1649	45	91,0537	564	C18H22N4NaO2
				103,0540	3181	
				105,0701	5211	
				106,0727	612	
				107,0495	525	
				115,0544	6685	
				116,0601	1559	
				117,0698	3914	
				118,0748	585	
				119,0849	1575	
				121,0646	918	
				127,0541	791	
				128,0621	14385	
				129,0695	10571	
				130,0764	2199	
				131,0856	5908	
				132,0892	707	
				133,0650	878	
				141,0698	10969	
				142,0773	8976	
				143,0851	8224	
				144,0910	2070	
				145,0651	1604	
				145,1010	3849	
				152,0620	2951	
				153,0699	14081	
				154,0757	3740	
				155,0600	2328	
				155,0854	11772	
				156,0911	2988	
				157,1010	3451	
				158,1067	643	
				159,0798	817	
				159,1168	655	
				165,0701	2116	



Suite *Annexe 4*

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Énergie de collision (eV)	Liste des ions fragments MS/MS		Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+Na] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula
				m/z	Intensité	
Suite 5	8,19	349,1649	45	166,0764	992	C18H22N4NaO2
				167,0855	4062	
				168,0933	10705	
				169,0652	761	
				169,0990	1676	
				171,0815	869	
				171,1175	893	
				173,0944	553	
				173,1316	785	
				178,0781	1160	
				181,0643	773	
				183,1163	3002	
				201,1289	550	



**Annexe 5 :** Tableau regroupant l'énergie de collision employée pour la fragmentation, la liste des ions fragments MS/MS avec leur m/z et leur intensité ainsi que les propositions de formules brutes de l'outil Smart Formula pour la forme  $[M+Na]^+$  pour les quatre ions potentiellement responsables des différences de protection des kératinocytes contre les ROS observées en fonction de l'organe étudié et pour lesquels aucune correspondance n'a été trouvée dans la base de données LOTUS

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Énergie de collision (eV)	Liste des ions fragments MS/MS		Propositions de formules brutes obtenues pour la forme $[M+Na]^+$ avec l'outil Smart Formula
				m/z	Intensité	
1	6,01	464,2283	25	100,0753	1165	C <sub>23</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub> C <sub>20</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>3</sub> C <sub>16</sub> H <sub>39</sub> N <sub>7</sub> OS <sub>3</sub> C <sub>20</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>8</sub> S C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> N <sub>11</sub> O <sub>2</sub> S C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> N <sub>9</sub> C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> C <sub>12</sub> H <sub>31</sub> N <sub>11</sub> O <sub>7</sub> C <sub>9</sub> H <sub>23</sub> N <sub>21</sub> O
				128,0705	19191	
				129,0733	1191	
				186,0753	905	
				217,0825	1129	
				362,1949	2954	
				363,2009	766	
				418,2216	7349	
				419,2260	2308	
				464,2278	36411	
				465,2308	11812	
				466,2343	2269	
3	12,92	353,2685	45	91,0541	709	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub>
				93,0700	614	
				95,0854	1048	
				105,0704	1445	
				107,0856	2203	
				109,1006	883	
				115,0539	532	
				117,0694	1302	
				119,0851	1152	
				121,1005	1105	
				131,0857	2614	
				133,1009	1044	
				135,1161	1036	
				145,1011	1495	
				149,1315	603	
4	17,60	310,3045	35	159,1160	567	Pas de proposition de formule brute
				95,0836	484	
				97,0628	679	
				100,0742	470	
				107,0833	1596	
				109,1000	827	
				111,0782	829	

Suite *Annexe*

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Énergie de collision (eV)	Liste des ions fragments MS/MS		Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+Na] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula
				m/z	Intensité	
Suite 4	17,60	310,3045	35	114,0898	794	Pas de proposition de formule brute
				121,0989	1692	
				125,0939	544	
				135,1140	1375	
				149,1300	557	
5	18,05	567,4152	35	105,0667	1652	C <sub>38</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub> C <sub>34</sub> H <sub>52</sub> N <sub>6</sub> C <sub>33</sub> H <sub>56</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> C <sub>30</sub> H <sub>60</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S C <sub>26</sub> H <sub>56</sub> N <sub>8</sub> O <sub>2</sub> S C <sub>19</sub> H <sub>48</sub> N <sub>18</sub> O C <sub>18</sub> H <sub>52</sub> N <sub>14</sub> O <sub>5</sub>
				107,0822	1767	
				109,0975	1035	
				119,0817	3342	
				121,0972	2919	
				131,0820	1143	
				133,0967	2706	
				134,0997	469	
				135,1127	1370	
				137,0918	1338	
				143,0815	998	
				145,0966	3697	
				146,1015	598	
				147,1122	2498	
				157,0967	1982	
				159,1114	1464	
				169,0959	750	
				171,1114	1406	
				173,1276	1466	
				175,1427	855	
				181,0956	526	
				183,1110	1079	
				185,1268	1017	
				187,1433	784	
				197,1268	1126	
				199,1423	558	
				209,1267	658	
				211,1406	770	
				221,1269	533	
				223,1412	732	
				571,4017	1490	

**Annexe 6 :** Tableau regroupant l'énergie de collision employée pour la fragmentation, la liste des ions fragments MS/MS avec leur m/z et leur intensité ainsi que les propositions de formules brutes de l'outil Smart Formula pour la forme  $[M+Na]^+$  pour les quatorze ions potentiellement responsables de la capacité de protection des kératinocytes contre les ROS observée dans les extraits de racines et de feuille de bardane et pour lesquels aucune correspondance n'a été trouvée dans la base de données LOTUS

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Énergie de collision (eV)	Liste des ions fragments MS/MS		Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+Na] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula
				m/z	Intensité	
1A	2,76	120,0807		Pas d'ions fragments disponibles		Pas de proposition de formule brute
1B	2,76	166,0861	35	102,0465	518	Pas de proposition de formule brute
				103,0544	12087	
				104,0576	1369	
				118,0654	542	
				119,0725	493	
				120,0810	8789	
				121,0847	714	
4A	9,93	223,0637	35	225,0424	797	Pas de proposition de formule brute
				227,0232	1739	
5	10,15	274,2742	25	102,0914	4456	Pas de proposition de formule brute
				106,0864	12419	
				107,0890	659	
				212,2369	795	
				230,2480	2865	
				231,2513	648	
				256,2632	16779	
				257,2670	3987	
				274,2742	85049	
				275,2777	21377	
6A	12,52	223,0634	25	276,2798	1807	Pas de proposition de formule brute
				225,0422	1323	
				226,0416	507	
6B	12,52	337,0745	35	227,0242	523	C <sub>23</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>
				265,132	130	
7	13,45	226,2165	25	107,0862	522	Pas de proposition de formule brute
9	14,42	411,0932	25	411,0927	748	C <sub>26</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> S
				412,0945	233	
				413,0868	166	
				413,2842	166	
10	16,64	228,2326		Pas d'ions fragments disponibles		Pas de proposition de formule brute

Suite *Annexe 6*

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Énergie de collision (eV)	Liste des ions fragments MS/MS		Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+Na] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula
				m/z	Intensité	
11A	15,11	254,2488	35	91,0539	3137	Pas de proposition de formule brute
				93,0696	3814	
				95,0853	5031	
				97,0646	5568	
				97,1011	2697	
				100,0756	4888	
				100,1122	1923	
				105,0698	2266	
				107,0855	14652	
				108,0887	816	
				109,1009	5158	
				111,0804	6196	
				111,1167	1210	
				114,0915	4034	
				114,1278	1599	
				119,0857	988	
				121,1009	10586	
				122,1040	956	
				123,1166	947	
				125,0956	4267	
				128,1071	1235	
				128,1436	1304	
				133,1011	587	
				135,1162	5980	
				139,1110	1654	
				142,1581	732	
				149,1320	2137	
				153,1272	524	
				156,1747	628	
				163,1485	566	
				170,1907	943	
				212,2370	4486	
				213,2391	654	

Suite *Annexe 6*

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Énergie de collision (eV)	Liste des ions fragments MS/MS		Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+Na] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula
				m/z	Intensité	
12	15,33	242,2478	25	102,0913	491	Pas de proposition de formule brute
				114,0916	112	
				116,1069	529	
				130,1205	223	
				158,1542	184	
				163,1464	117	
				242,2474	3325	
				243,2511	800	
13A	15,62	263,2375	25	95,0855	1000	Pas de proposition de formule brute
				107,0861	793	
				109,1011	1480	
				119,0857	955	
				123,1171	868	
				133,1012	1277	
				135,1167	487	
				147,1179	702	
				163,1473	487	
13B	15,62	280,2644	25	263,2388	542	Pas de proposition de formule brute
				91,055	118	
				95,0857	525	
				97,0644	225	
				100,0761	193	
				105,07	220	
				106,0731	104	
				107,086	214	
				109,1013	553	
				110,1048	116	
				111,0807	290	
				111,1171	146	
				114,0919	315	
				119,0863	276	
				121,1011	461	
				123,0792	168	
				123,1174	665	
				128,1085	117	
				133,1013	488	
				134,1044	170	

Suite *Annexe 6*

Numéro de pic	Temps de rétention (min)	m/z	Énergie de collision (eV)	Liste des ions fragments MS/MS		Propositions de formules brutes obtenues pour la forme [M+Na] <sup>+</sup> avec l'outil Smart Formula
				m/z	Intensité	
Suite 13B	15,62	280,2644	25	135,1172	419	Pas de proposition de formule brute
				137,0966	208	
				137,1323	224	
				139,1123	148	
				147,1175	507	
				149,0224	139	
				149,1321	379	
				161,1319	201	
				163,1481	272	
				174,9024	152	
				175,1485	189	
				176,1519	123	
				177,1641	171	
				189,1649	141	
				192,914	109	
				210,922	357	
				228,931	153	
				233,9372	120	
13C	15,62	302,2460	35	105,0177	181	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> NO
				135,0294	108	
				135,117	116	
				151,0241	249	
				153,0025	102	
				153,0389	174	
				155,0202	242	
				169,0342	401	
				171,0143	271	
				185,0306	463	







Laurine GARROS

## Impact de conduites culturelles innovantes sur la production de métabolites actifs pour la Cosmétique

### Résumé

La valorisation de la richesse de la biodiversité régionale et la mise en place d'une démarche durable dans la production de bioactifs répond au besoin de l'industrie cosmétique dans un contexte réglementaire contraignant. Ce projet s'inscrit dans une démarche de valorisation du patrimoine végétal et de l'industrie locale de la région Centre-Val de Loire.

Dans le cadre de ce projet, 13 plantes ou leurs co-produits issus de la biodiversité locale ou d'intérêt pour la filière horticole ont été sélectionnés et étudiés. Des tests *in tubo* ont été effectués sur les extraits de ces 13 plantes afin de mettre en évidence de potentielles activités antiâges contre des enzymes telles que la tyrosinase, l'élastase et la collagénase et/ou antioxydantes d'intérêt pour l'industrie cosmétique. Les résultats de ces tests ont permis de sélectionner une plante modèle ayant des activités différentes afin d'évaluer l'apport d'une élévation sur l'augmentation de ses activités.

Dans ce contexte, la réalisation de cultures classiques en hydroponie passive ou innovantes en hydroponie active ainsi qu'avec des cals *in vitro* avec des élévisions lumineuses grâce à des systèmes de lampe à LED de couleur bleue, rouge ou blanche a été effectuée sur la bardane (*Arctium lappa* L.). Chaque organe de la plante élévisée a été séparé et extrait aux ultrasons. La caractérisation de l'empreinte moléculaire de chaque extrait a été réalisée par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse haute résolution (UHPLC-ESI-QTOF-HRMS/MS) afin d'identifier leur contenu et leur variabilité moléculaire en fonction de l'organe et/ou de l'élévation étudié. Parallèlement, l'influence de l'élévation sur les activités d'intérêt cosmétique particulièrement les activités anti-tyrosinase et anti-ROS a été évaluée.

**Mots clés :** cals, hydroponie, élévation, LED, bardane, *Arctium lappa*, UHPLC-ESI-QTOF-HRMS/MS, tyrosinase, ROS

## Impact of innovative culture methods on the production of active metabolites for Cosmetics

### Abstract

The valuing of regional biodiversity richness and the implementation of a sustainable approach in the production of bioactives meets the needs of the cosmetic industry in a restrictive regulatory context. This project is part of an approach to promote the plant heritage and local industry of the Centre-Val de Loire region.

As part of this project, 13 plants or their co-products from local biodiversity or of interest for the horticultural industry were selected and studied. *In tubo* tests were carried out on the extracts of these 13 plants in order to highlight potential anti-aging activities against enzymes such as tyrosinase, elastase and collagenase and/or antioxidants of interest for the cosmetic industry. The results of these tests allowed the selection of a model plant with different activities in order to assess the contribution to an elicitation on the increase of its activities.

In this context, the realization of classic cultures in passive hydroponics or innovative in active hydroponics as well as *in vitro* callus with light elicitation thanks to LED lamp systems of blue, red or white color was carried out on burdock (*Arctium lappa* L.). Each organ of the elicited plant was separated and extracted with ultrasound. The characterization of the molecular fingerprint of each extract was achieved by liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (UHPLC-ESI-QTOF-HRMS/MS) in order to identify their content and molecular variability according to the organ and/or elicitation studied. At the same time, the influence of the elicitation on the activities of cosmetic interest, particularly anti-tyrosinase and anti-ROS activities, was evaluated.

**Keywords :** callus, hydroponics, elicitation, LED, burdock, *Arctium lappa*, UHPLC-ESI-QTOF-HRMS/MS, tyrosinase, ROS



Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA)  
CNRS UMP 7311  
Université d'Orléans  
BP 6759  
45067 Orléans Cedex 2



CAUDALIE

