

SOMMAIRE

Liste des abréviations	12
Liste des figures	13
Liste des tableaux	14
Introduction	15
I. Contexte	16
1. La filière PPAM en France	16
2. Activités de l'organisme d'accueil	17
3. Spécificité du laboratoire	17
II. Objet de l'étude	18
1. Caractérisation totale d'extraits polaires	18
2. Un outil industriel	18
3. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	19
4. La dérivation	20
5. Dérivation par oximation puis triméthylsilylation	20
6. Analyses de composés variés en GC-MS	22
6.1. Les sucres	22
6.2. Les acides organiques et aminés	24
6.3. Les composés phénoliques	24
III. La mélisse officinale	26
1. Place dans la systématique	26
2. Description botanique	27
2.1. Caractéristiques macroscopiques	27
2.2. Caractères microscopiques	28
3. Culture et habitat	30
4. Composition chimique	31
4.1. Composés phénoliques	31
4.2. Composés terpéniques	37
4.3. Autres composés	38
5. Biosynthèse des composés phénoliques majeurs	39
6. Méthodes d'analyse classiques de <i>M. officinalis</i>	41
IV. Matériel et méthode	45
1. Matières premières	45
1.1. Solvants et réactifs	45
1.2. Standards analytiques	45
1.3. Étalon interne	45
1.4. Échantillons	46
2. Préparation de la matière à examiner	46
3. Préparation des dérivés oximes-TMS	48
3.1. Prises d'essai	48
3.2. Dérivation par oximation et silylation	49
3.3. Étalonnage interne	50
4. Analyses en GC-MS	51
4.1. Appareillage de GC-MS	51
4.2. Méthode d'analyse	51
5. Optimisation de la méthode de séparation des dérivés ester/éther tms-oxime	52
6. Identification spectrales	54

V. Résultats	55
1. Profils chromatographiques et identification des analytes	55
2. Étude de spectres de composés complexes	57
3. Analyses quantitatives	58
3.1. Résultats de l'essai 1	59
3.2. Résultats de l'essai 2	59
4. Robustesse de la méthode appliquée à <i>M. officinalis</i>	60
VI. Discussion et perspectives	60
VII. Conclusion	64
Références bibliographiques	65
Annexe I	68
Annexe II : Conditions chromatographiques méthode TMS4acc2	68
Annexe III. Chromatogramme des dérivés oximes-TMS de composés polaires de la mélisse	69
SERMENT DE GALIEN	71

Liste des abréviations

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

HDMS : Hexamethyldisilazane

IE : impact électronique

IK : Indice de Kovats

m/z : rapport masse sur charge

ng : nanogramme

PE : prise d'essai

RI : indice de rétention

LOD : limite de detection

LOQ : limite de quantification

SFI : Select Fragment Ion

SIM : Selected Ion Monitoring

TMS : triméthylsilyl, triméthylsilylés

TFA : acide trifluoroacétique

TIC : Total Ion Chromatogram

PPAM : Plantes aromatiques, médicinales et à parfums

VI : volume d'injection

Liste des figures

- Figure 1. Silylation par l'HDMS : $Y = O, S, NH, NR', COO,$ $R, R' = Alkyl, Aryl.$ (9)
- Figure 2. Schéma de fragmentation du lactitol (4-O- α -D-Galactopyranosyl-D-glucitol) (19)
- Figure 3. Rameau de mélisse officinale (A) ; Verticille de fleurs de mélisse (B) (32)
- Figure 4. Dessin pour l'identification B de la feuille de mélisse pulvérisée (33)
- Figure 5. Structure des acides phénoliques présents dans la mélisse
- Figure 6-1. Structures des métabolites secondaires de *M. officinalis* (correspondance avec le Tableau 1)
- Figure 6-2. Structures des métabolites secondaires de *M. officinalis* (correspondance avec le Tableau 1) (Suite)
- Figure 6-3. (Suite) Structures des métabolites secondaires de *M. officinalis* (correspondance avec le Tableau 1)
- Figure 7. Biosynthèse des acides cinnamiques oxygénés (d'après 36)
- Figure 8. Voie de biosynthèse de l'acide rosmarinique et de l'acide chlorogénique (47)
- Figure 9 : Schéma général d'une plaque de CCM de *M. officinalis* (33)
- Figure 10 : Profil chromatographique d'un extrait de mélisse (données iteipmai)
- Figure 11. Protocole de traitement d'échantillon à analyser sous forme oxime-TMS par GC-MS
- Figure 12. Protocole de dérivation oxime-TMS
- Figure 13. Outil de mise au point d'un gradient de températures du four de colonne
- Figure 14. Acquisition de chromatogramme en mode TIC
- Figure 15. Chromatogrammes d'extraits d'oignon (A) et d'artichaut (B), acquis en GC-MS avec les méthodes 4acc2 et 9 respectivement
- Figure 16. Chromatogramme de dérivés oximes-TMS de composés polaires de la mélisse et spectre de masse de l'acide rosmarinique
- Figure 17. Chromatogramme d'acquisition et schéma de fragmentation du dérivé oxime-TMS du kampferol
- Figure 18. Traitement des échantillons de feuilles sèches de mélisse
- Figure 19. Chromatogrammes d'extraits de mélisse dérivatisés (triplicat échantillon 1)

Liste des tableaux

Tableau 1. Exemple de zones spécialisées dans la production de PPAM en France (2)

Tableau 2. Principaux constituants isolés et caractérisés dans *M. officinalis* (28)

Tableau 3. Abondance relative des composés organiques volatils par HS-SPME-GC-MS (44)

Tableau 4. Métabolites détectés par GC-MS et identifiés par le Golm Metabolome Database (5)

Tableau 5. Gradient de la phase stationnaire pour l'analyse HPLC de *M. officinalis* (33)

Tableau 6. Analyse bibliographique des prises d'essai pour dérivatisation de différentes matrices

Tableau 7. Paramètres d'acquisition du détecteur MS

Introduction

De tout temps l'Homme a utilisé les plantes pour son habitat, son alimentation et en guise de remèdes. La Pharmacie est étroitement liée aux plantes jusqu'à ce jour avec 40 à 70% des médicaments qui en sont issus (1). On parle depuis une trentaine d'années d'un regain d'intérêt pour les produits naturels, qui s'observe notamment à travers les consommations à l'officine des différents produits de soin annexes aux médicaments : compléments alimentaires, huiles essentielles, cosmétiques, homéopathie, etc. La consommation de produits à base de plantes, qui a toujours existée, bénéficie aujourd'hui d'une mise en lumière par les forces marketing de grandes industries. De plus, il existe de nouvelles voies de valorisation des plantes par transformation et une augmentation des échanges internationaux. Les plantes à parfums, médicinales et aromatiques (PPAM) sont également utilisées dans les secteurs de la parfumerie, des détergents, des produits vétérinaires, de l'agro-alimentaire (arômes, aromates), de l'alimentation animale, des extraits végétaux, des spiritueux, et des produits phytosanitaires (2).

La production de PPAM est un secteur compétitif, soumis à la demande des industriels qui standardisent leurs produits en composés d'intérêt. Cependant les plantes sont des organismes complexes exposées aux variations de l'environnement : leurs conditions de cultures, des stress biotiques et abiotiques, les pratiques agricoles et enfin aux modes opératoires de traitement des plantes récoltées. De ce fait les compositions en métabolites sont susceptibles de varier dans la plante comme dans les produits de transformation.

Pourquoi une meilleure connaissance des métabolites de la plante est un enjeu important pour les différents acteurs de la filière ? Comment caractériser totalement un extrait de plantes contenant une variété importante de molécules en une seule analyse ?

C'est ce à quoi nous tenterons de répondre dans cet exposé, en nous intéressant plus particulièrement à la mélisse, traditionnellement utilisée en thérapeutique, particulièrement riche en antioxydants.

I. Contexte

1. La filière PPAM en France

La France comporte plusieurs bassins de production de PPAM. Des plantes médicinales sont produites depuis le XIX^{ème} dans le Maine et Loire, tandis que les plantes aromatiques sont principalement cultivées en région parisienne et en Provence. La cueillette se fait essentiellement dans les zones montagneuses telles que l'Auvergne, le Morvan ou les Cévennes. La région PACA produit de nombreuses les plantes à parfums. Les acteurs de la filière sont les agriculteurs, indépendants ou réunis en coopératives, ainsi que des entreprises de transformation (surgélation, séchage) et de distribution (2).

Zone ou ville ou région de France	Plantes
Maine et Loire	Valériane, camomille, mélilot, psyllium, pavot, artichaut, ...
Sud est	Lavandes et lavandins
Champagne-Ardenne et Poitou Charentes	Pavot
Sud Ouest	Ginkgo biloba

Tableau 1. Exemple de zones spécialisées dans la production de PPAM en France (2)

En 2014, un total de 42 000 hectares de PPAM a été déclaré avec un peu moins de la moitié constituée par les lavandes et lavandins (2). Leur utilisation croissante se traduit par une augmentation des surfaces de production de 2% par an. La surface de culture des plantes médicinales était estimée à 20 000 hectares en 2014, avec des productions pour l'industrie pharmaceutique (Ginkgo et pavot) et des productions beaucoup plus variées pour les secteurs de santé et bien-être. Les producteurs français commercialisent environ 260 plantes médicinales sur les 562 inscrites à la Pharmacopée.

Pour se distinguer de la concurrence étrangère la production française affiche des labels de qualité (AOC, bio, IGP) et structure sa filière pour consolider son savoir-faire.

2. Activités de l'organisme d'accueil

L'iteipmai œuvre au service de tous les corps de métiers de la filière PPAM. Sa mission est initialement de valoriser le travail des agriculteurs et de sécuriser leurs revenus en leur apportant des données techniques, un appui scientifique et une validation réglementaire. La station de Chemillé-Melay (49) regroupe le siège social, des locaux équipés pour l'expérimentation, les analyses phytochimiques, la collecte et le traitement de l'information ainsi que 12 hectares de terrains d'expérimentation. La seconde station de l'iteipmai, située dans le Sud-Est est spécialisée dans les plantes aromatiques et à parfum et en agriculture biologique.

Les deux pôles d'expérimentation agronomique offrent un appui technique pour la sélection variétale, la mise en place et l'optimisation d'itinéraires techniques, la mise en conformité des systèmes de production et de transformation. Le pôle documentaire du service valorisation de l'institut réalise des synthèses bibliographiques sur des sujets particuliers d'ordres techniques, scientifiques et/ou réglementaires relatifs à la filière, à la demande des adhérents ou pour répondre aux besoins de programmes internes. Le service réalise de l'archivage documentaire et des travaux de veille. L'institut possède un service d'études avec un pôle dédié à la protection des cultures.

Enfin, le service Phytochimie-Normalisation, effectue des analyses de phytochimie pour les programmes d'agronomie et pour des clients externes, des PME et industries citées précédemment.

3. Spécificité du laboratoire

Le laboratoire réalise des analyses de contrôle qualité d'après les méthodes officielles (Pharmacopées française, européenne, ISO) et les méthodes développées par le service à la demande des clients. Il participe à la mise en place des normes et à leur diffusion. Les analyses permettent de valoriser les matières premières ou les produits finis, et de répondre aux réglementations françaises et communautaires des grandes industries.

La mise au point de méthodes analytiques est ainsi réalisée sur différentes formes d'échantillons à analyser : plantes fraîches, sèches, poudre de plantes, extraits liquides, huiles essentielles, dans des médicaments, des compléments alimentaires, des additifs pour alimentation animale et quelques produits cosmétiques à bases de plantes. L'autre volet des prestations concerne les programmes d'agronomie annuels dont les échantillons sont analysés par centaines au laboratoire chaque saison. Le traitement des résultats d'analyses bénéficie de l'expertise des membres du service dans la phytochimie des PPAM et de l'expérience acquise par le cumul des données d'analyses au laboratoire.

Le laboratoire est équipé du matériel pour réaliser les différentes méthodes de chromatographie sur couche mince, en phase liquide et gazeuse. L'équipement de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, permet d'étendre l'offre de service pour les adhérents et les programmes. C'est au sein de ce laboratoire qu'ont été réalisés les essais qui seront décrits.

II. Objet de l'étude

1. Caractérisation totale d'extraits polaires

L'analyse phytochimique des plantes et produits dérivés de la filière PPAM est indispensable pour assurer une qualité de la matière par le dosage des principes actifs, des marqueurs de qualité ou des substances à surveiller. L'homogénéité des échantillons sous forme de liquides polaires se prête à de bonnes qualités d'analyses et représentativités de populations. En effet, les teneurs en eau des plantes pouvant aller jusqu'à plus de 80%, une forte proportion de leurs constituants est soluble dans l'eau. La caractérisation totale d'extraits polaires permettrait de discriminer de nombreux métabolites primaires et secondaires polaires.

L'étude de ces composés est réalisée avec différentes techniques chromatographiques (HPLC, CCM, CPG) et leur identification par comparaison à des témoins. D'autres méthodes permettent une analyse plus étendue à l'exemple de la LC-MSⁿ et de la RMN. Cependant, ces méthodes présentent des limites de reproductibilité inter-laboratoire et de manque de sensibilité, respectivement. À l'instar des analyses métabolomiques en microbiologie, la GC-MS semble être une méthode de choix pour identifier et quantifier un grand nombre de composés simultanément (3,4). Le développement d'une méthode d'analyse des composés polaires de PPAM, sensible et fiable avec des possibilités d'identification facilitées, a des applications prometteuses pour leurs filières d'exploitation.

2. Un outil industriel

La connaissance de la composition de la plante à un instant *t* donné est un outil agronomique qui trouve différentes applications de R&D. A l'exemple de l'analyse de routine de la composition des huiles essentielles par GC-FID l'outil analytique de composés polaires permettrait de définir le déclenchement de récolte pour améliorer la richesse en principes actifs, et également d'aider à la

comparaison et à la sélection variétale, et d'étudier les effets des conditions culturales sur les PPAM (5,6). La métabolomique des plantes offre la possibilité de définir de nouveaux marqueurs de prédictions des performances des plantes (7) et dans un second temps de caractériser les composés sur la matière première récoltée. La méthode a déjà été éprouvée pour déterminer l'origine géographique, le terroir et les variétés de denrées alimentaires comme le vin, le thé vert, également pour établir les profils sensoriels de denrées alimentaires.

Par ailleurs l'évolution des réglementations communautaires concernant les grandes industries induit de nouvelles exigences de caractérisation des produits, allant parfois jusqu'à plus de 90% de la composition des mélanges. Le règlement REACH, entré en vigueur en 2007, concernant l'utilisation des produits chimiques, établit l'obligation de définir chimiquement un produit fabriqué en quantité supérieure à 1 tonne par an. D'autres secteurs réglementés comme ceux des médicaments à usage humain et vétérinaires, des cosmétiques et des compléments alimentaires (produits finis) font déjà usage de la méthode dans le cadre de suivi de pharmacovigilance ou d'études de pharmacocinétique (8–10). Par exemple la caractérisation d'échantillons de ginseng a permis de détecter des cas d'adultération par des espèces moins couteuses ou moins actives du point de vue pharmacologique (11).

3. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

La GC permet de séparer les composés volatiles d'un mélange en les soumettant à un gradient de température et les éluant par un gaz vecteur. En utilisant un spectromètre de masse comme détecteur, les composés séparés par la colonne sont ionisés, fragmentés et accélérés et les fragments sont séparés selon leur rapport masse/charge dans l'analyseur, produisant un spectre d'ions.

La chromatographie en phase gazeuse permet une séparation avec une haute résolution et des temps de rétention de composés reproductibles d'une analyse à l'autre. Le spectromètre de masse par impact électronique (IE) permet une fragmentation reproductible de molécules et une sensibilité de détection allant jusqu'à quelques dizaines de ng. L'identification des composés par leur spectre ionique est facilitée par l'existence de bibliothèques spectrales et la comparaison à la bibliographie existante ; de plus, l'analyse spectrale permet d'obtenir des informations sur les composés non identifiés. Les signaux obtenus en analyse *fullscan* par IE (instrument type quadripôle) sont approximativement proportionnels à la quantité de composés injectés. La technique est ainsi adaptée pour l'analyse non ciblée d'un grand nombre de composés simultanément (4).

L'analyse des composés thermolabiles, ou de masses élevées ou très polaires est limitée en GC-MS, respectivement par les températures que l'appareillage peut atteindre (jusqu'à 335°C) et leur volatilité intrinsèque. Les ions peuvent théoriquement être détectés jusqu'à 1090 u.m.a avec l'appareillage du laboratoire.

4. La dérivation

Les molécules polaires forment des liaisons hydrogène entre elles au niveau de leurs groupements polaires et sont considérées comme non volatiles et difficilement voire pas analysables en chromatographie en phase gazeuse (CPG). La dérivation en CPG vise à transformer les composés polaires en dérivés de structure chimique proches mais de polarité réduite (9), les rendant ainsi volatiles et analysables. L'efficacité d'analyse est augmentée et ainsi la détectabilité, les composés dérivés sont stabilisés et plus résistants aux températures.

La silylation, l'alkylation et l'acétylation sont les principales méthodes de dérivation existantes (12,13). La silylation est la réaction de dérivation la plus utilisée (12), et notamment pour l'analyse métabolomique des composés organiques par GC-MS (3,12). Elle présente l'avantage de dériver un large spectre de groupements chimiques.

L'agent de dérivation choisi doit réagir avec plus de 95% d'un composé donné, produire des dérivés stables dans les temps, permettre la quantification, et au minimum la reproductibilité, et ne doit pas occasionner de réarrangements/altérations structurales des composés pendant la dérivation ni produire de dérivés réagissant avec la colonne (9).

La silylation, méthode que nous avons utilisée, est une substitution nucléophile de type 2 qui remplace les hydrogènes labiles de la molécule à analyser par des groupements triméthylsilyls.

5. Dérivation par oximation puis triméthylsilylation

Notre protocole initial est basé sur la méthode publiée par une équipe ayant travaillé sur la fragmentation en GC-MS de flavonoïdes, sucres, acides aminés et carboxyliques dérivés sous forme TMS, dans des modèles de solutions témoins et des fruits de la famille des *citrus* (14).

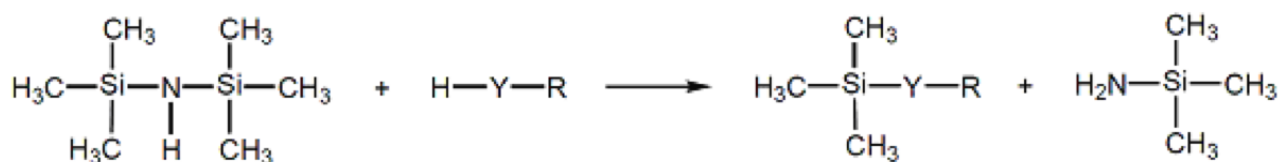


Figure 2. Silylation par l'HDMS : Y = O, S, NH, NR', COO, R, R' = Alkyl, Aryl. (9).

L'agent de dérivation choisi est l'hexamethyldisilazane (HDMS). Il est efficace pour la silylation des groupements dans l'ordre croissant de stabilité : alcool (dont les sucres et dérivés) > phénol > acide carboxylique (acides mono et di carboxyliques et acides gras) > amine > amide (3). Les alcools primaires sont dérivatisés plus facilement que les alcools secondaires et tertiaires (9). Les réactifs silyl donnent des éthers de triméthylsilyl avec les alcools et des esters de triméthylsilyl avec les acides. Bien que la symétrie de l'HDMS en fasse un faible « donneur » de groupements chimiques, sa configuration lui permet de silyler des familles de molécules avec encombrements stérique.

L'agent doit être introduit dans le mélange en respectant un ratio 2 : 1 par rapport aux nombres de fonctions chimiques à dériver. La pyridine et le TFA sont utilisés comme catalyseurs (12). La silylation a l'inconvénient de nécessiter des conditions anhydres, ce qui ajoute des étapes de pré-traitement des échantillons. D'autre part, les excès de réactifs de silylation, ne pouvant pas être séparés des dérivés oxime-TMS en fin de réaction, sont injectés dans le système de GC-MS. Cet excès de réactifs permettra de déplacer l'équilibre chimique et de maintenir les composés silylés en solution.

La silylation directe des sucres conduit à de nombreux pics chromatographiques, un seul composé pouvant être silylé sous ses différentes formes cycliques et en chaînes ouvertes. L'introduction d'une étape d'oximation préalable à la silylation, inhibe la cyclisation des sucres et simplifie les chromatogrammes. De même, l'oximation empêche la formation d'énol sur certains groupements cétoniques et stabilise ainsi les molécules (4). A titre d'exemple, sans l'étape d'oximation, les cations benzenepyrylium des anthocyanidines sont décomposés et ne produisent que des dérivés de petits acides aromatiques détectables par MS (14). Afin de standardiser le protocole et en vue de l'appliquer à tout type de matrice, cette étape est conservée dans notre protocole général.

Les autres réactifs de silylation sont les suivants : Trimethylchlorosilane (TMCS), Trimethylsilylimidazole (TMSI), Bistrimethylsilylacetamide (BSA), N,O

bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), N-méthyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA), Trimethylsilyldiethylamine (TMS-DEA) et le N-méthyl-N-t-butyltrimethylsilyltrifluoroacetamide (MTBSTFA). Ils peuvent être utilisés avec des catalyseurs tels que le triméthylchlorosilane (TCMS), le trifluoroacetamide TFA, l'acide chlorhydrique, l'acétate de potassium, la pipéridine. Néanmoins, certains auteurs ont reportés la formation de chlorure d'ammonium avec l'utilisation du TCMS, conduisant à des chromatogrammes non reproductibles (15).

Le classement décroissant des réactifs de silylation, par ordre de réactivité, est le suivant : TMSI > BSTFA > BSA > MSTFA > TMSDEA > TMCS (avec catalyseur) > HDMS. Un agent de dérivation trop fort donne plus de co-produits et d'artéfacts de réaction, mais un agent trop faible donne plus de pics sur le chromatogramme car différentes formes de dérivés plus ou moins silylés sont obtenues. À ce jour les agents de silylation les plus utilisés sont le BSTFA et le MSTFA (16). La comparaison entre le BSTFA et l'HDMS pour la dérivation de sucres a montré que le BSTFA était moins sensible aux traces d'humidité (15).

6. Analyses de composés variés en GC-MS

6.1. Les sucres

La silylation simple des sucres réducteurs conduit à la formation de plusieurs espèces pour chaque sucre : les formes cycliques anomériques pyranose et furanose alpha et beta, et les formes hydratées ou déshydratées.

Les sucres et leurs dérivés sont la classe de molécules la plus réactive à la dérivation TMS (3). L'analyse des sucres a permis d'obtenir des rendements de dérivation élevés, avec des coefficients de variation <5% traduisant une bonne répétabilité de la réaction (glucose, fructose, ribose, xylitol, 2-deoxyglucose) (4).

Les sucres ont montré une bonne stabilité sur 72h avec une conservation à 25°C (injecteur automatique), que les répétitions d'analyse soient réalisées à partir d'un même vial ou de vials différents (dérivation au chlorhydrate de méthoxyamine et MSTFA) (17).

L'analyse de composition en fructose, glucose et oligosaccharides a été réalisée sur des échantillons de miel. Cette étude a permis de déterminer des ratios entre les sucres et de détecter des altérations de composition. Les trisaccharides raffinose, erlose, melezitose, maltotriose et panose ont été identifiés et quantifiés (18).

Pour les sucres réducteurs comme pour les sucres non réducteurs, toutes les fragmentations des glycosides commencent avec une attaque de l'hydrogène sur l'atome d'oxygène glycosidique (19).

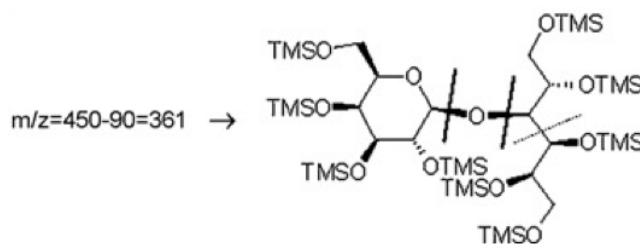


Figure 2. Schéma de fragmentation du lactitol (4-O- α -D-Galactopyranosyl-D-glucitol) (19)

Les monomères ont leur fragment le plus abondant à $m/z = 204$ et $m/z = 217$. Ces ions permettent de discriminer les formes pyranose et furanose (20): l'intensité du pic 217 est plus forte que celle du pic 204 pour les formes furanose, et c'est l'inverse pour les formes pyranose. Le fragment $m/z = 361$ est obtenu en quantité abondante pour les dérivés TMS des di- et trisaccharides contenant une liaison glycosidique (sucres réducteurs et non réducteurs). Les unités galactose et glucose produisent toutes deux ces mêmes fragments principaux de $m/z = 361$. Dans le cas d'un disaccharide réducteur, on obtient le fragment $m/z = 361$ pour la partie cyclique et le fragment de $m/z = 538$ correspondant à l'unité en chaîne ouverte. Pour le sucrose et le raffinose contenant chacun une unité de fructose, le fragment $m/z = 436$ est obtenu en plus du fragment $m/z = 361$.

L'ion $m/z = 437$ (proche du 436) de forte intensité permet de discriminer le fructose parmi les aldohexoses. Les oligosaccharides présentant une liaison ($x \rightarrow 2$) -beta-D-fructofuranose en extrémité de molécule présente généralement cet ion (raffinose, stachyose, 1-kestose, 6-kestose, neokestose, nystose, etc) (20). La spectrométrie de masse peut être utilisée pour discriminer différentes liaisons osidiques. Dans les spectres de masse des $1 \rightarrow 1$ et $1 \rightarrow 2$ TMS aldohexosyl-fructoses on retrouve ce fragment $m/z = 437$ de forte intensité et le fragment $m/z = 815$ à basse intensité. Inversement, on retrouve l'ion $m/z = 437$ à basse intensité et celui de $m/z = 815$ à haute intensité dans les spectres de $1 \rightarrow 3$, $1 \rightarrow 4$, $1 \rightarrow 5$ et $1 \rightarrow 6$ TMS aldohexosyl-fructoses.

L'analyse des polysaccharides peut être réalisée après hydrolyse et dérivatisation des unités monosaccharidiques. Il est possible d'utiliser différents acides pour l'hydrolyse avec notamment l'acide sulfurique, l'acide chloryhydrique, l'acide trifluoroacétique et l'acide hydrofluorique parmi les plus utilisés. L'hydrolyse assistée par les micro ondes permet de diminuer le temps de réaction, d'obtenir de bon rendement et de réduire la décomposition des matrices (21). Cette technique a été utilisée pour l'analyse de gommages de plantes. Après hydrolyse assistée par les micro ondes (500W, 120°C, 20 min) les aldoses et acides uroniques produits sont transformés en diéthyl- dithioacétal et

diethyl dithioacetal lactones puis dérivatisés. Cette technique permet d'obtenir un seul pic par sucre (15).

6.2. Les acides organiques et aminés

L'analyse de solutions modèles d'acides aminés dérivatisés au MSTFA a montré des rendements de dérivatisation variables allant de 25 à 110% avec une répétabilité moyenne (coefficients de variations jusqu'à 11%). Ces résultats ont été obtenus en injectant 9 à 16 ng de ces composés en mode splitless. Les acides aminés les moins réactifs sont ceux comportant des fonctions amides, l'acide glutamique et le tryptophane. Une étude comparative entre la dérivatisation par alkylation et triméthylsilylation souligne l'instabilité de la classe des acides aminés, et de certains acides organiques triméthylsilylés. Il s'agit de la classe de métabolites la plus instable par silylation. La stabilité des composés sur 72h est faible pour les dérivés TMS comparativement aux dérivés alkylés. Selon les auteurs, les rendements de dérivés TMS augmentent avec le temps, suggérant que les réactions de silylation n'étaient pas menées à terme.

Malgré la faible abondance de ces composés par rapport à la composition totale des échantillons, la quantification d'acides aminés a pu être réalisée en utilisant le mode Select Fragment Ion dans des échantillons d'abricots (22).

Les acides organiques sont parmi les groupements les plus réactifs avec les agents de silylation, avec de bons rendements de dérivatisation (>60%) obtenus pour les standards testés (acides citrique, fumarique, lactique, malique, oxaloacétique, pyruvique) et dans des extraits cellulaires microbiens (4). Des réponses linéaires ont été obtenues pour les standards à des quantités injectées de 100-250 pg à 50 ng.

La stabilité des acides peut être améliorée en réalisant les répétitions d'injection d'un même échantillon à partir de vials différents pour éviter les interactions avec l'extérieur occasionnées par la seringue (17). Il a été suggéré qu'une conservation 72h à -20°C avant injection permet de stabiliser jusqu'aux acides aminés les plus instables.

6.3. Les composés phénoliques

De nombreuses études ont été publiées concernant l'analyse des flavonoïdes par GC-MS. Les

agents de dérivation les plus courants sont le BSTFA et l'HDMS. En effet la silylation est plus efficace que l'alkylation, avec la possibilité de dériver un grand nombre de flavonoïdes (23).

Les chromatogrammes des dérivés oxime-TMS sont parfois complexes. L'étude de la fragmentation de flavonoïdes dérivés (11) a démontré que l'étape d'oximation conduit à la formation de dérivés oxime-TMS des flavanones (Cf. annexe I) et des anthocyanidines, mais non des flavonols et des flavones (dérivés TMS simples). L'étude du flavonol quercétine a montré l'obtention de deux dérivés TMS: le premier étant silylé sur tous les groupements comportant un hydrogène labile, et le second silylé seulement sur 4 sites. Jusqu'à 4 pics par dérivés ont été obtenus sur les chromatogrammes de molécules complexes comme les flavonoïdes, ceci pourrait être dû à leur encombrement stérique ou à la présence d'isomères. Pour les flavones, flavanones, flavanols et isoflavones, les temps de rétention augmentent avec le nombre de groupements substitués par un TMS (23). L'ionisation des dérivés oxime-TMS lors de l'impact électronique mène à la perte préférentielle de groupements méthyls et TMS, ce qui peut être expliqué par la stabilité conférée par les noyaux benzéniques. Les études de spectres permettent d'obtenir des informations pour l'identification des composés.

Des LOD de 4, 4, 5 et 3 ng par mL (échantillons urinaires) de daidzéine, d'equol (métabolite), de génistéine, et de bisphénol A, ont respectivement pu être établies par analyse en GC-EI-MS (70 eV) en mode TIC dans l'intervalle de m/z : 200–600 a.m.u.

La fragmentation des acides cinnamiques produit des spectres sur lesquels ont été identifiés dans de nombreux cas (24):

- L'ion moléculaire sur lequel s'est greffé un groupement TMS $[M+TMS]^+$
- L'ion moléculaire $[M]^+$
- l'ion molécule avec la perte d'un groupement méthyl $[M-CH_3]^+$
- l'ion moléculaire avec la perte d'un O-TMS $[M-OTMS]^+$

Pour les acides benzoïques, l'ion moléculaire est peu retrouvé dans les spectres. On retrouve le plus souvent l'ion $[M-CH_3]^+$ comme étant le plus abondant et de manière aléatoire les ions $[M-COOTMS]^+$, $[M-COO-CH_3]^+$, $[M-TMSO]^+$.

Nous verrons par la suite l'application d'un protocole de dérivation à différents extraits de plantes, après avoir décrit les principales caractéristiques botaniques et chimiques de la mélisse officinale.

III. La mélisse officinale

Cultivée dans la région méditerranéenne depuis 2000 ans, la mélisse est connue traditionnellement pour ses utilisations culinaires, aromatiques et médicinales. Elle avait été décrite par Théophraste dans son *Historia Plantarum* (IV^{ème} et III^{ème} avant J.-C.), et au I^{er} siècle par le romain Pline dans *Naturalis Historia* et le grec Dioscoride dans sa *Materia medica* comme étant utilisée contre les piqûres d'insecte, les troubles menstruels, les douleurs abdominales et les maladies rhumatismales (25). Au XV^{ème} siècle, elle entre dans la composition de l'eau des Carmes, un hydrolat obtenu à partir d'un mélange de plantes (cannelle, coriandre, girofle, muscade, ...) devenu réputé à Paris où il a commencé à être produit. Par ailleurs les jeunes pousses de mélisse sont utilisées pour aromatiser les salades, en Bosnie notamment et entrent dans la fabrication de liqueur en Catalogne (26).

À ce jour, la mélisse est valorisée par différentes industries qui transforment la plante. On trouve des producteurs d'extraits et d'huiles essentielles, qui seront valorisées dans les produits cosmétiques, des compléments alimentaires et en thérapeutique. Il existe également une demande pour l'herboristerie, pour la consommation en tisanes. La richesse de la mélisse en composés odorants et actifs est une plus value importante pour assurer les voies de valorisation.

Les études menées au long des vingt dernières années permettent de lui attribuer des propriétés anxiolytiques, antidépressives, neuroprotectrices, avec des effets sur l'humeur, la cognition et la mémoire (27); des effets antioxydants, hypoglycémiants et hypolipémiants ont été mis en avant, ainsi que des effets antimicrobiens et antiviraux. Des effets cardiovasculaires ont également été observés sur des modèles animaux par administration de macérâts et d'infusions (28).

1. Place dans la systématique

D'après les travaux publiés de l'APG IV, la mélisse officinale appartient :

au clade des angiospermes,

clade des dicotylédones,

clade des Superastéridées,

clade des Astéridées

clade des lamiidées,

ordre des Lamiales,

famille des Lamiacées

Le nom binominal de la mélisse officinale est *Melissa officinalis* L.

La famille des Lamiacées est la plus importante de l'ordre des Lamiales. Les plantes de cette famille ont pour caractéristique d'être des plantes à essences, qui se forment dans des poils à essences. Ainsi on retrouve dans cette famille des plantes aromatiques : thym, romarin, origan, sarriette, basilic, marjolaine, et des plantes à parfums et médicinales telles que l'hysope, la lavande, la sauge officinale (29). La Mélisse, également odorante, a la particularité de dégager un arôme citronné quand elle est froissée ou broyée, ce qui lui vaut d'être parfois appelée citronnelle. Le nom latin *Melissa* lui a été donné suite à son appellation par les grecs de la mélisse « *melissophyllon* » ou herbe aux abeilles pour caractériser cette plante très mellifère.

Il existe plusieurs sous-espèces de *Melissa officinalis* L. : subsp. *altissima*, subsp. *officinalis* et subsp. *inodora* mais c'est la sous espèce *officinalis* qui est la plus recherchée et valorisée sur le plan commercial. Elle est utilisée à ce jour comme condiment, en tisane, transformée en ingrédient cosmétique, comme plante d'ornement et dans la thérapeutique (30).

2. Description botanique

2.1. Caractéristiques macroscopiques

La mélisse présente de nombreuses caractéristiques botaniques communes aux autres Lamiacées qui se reconnaissent aisément (29):

- un appareil végétatif avec des tiges quadrangulaires, sur lesquelles se répartissent des feuilles généralement simples, opposées
- un appareil reproducteur constitué d'inflorescences condensées autour de la tige en verticilles ou en capitules (menthe).
- des fleurs bilabiées avec une lèvre formée de trois pétales inférieure et une autre de deux pétales supérieurs. Nous pouvons remarquer que le nom de la famille des Lamiacées vient du grec *laïmos* qui signifie « gueule ouverte ».
- l'androcée est à 4 étamines didynames (deux longues et deux courtes), qui sont arquées convergentes.
- le fruit est un tétrakène, logé au fond du calice, et se divisant en akènes élémentaires

La mélisse est une plante qui se répartit en touffes, elle est vivace avec des tiges rameuses qui sont dressées. Elle peut mesurer jusqu'à 100 cm de hauteur. Il existe plusieurs types de mélisse cultivée : couché et rampant, ils caractérisent la morphologie de la mélisse en première année de culture (iteipmai).

Les feuilles de mélisse, ovoïdes, ont des longueurs allant de 2 à 9 cm et de largeur de 5 à 7 cm, sont opposées et décussées sur la tige quadrangulaire. Elles possèdent un rebord irrégulièrement crénelé ou dentelé. Leur limbe est fin, légèrement ridé, vert foncé sur la face supérieure et vert plus clair sur la face inférieure; la fine nervure est proéminente sur la face inférieure. La face supérieure est légèrement pubescente tandis que la face inférieure est presque glabre (31).

Ses fleurs zygomorphes sont blanches à rose pâle, avec un calice persistant. Celui ci est poilu, tubuleux en cloche avec 13 nervures et mesure 7 à 9 mm. Les verticilles axillaires, formés par 4 à 12 fleurs, sont unilatéraux, brièvement pédonculés et bien plus courts que les feuilles (32).



Figure 3. Rameau de mélisse officinale (A) ; Verticille de fleurs de mélisse (B) (32)

2.2 Caractères microscopiques

La drogue inscrite à la Pharmacopée européenne (9^e édition) est représentée par la feuille de mélisse.

Pour identifier la feuille, les éléments suivants doivent être présents sur un échantillon de poudre :

- des fragments de l'épiderme supérieur, à parois sinueuses avec parfois du parenchyme palissadique
- des fragments de l'épiderme inférieur avec des stomates diacytiques
- des poils tecteurs unicellulaires coniques, courts et droits, à cuticule finement striée, libres ou sur un épiderme
- des poils tecteurs unisériés, à extrémité pointue, à cuticule épaisse et verruqueuse
- des poils sécréteurs octocellulaires de type *lamiaceae*
- des poils sécréteurs à pied unicellulaire à tricellulaire et à tête unicellulaire ou bicellulaire

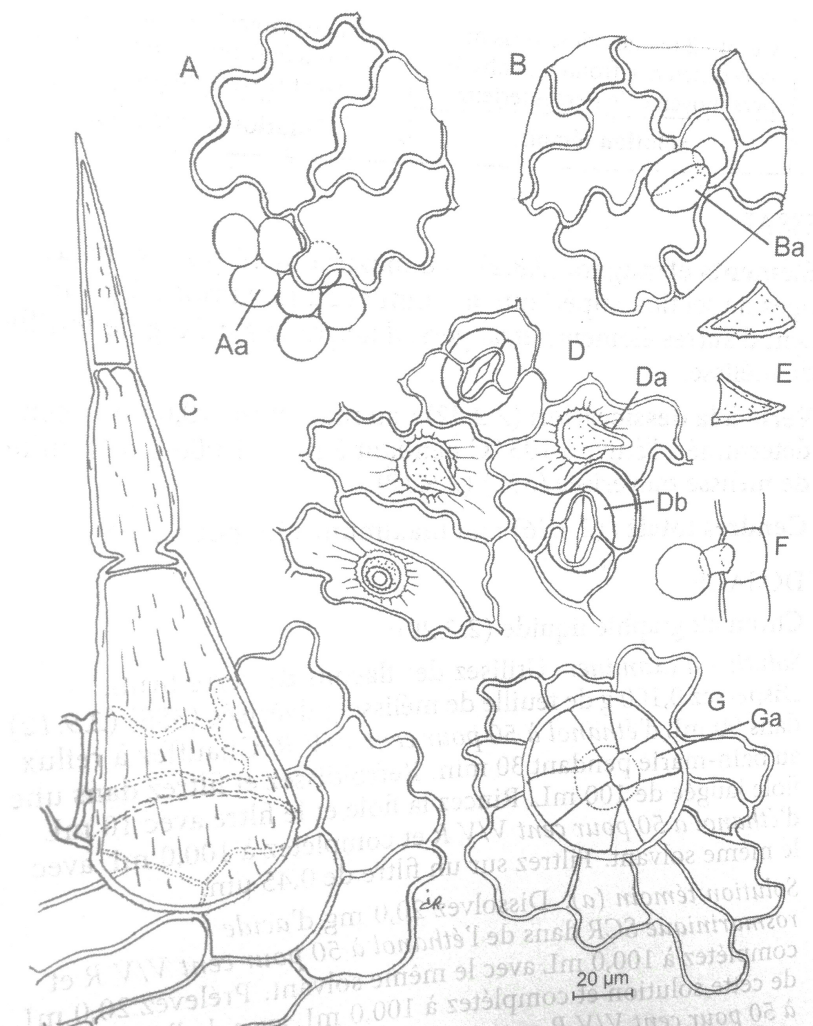


Figure 4. Dessin pour l'identification B de la feuille de mélisse pulvérisée (33)

3. Culture et habitat

De manière générale les plantes de la famille des Lamiacées ont une aire de dispersion assez étendue avec une prépondérance pour les régions méditerranéennes. La mélisse serait originaire d'Asie mineure et plus largement d'Asie occidentale. Elle aurait été introduite au Moyen Âge dans la partie occidentale du bassin méditerranéen. À ce jour on peut encore la retrouver à l'état sauvage dans les bois, bordant les chemins ou les haies, dans les endroits ombragés et frais et ce dans toutes l'Europe, particulièrement en Allemagne, dans le Midi de la France et en Espagne ainsi qu'en Asie de l'ouest.

Elle est cultivée sur de vastes surfaces en Europe centrale, Europe de l'est et Europe de l'ouest, et aux États-Unis (34). En France, on peut estimer sa production à environ 200 hectares (35).

Initialement, le matériel végétal utilisé en Europe provenait de programmes de sélection orientés vers la production d'huile essentielle (36). Plusieurs variétés de mélisse sont actuellement cultivées pour la production d'antioxydants et d'huile essentielle, des sélections variétales ayant été réalisées en Allemagne, Suisse, dans les pays de l'Est et en France. Notamment, des travaux réalisés à l'iteipmai concernent la sélection variétale de mélisse pour améliorer sa compétitivité en terme de production d'antioxydants, afin de répondre aux besoins des agriculteurs et des industries qui valorisent la plante. La mélisse peut être cultivée en agriculture conventionnelle ou biologique.

La mélisse pousse bien sur des sols frais, profonds et perméables, qui ne doivent cependant pas présenter de risque de stagnation d'eau en hiver. Les sols les mieux adaptés sont ceux qui se réchauffent vite au printemps (37). La plante poussera même si les conditions sont sèches, mais de meilleurs rendements sont obtenus avec l'irrigation du sol. La multiplication peut se faire par division de touffes, bouturage (plus onéreux) et par semis.

La plantation se fait généralement en rangs, permettant d'obtenir 35 000 à 48 000 plants/hectare. Une seule coupe est réalisée durant l'année d'implantation, tandis que les années suivantes la récolte est bisannuelle, la première étant en juin et la deuxième en septembre. La mélisse destinée à l'herboristerie se récolte avant floraison et celle destinée à l'huile essentielle se récolte à partir du début de floraison (35). La mélisse est une plante pérenne, en conditions culturales, elle peut rester en place jusqu'à 5 ans.

La plante est très sensible aux opérations de coupe et doit être mise au séchage le plus rapidement possible. La plante est soit séchée en l'état, soit tronçonnée et séchée pour séparer les feuilles des tiges. Le séchage se fait entre 35 et 40 °C maximum, pour limiter la perte des composés

volatils. Bien que la drogue décrite à la Pharmacopée européenne corresponde à la feuille séchée, les producteurs ne réalisent pas toujours cette opération pour des raisons économiques.

La distillation de feuilles de mélisse pour la production d'huile essentielle se fait sur feuilles vertes ; les rendements sont faibles, on peut obtenir de 1 à 2,5 kg d'huile essentielle par hectare (35).

4. Composition chimique

La composition chimique de la mélisse varie en fonction des conditions climatiques, des milieux et des méthodes de cultures, et des variétés étudiées.

4.1. Composés phénoliques

L'effet antioxydant des extraits de mélisse est attribué à la présence d'acides phénols, dérivés de l'acide benzoïque et des dérivés d'acides cinnamiques (28).

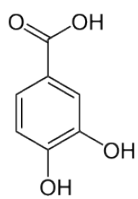
Les composés phénoliques majoritaires sont des acides phénols dérivés de l'acide caféique. Parmi ceux-ci on retrouve des dimères : acide rosmarinique, acide chlorogénique et des trimères : acides mélitriques A et B (38). L'acide rosmarinique est majoritaire parmi les composés phénoliques, la teneur de la feuille pouvant aller jusqu'à plus de 5%. Des procédés d'extraction des polyphénols (assistée par les micro-ondes ou les ultrasons) ont permis de quantifier d'acide rosmarinique dans des proportions allant jusqu'à 88,7% des polyphénols totaux (27).

En 2013, Barros et al. ont mis en évidence par HPLC-DAD-ESI/MS des dimères, trimères et tétramères de l'acide caféique dans des infusions de mélisse (39): acide lactique 3-(3,4-dihydroxyphenyl), acide lithospermique A, acide salvianolique A, acide salvianolique B, acide salvianolique C, acide salvianolique F, acide sagerinique et l'acide yunnaneique F.

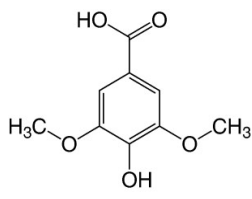
Une étude récente a mis en évidence la présence des composés suivants dans les parties aériennes de mélisse issues de cultures grecques (40):

- des acides phénoliques et dérivés : une forte teneur en acide rosmarinique, quantitativement suivi des acides caféique et protocatéchuïque, acide syringique, acide férulique, acide 4-hydroxybenzoïque, acide gallique, acide vanillique ;
- des flavonoïdes : lutéoline, apigénine, quercétine, kaempférol, myricétine, catéchine, épicatechine, épigallocatechine.

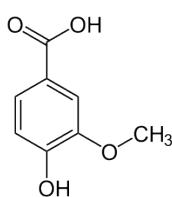
Acide protocatéchuique



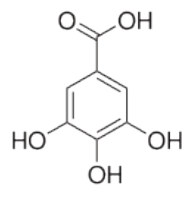
Acide syringique



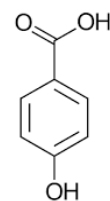
Acide vanillique



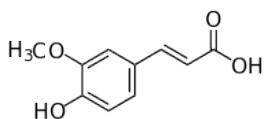
Acide gallique



Acide 4- hydroxybenzoïque



Acide férulique



Acide rosmarinique

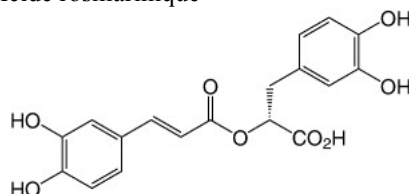


Figure 5. Structure des acides phénoliques présents dans la mélisse

Ces résultats soutiennent ce qui avait déjà été identifié concernant les acides phénoliques au cours des dix dernières années (voir Tableau 1) ; concernant les flavonoïdes, d'autres flavonoïdes caractérisés dans la mélisse sont l'isoquercitroside, la rhamnocitrine, les 7-glucoside de l'apigénine et de la lutéoline (cosmosiine et cynaroside) (38). Selon les différentes études, on constate la présence assez hétérogène de ces composés. Il a néanmoins été mis en évidence la prédominance de la lutéoline parmi ceux ci dans la feuille de mélisse (41,42). La lutéoline 3'-O- β -D-glucuronide a été caractérisée par RMN dans des feuilles de mélisse de production française et quantifiée à 0,3% sur la masse sèche (43). L'identification structurale a également été réalisée sur la lutéoline 7-O- β -D-glucopyranoside-3'-O- β -D-glucuronopyranoside, l'apigénine, la lutéoline 7-O- β -D-glucuronopyranoside, la lutéoline, l'apigénine 7-O- β -D-glucopyranoside, et la lutéoline 3'-O- β -D-glucuronopyranoside de la feuille de mélisse (42).

Les flavonoïdes sont généralement présents de 0,2 à 0,7% dans la feuille de mélisse et ne constituent pas les marqueurs de qualité mais peuvent participer à l'activité anti oxydante de la plante.

Ci-après sont présentées les structures des composés principaux identifiés dans la mélisse, réunis par Shakeri et al. (2016).

Tableau 2. Principaux constituants isolés et caractérisés dans *M. officinalis* (28)

1	Oxygenated monoterpene	Geranial	Aerial parts	Meftahizade et al. (2010)
2	Oxygenated monoterpene	Neral	Aerial parts	Meftahizade et al. (2010)
3	Oxygenated monoterpene	Citronellal	Aerial parts	Mimica-Dukic et al. (2004)
4	Oxygenated monoterpene	Geraniol	Aerial parts	Saeb and Gholamrezaee (2012)
5	Oxygenated monoterpene	Decadienal	Leaves	Saeb and Gholamrezaee (2012)
6	Oxygenated monoterpene	Carvacrol	Leaves	Saeb and Gholamrezaee (2012)
7	Oxygenated monoterpene	Methyl citronellate	Leaves	Saeb and Gholamrezaee (2012)
8	Sesquiterpene hydrocarbon	β -Cubebene	Aerial parts	Allahverdiyev et al. (2004)
9	Sesquiterpene hydrocarbon	β -Caryophyllene	Aerial parts	Allahverdiyev et al. (2004)
10	Triterpene	Ursolic acid	Aerial parts	Awad et al. (2009)
11	Triterpene	Oleanolic acid	Aerial parts	Awad et al. (2009)
12	Triterpene	3 β ,16 β ,23-Trihydroxy-13,28-epoxyurs-11-ene-3-O- β -D-glucopyranoside	Stems and leaves	Mencherini et al. (2007)
13	Triterpene	3,23-Disulfate ester of 3 β ,19 α ,23-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid	Stems and leaves	Mencherini et al. (2007)
14	Triterpene	3,23-Disulfate ester of 2 α ,3 β ,19 α ,23-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid	Stems and leaves	Mencherini et al. (2007)
15	Triterpene	3,23-Disulfate ester of 2 α ,3 β ,19 α ,23-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid 28-O- β -D-glucopyranoside	stems and leaves	Mencherini et al. (2007)
16	Triterpene	3,23-Disulfate ester of 3 β ,23,29-trihydroxyolean-12-en-28-oic acid	Stems and leaves	Mencherini et al. (2007)
17	Triterpene	3,23-Disulfate ester of 2 α ,3 β ,23,29-tetrahydroxyolean-12-en-28-oic acid	Stems and leaves	Mencherini et al. (2007)
18	Triterpene	3,23-Disulfate ester of 2 α ,3 β ,23,29-tetrahydroxyolean-12-ene-28-oic acid, 28-O- β -D-glucopyranoside	Leaves	Tantry et al. (2014)
19	Triterpene	23-Monosulfate ester of 2 α ,23-dihydroxyurs-12-ene-28-oic acid, 3-O- β -D-glucopyranoside	Leaves	Tantry et al. (2014)
20	Phenolic acid	Rosmarinic acid	Tops	Caniova and Brandsteterova (2001)
21	Phenolic acid	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-Lactic acid	Aerial parts	Barros et al. (2013)
22	Phenolic acid	Caffeic acid	Aerial parts	Barros et al. (2013)
23	Phenolic acid	Lithospermic acid A	Aerial parts	Barros et al. (2013)
24	Phenolic acid	Salvianolic acid F	Aerial parts	Barros et al. (2013)
25	Phenolic acid	Salvianolic acid A	Aerial parts	Barros et al. (2013)
26	Phenolic acid	Salvianolic acid C	Aerial parts	Barros et al. (2013)
27	Phenolic acid	Salvianolic acid B	Aerial parts	Barros et al. (2013)
28	Phenolic acid	Sagerinic acid	Aerial parts	Barros et al. (2013)
29	Phenolic acid	Yunnanic acid F	Aerial parts	Barros et al. (2013)
30	Phenolic acid	Chlorogenic acid	Leaves	Ibragić et al. (2014)
31	Phenolic acid	Gallic acid	Leaves	Ibragić et al. (2014)
32	Phenolic acid	m-Coumaric acid	Leaves	Dastmalchi et al. (2008a)
33	Phenolic acid	Melittic acid A	Aerial parts	Agata et al. (1993)
34	Phenolic acid	Melittic acid B	Aerial parts	Agata et al. (1993)
35	Phenolic acid	Ellagic acid	Aerial parts	Pereira et al. (2014)
36	Flavone glycoside	Luteolin 3'-O- β -D-glucuronide	Leaves	Heitz et al. (2000)
37	Flavone glycoside	Luteolin 7-O-glucoside	Leaves	Mulkens and Kapetanidis (1986)
38	Flavone glycoside	Apigenin 7-O-glucoside	Leaves	Mulkens and Kapetanidis (1986)
39	Flavonol glycoside	Isoquercitrin	Leaves	Mulkens and Kapetanidis (1986)
40	Flavonol	Rhamnocitrin	Leaves	Mulkens and Kapetanidis (1986)
41	Flavone glycoside	Luteolin 7-O- β -D-glucopyranoside-3'-O- β -D-glucuronopyranoside	Leaves	Patora and Klimek (2002)
42	Flavone	Apigenin	Leaves	Patora and Klimek (2002)
43	Flavone glycoside	Luteolin 7-O- β -D-glucuronopyranoside	Leaves	Patora and Klimek (2002)
44	Flavone	Luteolin	Leaves	Patora and Klimek (2002)
45	Flavone glycoside	Apigenin 7-O- β -D-glucopyranoside	Leaves	Patora and Klimek (2002)
46	Flavone glycoside	Luteolin 3'-O- β -D-glucuronopyranoside	Leaves	Patora and Klimek (2002)
47	Flavanone glycoside	Hesperidin	Leaves	Dastmalchi et al. (2008)
48	Flavanone	Hesperetin	Leaves	Dastmalchi et al. (2008)
49	Flavanone glycoside	Eriodictyol-7-O-glucoside	Leaves	Dastmalchi et al. (2008)
50	Flavanone glycoside	Naringin	Leaves	Dastmalchi et al. (2008)
51	Flavanone	Naringenin	Leaves	Dastmalchi et al. (2008)
52	Flavanol	Catechin	Aerial parts	Pereira et al. (2014)
53	Flavanol	epi-Catechin	Aerial parts	Pereira et al. (2014)
54	flavonol glycoside	Rutin	Aerial parts	Pereira et al. (2014)

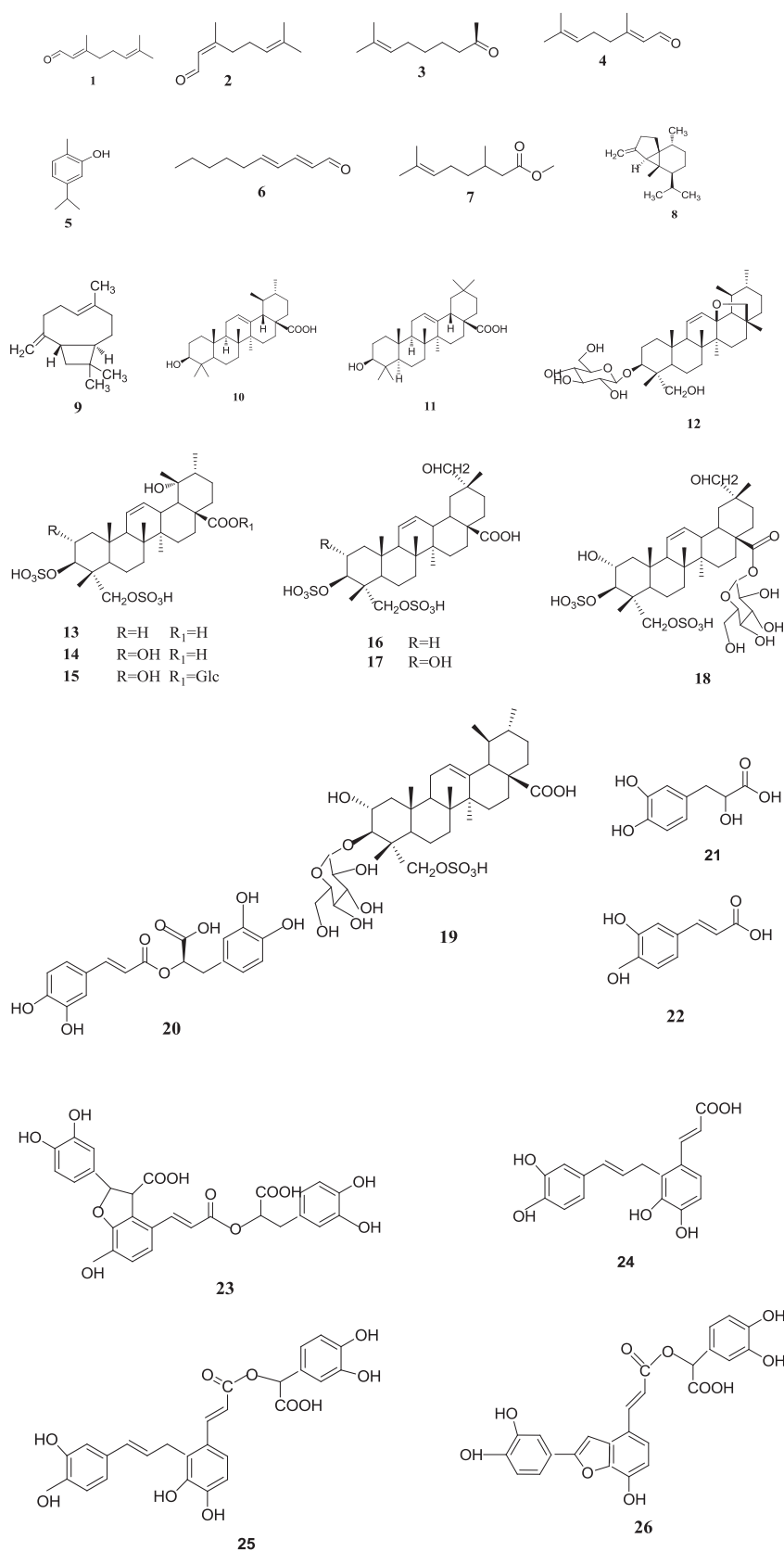
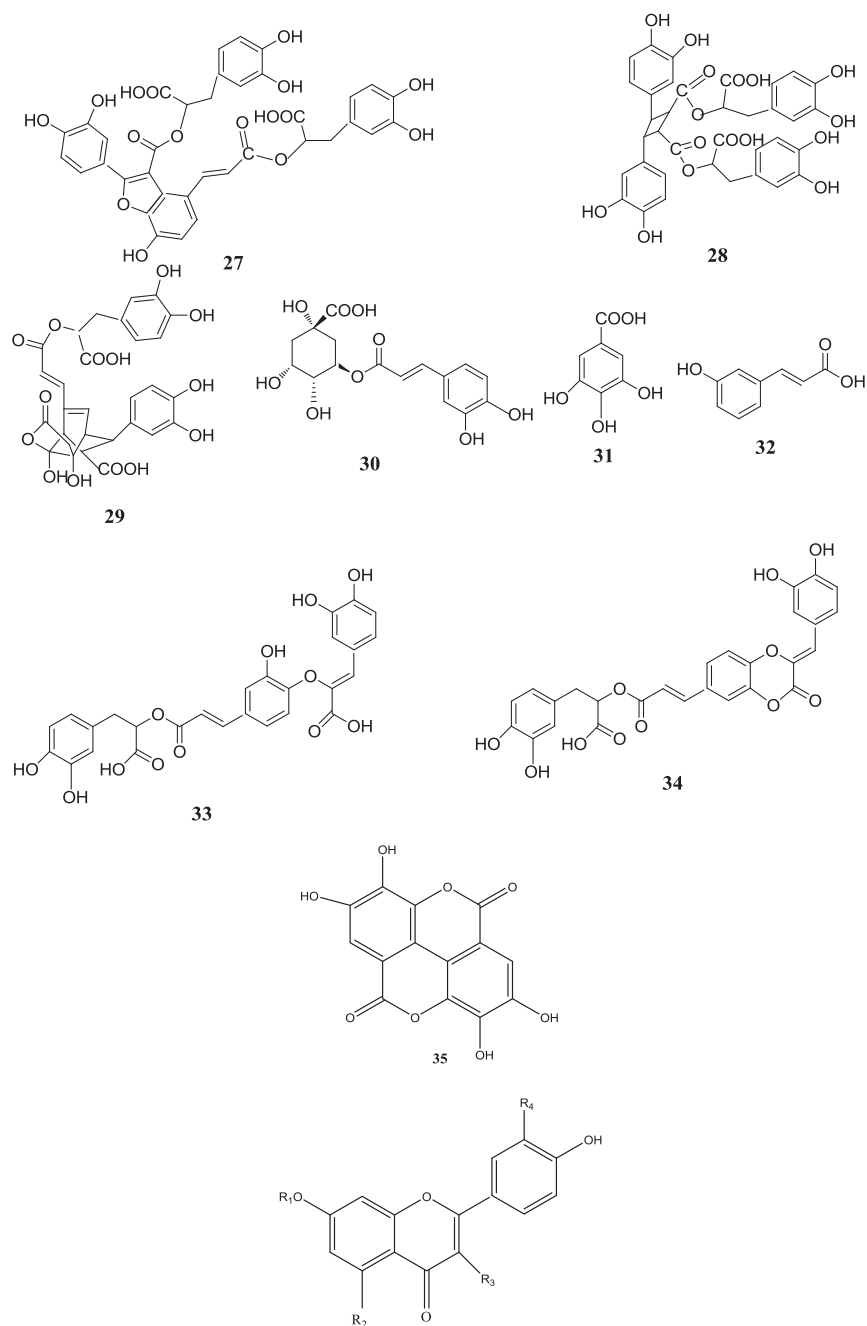
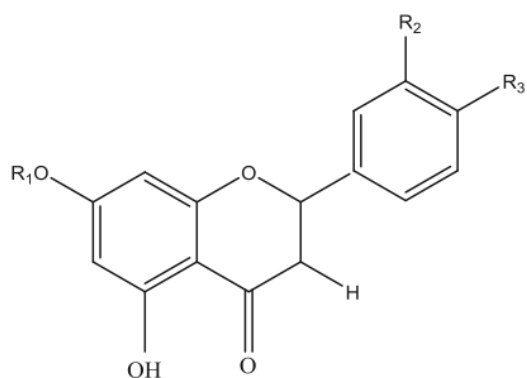
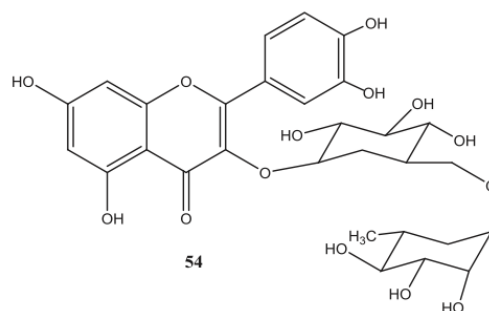
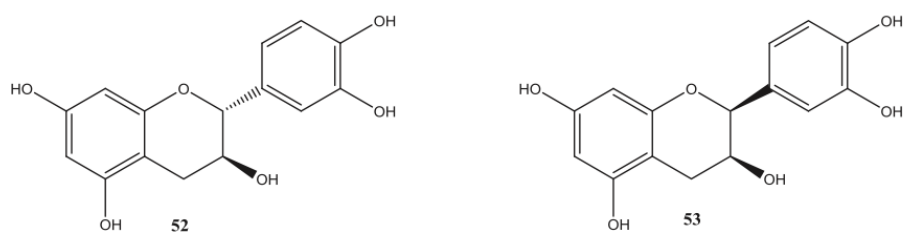


Figure 6-1. Structures des métabolites secondaires de *M. officinalis* (correspondance avec le Tableau 1)



	R1	R2	R3	R4
36	H	OH	H	O-glucuronide
37	Glc	OH	H	OH
38	Glc	OH	H	H
39	H	OH	O-glc	OH
40	Me	OH	OH	H
41	Glucopyranoside	OH	H	O-glucuronopyranoside
42	H	OH	H	H
43	Glucuronopyranoside	OH	H	OH
44	H	OH	H	OH
45	Glucopyranoside	OH	H	OH
46	H	OH	H	O-glucuronopyranoside

Figure 6-2. Structures des métabolites secondaires de *M. officinalis* (correspondance avec le Tableau 1) (Suite)



	R1	R2	R3
47	Rutinoside	OH	OMe
48	H	OH	OMe
49	Glc	OH	OH
50	Neohesperidose	H	OH
51	H	H	OH

Figure 6-3. (Suite) Structures des métabolites secondaires de *M. officinalis* (correspondance avec le Tableau 1)

4.2 Composés terpéniques

La mélisse est odorante en raison de la présence de composés volatiles. On trouve des aldéhydes monoterpéniques : géraniol et néral (le mélange de ces isomères est le citral) représentant 10 à 30% de la composition et le citronellal, majoritaire, représentant 2 à 40%.

rt (min)	Tentative identification	Abundance (% on the total)	
23.2	citronellal	27.54	16.08
29.61	α -citral (geranial)	25.00	18.5
26.73	β -caryophyllene	9.24	13.95
28.42	β -citral (neral)	7.61	37.78
29.44	Germacrene D	3.00	17.86
24.55	linalol	2.82	17.81
35.7	caryophyllene oxide	2.70	10.44
15.81	(E)-2-hexenal	2.65	7.11
21.96	1-octen-3-ol	2.47	7.21
29.88	geranyl acetate	2.42	15.21
25.22	methyl citronellate	2.34	9.85
30.37	δ -cadinene	1.44	13.62
16.63	E-ocimene	1.35	8.73
30.55	γ -cadinene	0.91	4.40
23.87	copaene	0.88	15.02
31.75	geraniol	0.79	18.34
25.68	Isopulegol isomer B	0.64	13.11
20.24	(Z)-3-hexen-1-ol	0.57	13.37
16.77	3-octanone	0.52	14.71
34.34	β -ionone	0.48	16.41
25.58	Isopulegol isomer A	0.46	5.22
6.52	ethyl acetate	0.46	8.6
20.39	3-octanol	0.44	
19.18	6-methyl-5-hepten-2-one	0.38	
22.77	α -cubebene	0.36	
19.7	2,6-dimethyl-5-heptenal	0.36	
20.84	nonanal	0.33	
11.61	hexanal	0.25	
	Z-ocimene	0.21	
	(E)-3-hexen-1-yl acetate	0.20	
	β -myrcene	0.17	
	nerol	0.15	
	methyl hex-2-enoate	0.10	
	octanal	0.10	
	2,5-diethyltetrahydro-furan	0.09	
	2-methyl-butanal	0.07	
	3-methyl-butanal	0.06	
	D-Limonene	0.05	
	1-penten-3-one	0.05	
	1-penten-3-ol	0.05	
	pentanal	0.05	
	dimethyl sulfide	0.04	
	3-methyl-1-butanol	0.04	
	(Z)-2-penten-1-ol	0.03	
	(E)-2-penten-1-ol	0.03	
	5-methyl-hexanal	0.03	
	heptanal	0.03	
	(Z)-4-heptenal	0.02	
	2-methyl-propanal	0.02	
	2-pentanone	0.01	

Tableau 3. Abondance relative des composés organiques volatils par HS-SPME-GC-MS (44)

Une méthode de SPME couplé à la GC-MS par headspace a permis de détecter 50 composés volatiles (voir Tableau 3.) sur de la poudre de feuille de mélisse en l'état (44). Les terpènes ont été identifiés comme étant les plus abondant et les plus nombreux : 15 monoterpènes représentant une proportion de 71,91%, et 8 sesquiterpènes représentant 19,01%. Le citral est le constituant le plus abondant (32,71%) suivi du citronellal (27,54%) et beta caryophyllène (9,24%).

Les principaux triterpènes ayant été identifiés sont les acides ursoliques et oléanolique. D'autres dérivés triterpéniques ont été identifiés, et corrélés à des propriétés biologiques différentes selon qu'ils soient sous forme aglycone ou de dérivés simples (28).

4.3 Autres composés

Les autres constituants organiques volatils présents, en de moindres proportions, sont des aldéhydes, des alcools, des cétones et des esters (44).

Par ailleurs des profilages de métabolites réalisés sur des feuilles de mélisse ont permis d'identifier de nombreux composés présentés ci-dessous (5). Avec les résultats de cette étude, réunis en analyse des composantes principales, les variations des métabolites en réponse à différentes expositions en sucre ont été évaluées.

Famille de composés	Métabolites identifiés
Alcools	Glycérol Érythritol
Amines	Nicotianamine Putrescine
Acides aminés	Acide 4-Aminobutyrique Alanine (β -alanine+L-alanine) Glutamine (glutamine 1+glutamine 2+ glutamine 3+L-glutamine 1+L-glutamine 2) Glycine (glycine+suberyl glycine) L-Arginine L-Asparagine (L-asparagine 1+L-asparagine 2) L-Aspartic acid L-Glutamic acid L-Leucine L-Lysine L-Phenylalanine L-Serine L-Threonine L-Tyrosine L-Valine Proline (proline+L-proline) Acide pyroglutamique
Acides gras	Acide hexadecanoïque Acide octadecanoïque
Acide inorganique	Acide phosphorique
Acides organiques	Acide D(-)-Quinique Acide Erythronique Acide fumarique Acide Glycérique Acide lactique Acide Malique Acide Oxalique Acide Shikimique Acide Succinique Acide trans-Cafféique
Phosphates	L-Glycerol-3-phosphate Fructose-6-phosphate (fructose-6-phosphate 1+fructose-6-phosphate 2) Glucose-6-phosphate

	Acide 3-phosphate-Glycerique
Sucres	Acide 2-Keto-L-gluconic Glucose (glucose 1+glucose 2) Acide Gluconique Myo-Inositol 2-O-Glycerol-β-D-galactopyranoside Sucrose (sucrose 1+sucrose 2) Trehalose Galactinol Raffinose Fructose (fructose 1 + fructose 2) Maltose
Autres	1-Butyl-5-isopropyl-1H-indole-2,3-dione Allantoïne Urée

Tableau 4. Métabolites détectés par GC-MS et identifiés par le Golm Metabolome Database (5)

5. Biosynthèse des composés phénoliques majeurs

Les composés phénoliques représentent un groupe important des substances allélochimiques. On trouve parmi ceux-ci les acides gallique, vanillique, syringique, caféique, férulique et chlorogénique (45).

La biosynthèse des acides cinnamiques (en C6-C3) fait suite à la voie de synthèse du shikimate, par des hydroxylation et méthylation successives. La phénylalanine est transformée en acide E-cinnamique, lui même hydroxylé en acide p-coumarique, qui produit l'acide caféique par une nouvelle hydroxylation. La méthylation de l'acide caféique produit l'acide férulique (46).

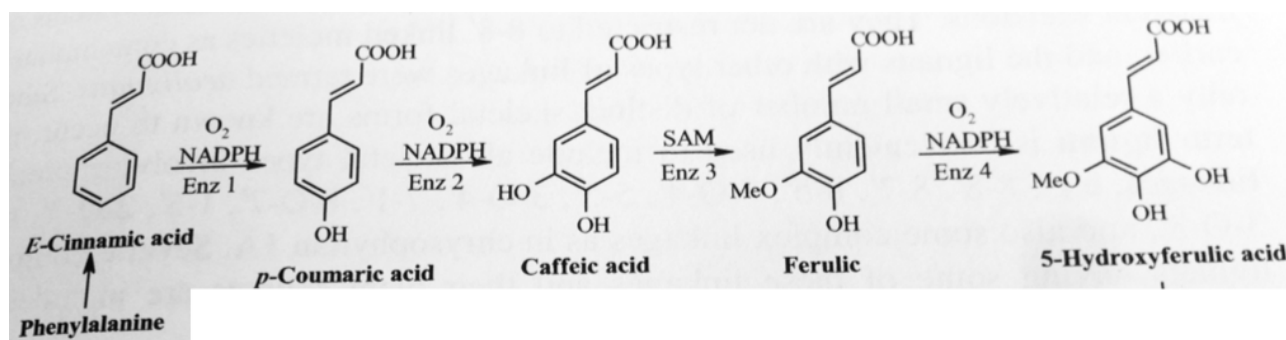


Figure 7. Biosynthèse des acides cinnamiques hydroxylés (d'après 36)

L'acide rosmarinique est un ester de l'acide caféique et de l'acide 3,4-dihydroxyphényllactique. Il a été identifié dans de nombreuses Lamiacées et Boraginacées, mais

également dans d'autres familles, il n'est donc pas utilisé comme un marqueur taxonomique. Il a été mis en évidence l'excrétion de l'acide rosmarinique par les racines de basilic en réponse à un éliciteur fongique et son activité antimicrobienne contre des micro-organismes des sols (45) ; même si son activité n'est pas clairement élucidée dans la mélisse, on peut supposer que la molécule joue un rôle de défense pour la plante. D'importance parmi les composés phénoliques de la mélisse, nous décrirons sa synthèse.

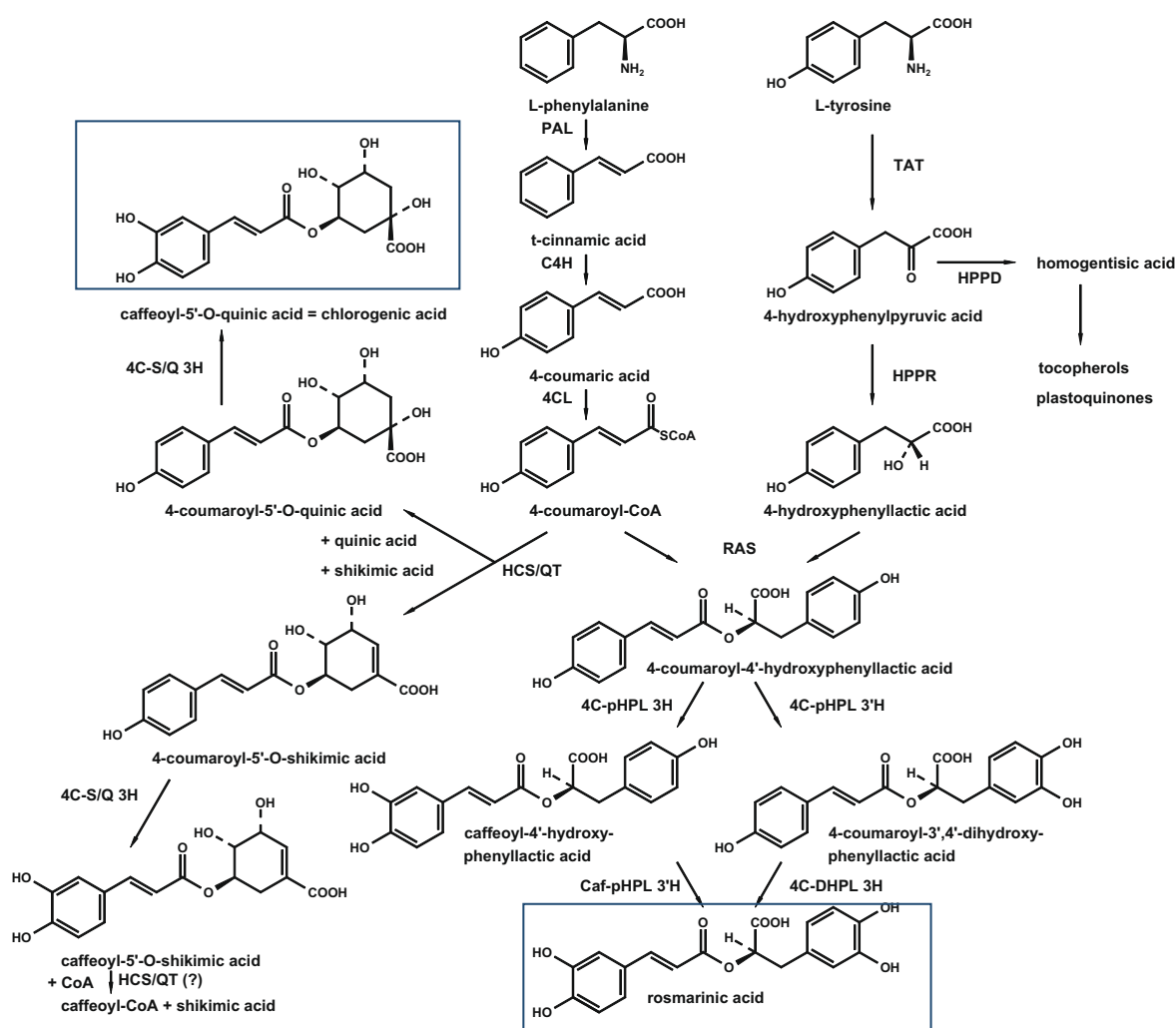


Figure 8. Voie de biosynthèse de l'acide rosmarinique et de l'acide chlorogénique (47) (avec PAL = phenylalanine ammonia lyase; C4H = cinnamic acid 4-hydroxylase; 4CL = 4-coumaric acid CoA-ligase; TAT = tyrosine aminotransferase; HPPR = hydroxyphenylpyruvate reductase; RAS = "rosmarinic acid synthase", hydroxycinnamoyl-CoA:hydroxyphenyllactate hydroxycinnamoyltransferase; 4C-pHPL 3H, 4C-pHPL 30H=4-coumaroyl-40-hydroxyphenyllactate 3/30-hydroxylases; Caf-pHPL 30H=caffeoyl-40-hydroxyphenyllactate 30-hydroxylase; 4C-DHPL 3H=4-coumaroyl-30,40- dihydroxyphenyllactate 3-hydroxylase; HPPD = hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; HCS/QT = hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase; 4C-S/Q 3H = 4-coumaroylshikimate/quinic acid 3-hydroxylase.)

Initialement la L-phenylalanine et la L-tyrosine sont transformées en précurseurs, le 4-coumaroyl-coA et l'acide 4-hydroxyphenyllactique. La transformation de la L-phenylalanine est catalysée par les enzymes de la voie métabolique des phénylpropanoïdes : la phénylalanine ammonia-lyse (PAL), la 4-hydroxylase de l'acide cinnamique (C4H) et la 4-acide coumarique coA-ligase (4CL). La tyrosine est transaminée par la tyrosine-aminotransférase (TAT) avec le 2-oxoglutarate en acide 4-hydroxyphenylpyruvique qui est réduite en acide 4-hydroxyphenyllactique par l'hydroxyphenylpyruvate reductase (HPPR).

Ces deux précurseurs sont couplés par estérification par la synthase de l'acide rosmarinique (RAS), avec production d'un coenzyme A et d'un acide 4-coumaroyl-4'hydroxyphenyllactique. Les groupements 3- et 3'-hydroxyl sont ajoutés par des monooxygénases dépendantes des cytochromes P450.

L'acide chlorogénique est formé par estérification d'un groupement hydroxycinnamoyl du 4-coumaroyl-coA et d'un acide quinique. Il est donc également issu de la voie de synthèse générale de phénylpropanoïdes. L'enzyme catalysant la réaction a été caractérisée comme étant la 4-coumaroylquinase 3-hydroxylase.

6. Méthodes d'analyse classiques de *M. officinalis*

La méthode officielle d'analyse et de dosage des principes actifs est décrite à la Pharmacopée européenne. La drogue définie à la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition est la feuille séchée de *M. officinalis*.

a. Méthode de la Pharmacopée Européenne : Chromatographie sur couche mince

La solution à examiner est préparée par distillation de 2,0 g de feuilles de mélisse pulvérisées dans 100 ml d'eau. 0,5 ml de xylène sont placés dans le tube gradué de l'appareil utilisé pour la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales. La phase organique récupérée dans un récipient jaugé est complétée à 1 ml avec du xylène.

La solution témoin contient 1,0 µL de citronellal et 10,0 µL de citral dans 25 ml de xylène.

20 µL de solutions témoin et à examiner sont déposés sur plaque au gel de silice et l'élution se fait avec la phase mobile à l'acétate d'éthyle et à l'hexane (10 : 90 V/V) sur 15 cm. Après séchage à l'air, la plaque est pulvérisée à l'aldéhyde anisique et chauffée à 100-105°C pendant 10-15 minutes.

Suite à la révélation, les bandes doivent apparaître sur la plaque comme suit :

Haut de la plaque	
----- Citronellal : une bande grise ou violet-gris à la frontière entre le tiers supérieur et le tiers moyen -----	----- Une bande grise ou violet-gris (citronellal) à la frontière entre le tiers supérieur et le tiers moyen Une bande violet rouge -----
Citral : 2 bandes violet-gris ou violet-bleu à la frontière entre le tiers moyen et le tiers inférieur	2 bandes violet-gris ou violet-bleu (citral) à la frontière entre le tiers moyen et le tiers inférieur
Solution témoin	Solution à examiner

Figure 9 : Schéma général d'une plaque de CCM de *M. officinalis* (33)

b. Méthode de la Pharmacopée Européenne : dosage de l'acide rosmarinique

La teneur en acide rosmarinique doit être au minimum de 1,0% dans la drogue desséchée.

La méthode consiste en une extraction de l'acide rosmarinique, puis par un dosage de l'acide rosmarinique avec la méthode des étalonnages externes.

L'échantillon de mélisse est broyé et partitionné et préparé comme suit :

- Pesée de 0,100 g de poudre dans un ballon de 250 mL
- ajout de 90 ml d'éthanol 50%,
- chauffage à reflux au bain-marie pendant 30 min à 95°C,
- filtration dans une fiole jaugée de 100 ml sur coton,
- rinçage du ballon et du filtre avec 10 ml d'éthanol 50% (compléter à 100 ml avec éthanol à 50% (à 20°C))

Les solutions d'étalonnage sont préparées comme suit :

- Une solution témoin mère acide rosmarinique : 20,0 mg d'acide rosmarinique SCR dans 100 ml d'éthanol 50% passé au bain-ultrasons puis thermostaté à 20°C.
- Une solution témoin fille : 20,0 ml de la solution mère (à 20°C) sont transférés dans une

fiolle de 100 ml qui est complétée avec de l'éthanol 50% (à 20°C)

- Une solution d'acide férulique : 5,0 mg d'acide férulique dans fiole 50 ml complétée avec la solution témoin fille d'acide rosmarinique (à 20°C)

L'analyse HPLC se fait sur un appareil couplé à un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 330 nm. Le volume d'injection est de 20µl et le débit est de 1,2 mL/min.

La composition des solvants d'élution est telle que :

- Phase mobile A : acide orthophosphorique 85%, acétonitrile, eau distillée (1 :19 :80 v/v/v)
- Phase mobile B : acide orthophosphorique 85%, méthanol, acétonitrile (1 :40 :59 v/v/v)

Temps en minutes	% phase mobile A	% phase mobile B
0	100	0
20	55	45
25	0	100
30	100	0

Tableau 5. Gradient de la phase stationnaire pour l'analyse HPLC de *M. officinalis* (33)

La résolution doit être au minimum 4,0 entre les pics dus à l'acide férulique et à l'acide rosmarinique.

$$R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

$t_{R2} > t_{R1}$

t_{R2}, t_{R1} = temps de rétention des pics,

w_{h1}, w_{h2} = largeur des pics à mi-hauteur.

La teneur pour cent en acide rosmarinique est calculée à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 0,2}{A_2 \times m_1}$$

Avec A_1 = surface du pic dû à l'acide rosmarinique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

A_2 = surface du pic dû à l'acide rosmarinique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a),

m_1 = masse de feuille de mélisse utilisée pour préparer la solution à examiner, en grammes,

m_2 = masse d'acide rosmarinique SCR utilisée pour préparer la solution témoin (a), en grammes,

p = teneur pour cent en acide rosmarinique de l'acide rosmarinique SCR.

La détermination par HPLC de la teneur en acide rosmarinique, est rendue en g pour 100g d'échantillon desséché.

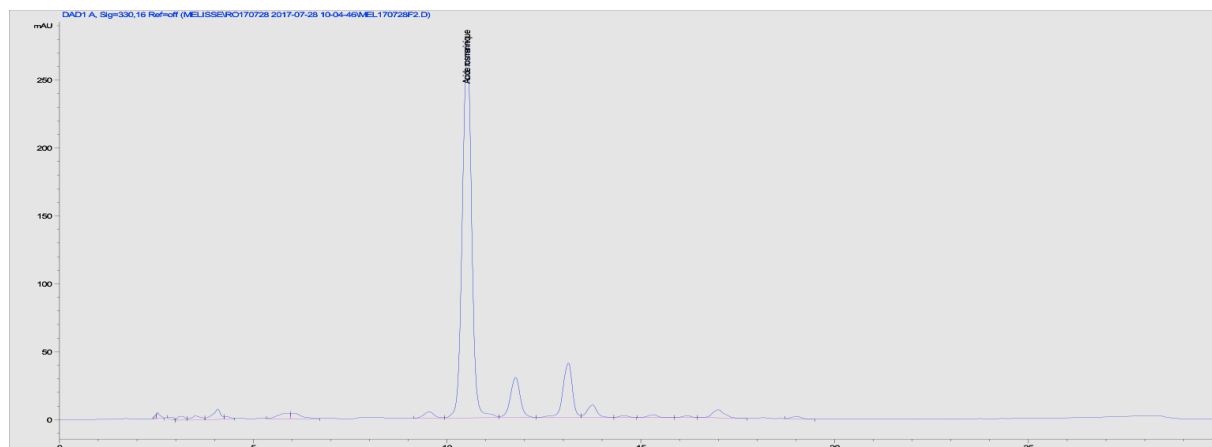


Figure 10 : Profil chromatographique d'un extrait de mélisse (données iteipmai)

IV. Matériel et méthode

1. Matières premières

1.1. Solvants et réactifs

Les produits utilisés sont de qualité analytique. Les réactifs utilisés sont : l'hexamethyldisilazane (HDMS), le chlorhydrate d'hydroxylamine, la pyridine, pyridine anhydre, l'acide trifluoroacétique (TFA), l'hexane HPLC. Les conditions de conservation de ces réactifs sont strictes car ils sont pour la majorité instables (tamis moléculaires ou flacons à usage unique).

1.2. Standards analytiques

Les témoins utilisés sont les suivants : D-(+)-glucose, acide rosmarinique, quercétine, acide chlorogénique, kaempferol, spireaoside, isorhamnétine, quercetin-3,4'-di-O-glucoside, lutéoline, luteolin-3',7-di-O-glucoside, apigénine, chrysine, myricétine, acide p-coumarique, quercitrine, acide caféiques, acide férulique et le triacontane. Le mélange linéaire d'alcane utilisé pour calculer les indices de rétention contient les alcanes C8 à C40. Les standards dérivatisés permettent de créer une bibliothèque interne.

1.3. Étalon interne

L'étalon choisi est un alcane de temps de rétention voisin de celui du marqueur ciblé. Un premier mode opératoire consiste à dissoudre l'étalon dans le dichlorométhane, le déposer dans le culot du vial servant à la dérivatisation et évaporer le solvant dans un bain de sable, 15 minutes à 55°C. L'autre manière de procéder est de diluer l'échantillon dérivatisé en solution hexanique d'étalon interne. Les concentrations de solution étalon ont été calculées telles que la quantité à l'injection soit de l'ordre de grandeur de celle du composé à doser. Lors des essais de méthode, ni l'étalonnage interne ni la quantification n'ont été systématiquement réalisés.

1.4. Échantillons

Les matières testées sont des produits à base de plante ou extraits dont l'identité exacte est confidentielle. Parmi ceux-ci nous avons étudiés des extraits d'ail et oignon, une teinture mère de propolis, un extrait d'artichaut, une teinture mère d'achillée, et des feuilles de mélisse. Parmi celles-ci certains échantillons provenaient des essais de la station avec des feuilles de *M. officinalis* L. subsp *officinalis* et de *M. officinalis* subsp *altissima*. Les prises d'essais ont été entre 0,002 g et 0,5 g selon la nature de l'échantillon sec.

Les essais de pré validation de méthode analytique sont réalisés sur des échantillons de mélisse. Le marqueur de qualité est l'acide rosmarinique, il est déjà dosé en routine par une méthode de la Pharmacopée utilisant l' HPLC.

2. Préparation de la matière à examiner

La méthode est développée pour les différentes formes d'échantillons reçues et analysées sur la matière en l'état, par le service du laboratoire :

- Des plantes fraîches ; la méthode est alors adaptée à la constitution de la plante. Par exemple un broyage en milieu hydro-alcoolique a été réalisé sur un oignon frais afin de stabiliser et extraire ses composés.
- Des jus/pâtes de plante fraîche* ; l'analyse de ce type d'échantillon, récolté directement par le producteur agricole sur le champ et transformé, pourrait être un outil de déclenchement de récolte pour la production d'extraits riche en composés d'intérêt polaires.
- Des extraits liquides, qui sont homogènes.
- Des plantes ou parties de plantes sèches ; c'est la forme de vente principale des producteurs de plantes médicinales car elle permet une bonne conservation de la matière.
- Des extraits secs pour certification.

Les essais réalisés à partir de plante entière, la mesure de la matière sèche obtenue par séchage une nuit à l'étuve à 110°C permet de calculer le pourcentage de matière sèche de la plante, afin de rapporter les résultats de quantification à la matière sèche réelle.

La dérivation requière des échantillons déshydratés car les réactifs interagissent avec l'eau. Il est donc possible d'opérer directement sur les matières sèches qui contiennent moins de

10% d'humidité résiduelle (Figure 11. (B)) ; si l'échantillon est une partie de plante entière, on procède à un broyage qui permet d'augmenter les surfaces de contact avec les réactifs.

D'après la littérature, il a été démontré que la dérivation directe sur la matière sans étape d'extraction est une méthode de choix (14,22). Cependant, ces essais portent sur des extraits, ce qui permet d'éviter la consommation de solvant par les matrices (parois cellulodiques).

Dans le cas de la mélisse, c'est la méthode de la Pharmacopée qui est suivie : 0,100g de plantes sont extraits à l'éthanol 50%, au chauffage à reflux (30 minutes).

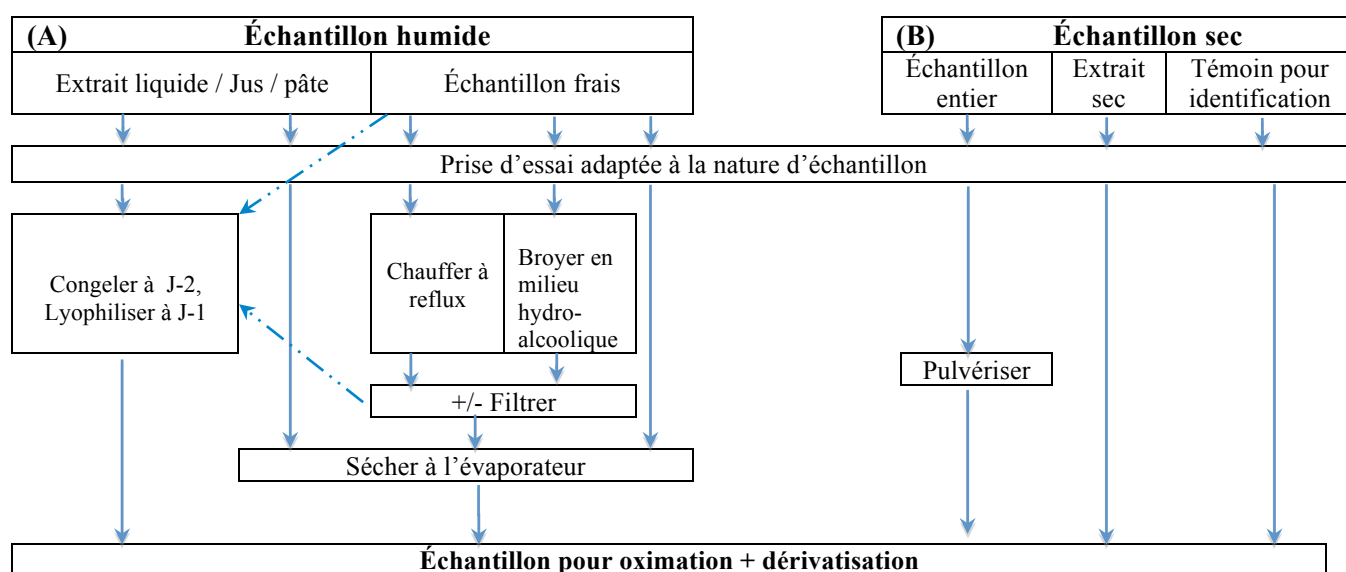


Figure 11. Protocole de traitement d'échantillon à analyser sous forme oxime-TMS par GC-MS

Des essais ont été testés avec plusieurs méthodes de séchage des matières humides (feuilles, parties de plantes, extraits) :

- ❖ Le séchage au sulfate de sodium a été testé sur un mélange de plantes mais n'a pas été concluant car les concentrations testées étaient trop faibles ; de plus ce type de séchage implique la présence d'un autre solvant que l'eau pour pouvoir séparer les cristaux de sulfate de sodium de la matière résiduelle.
- ❖ Une méthode de séchage à l'azote de 2 ml d'éthanol à 50% a permis d'évaporer ¼ du solvant en 30 minutes. Cette méthode n'a pas été reproduite sur les échantillons.
- ❖ Les solvants de la majorité des échantillons d'extraits de plantes fraîches (oignon, artichaut, mélisse, teintures mères d'achillée et de propolis) ont été évaporés sur évaporateur rotatif. Les durées étaient comprises entre 2 et 5 heures à des pressions comprises entre 50 et 150 mbar, à 40 à 50°C.

- ❖ Des profils satisfaisants ont été obtenus par lyophilisation d'extraits hydro-alcooliques de mélisse (Essai 1): l'éthanol était dans un premier temps évaporé puis la lyophilisation a été réalisée par un laboratoire partenaire.
- ❖ Les derniers échantillons de mélisse, extraits de la même manière sont mis à sec au SpeedVac. Cela correspond à une évaporation par centrifugation sous vide avec un système de régulation de température (40°C maximum). Les échantillons de mélisse utilisés pour la pré validation de méthode ont été préparés de cette manière (Essai 2).

3. Préparation des dérivés oximes-TMS

3.1. Prises d'essai

Initialement, nos PE d'échantillons mis à sec étaient comprises entre 0,080 et 0,150g de poudre, d'extrait sec ou d'extrait liquide mis à sec ou de 10 mg pour les témoins. D'après la littérature et nos essais, les prises d'essai adéquates sont définies telles que dans le Tableau 1. Les échantillons doivent être homogénéisés avant prélèvement, d'autant plus que les PE sont faibles.

Réf.	Matière analysée	Composés étudiés	Prise d'essai
(19)	standards analytiques ou matrices naturelles (différents taux de sucres)	sucres (redilués 5 à 20 fois selon le rapport sucre/ flavonoïde)	calculées pour avoir 5–80 ng saccharides/1 µL à l'injection
(22)	standards analytiques (majoritaires dans le mélange)	acide malique, di saccharides	0, 05 mg - 5 mg
	standards analytiques (minoritaires dans le mélange)	hydroxymethylfurfural, acides aminés, acides orthophosphoriques, acides carboxyliques, polyalcools et sucres	0,005- 0,25 mg
	pulpe fraîche d'abricot	acides aminés, acides carboxyliques, sucres, etc.	0,15-0,25g
	extrait méthanolique / éthanolique de pulpe d'abricot (5g/50ml)	acides aminés, acides carboxyliques, sucres, etc.	2 ml
(14)	poudre albedo de <i>Citrus</i>	acides aminés, acides carboxyliques, sucres, flavonoïdes, etc.	0,03-0,04 g
	jus de <i>Citrus</i>	acides aminés, acides carboxyliques, sucres, etc	0,2 g
	standards analytiques	acides malique et citrique, glucose, fructose et sucrose	5,0–100 mg/mL
	standards analytiques	acides aminés et acides carboxyliques tels que : acides phosphoriques, levulinique, triméthoxybenzoïque, 4-hydroxybenzoïque, vanillique, quinique, chlorogénique, rosmarinique, aspartique, glutamique, alanine, proline	0,1–20 mg/mL

Tableau 6. Analyse bibliographique des prises d'essai pour dérivation de différentes matrices

3.2.Dérivation par oximation et silylation

Comme décrit dans la publication de Füzfaï et Molnar-Perl en 2007 (14), les échantillons mis à sec sont chauffés au bain marie 30 minutes à 70°C dans 500 µL d'une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine à 2,5g/100ml de pyridine (Figure 12.). Ils sont ensuite additionnés de 900 µL d'HDMS et de 100 µL de TFA avant d'être chauffés au bain marie 1h à 100°C. Avant injection les échantillons dérivatisés sont filtrés sur filtre en PTFE.

Dans le protocole initial, les échantillons étaient re-dilués, avant injection en GC-MS, 5 à 20 fois dans l'HDMS selon le rapport sucres / flavonoïdes. Nous avons obtenus des profils satisfaisants pour les échantillons dilués dans l'hexane et le dichlorométhane sans décalage des pics.

3.3.Étalonnage interne

En GC-MS, en raison des très faibles volumes injectés, des risques d'imprécision dans la quantification existent. Un étalonnage interne permet de corriger les réponses des composés à quantifier par rapport à celles mesurée pour l'étalon interne de concentration connue. L'étalon choisi ne doit pas être présent dans la matrice étudiée et doit être inerte par rapport aux constituants de l'échantillon. Il doit être élué à un temps de rétention proche de celui du composé à doser avec une bonne résolution, sans chevauchement de pic et introduit à une concentration proche de celle des autres solutés à doser. Si l'étalon est introduit avant la préparation de l'échantillon, il permet de corriger les pertes occasionnées pendant les manipulations. Introduit après la dérivation, il permet de corriger les erreurs d'injection ou d'appareillage. Sa détection témoigne du bon déroulement de l'analyse.

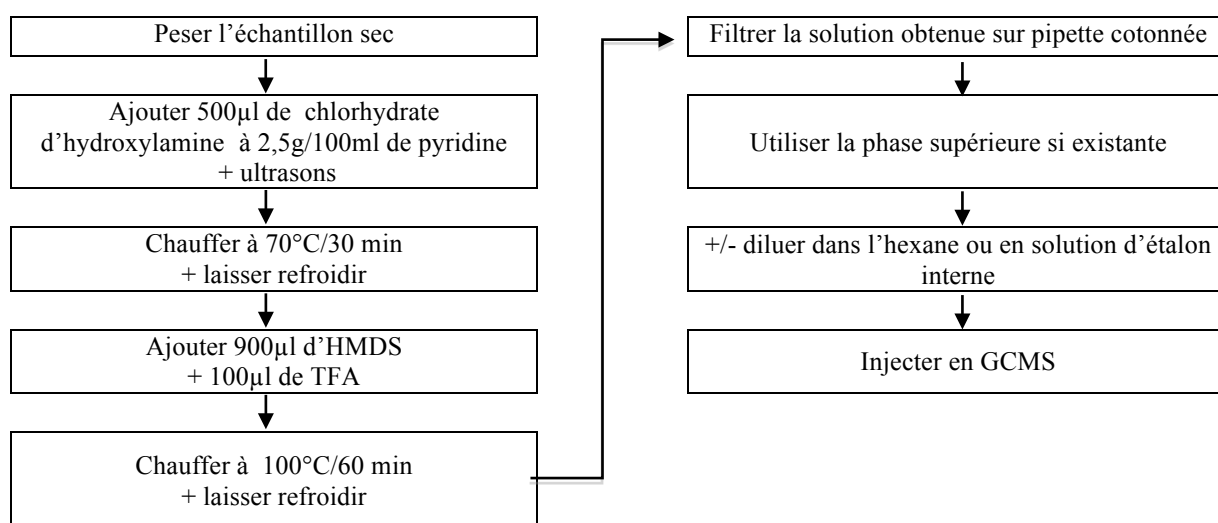


Figure 12. Protocole de dérivation oxime-TMS

Nous avons testé des alcanes pour l'étalonnage interne. Le premier choix portait sur l'alcane en C34, de temps de rétention proche de celui de l'acide rosmarinique de la mélisse. L'analyse a montré une co-élution des deux composés, nous avons donc reporté notre choix sur le triacontane, alcane en C30. Les concentrations de solution étalon ont été calculées telles que la quantité à l'injection soit $\approx 400 \mu\text{g/mL}$ soit environ la concentration d'acide rosmarinique attendue. Le solvant

de l'étalon interne est l'hexane qui solubilise le C30 et est miscible à la pyridine. De plus l'hexane a montré de bons résultats avec des temps de rétention inchangés par rapport aux échantillons non dilués et n'occasionne pas de perte de signal (10) contrairement à d'autres solvants (acétone, acétonitrile, méthanol). L'ajout de la solution d'étalon interne permet également d'effectuer des dilutions de l'échantillon à analyser, sans apporter un excès de solvant qui saturerait le détecteur.

4. Analyses en GC-MS

4.1.Appareillage de GC-MS

Les analyses sont réalisées sur un appareil Shimadzu GCMS-QP 2010 SE. L'appareil est pourvu d'un injecteur automatique AOC-20i avec passeur automatique de 150 vials et d'un injecteur en espace de tête. Les injections d'échantillons de 1 µL sont réalisées en mode direct avec une température d'injecteur réglée à 330°C, en mode split au 1/5^{ème}. Les septums et liner de l'insert sont changés toutes les 50 injections. La colonne capillaire utilisée au laboratoire est de type apolaire greffée en 5 % diphényle - 95 % diméthylpolysiloxane (DB-5), de diamètre interne de 0,250 mm avec un film de 0,25 µm d'épaisseur et mesurant 30 m de longueur.

L'analyseur est un simple quadripôle équipé de pré filtres. Le détecteur est un spectromètre de masse dont le mode d'ionisation est l'impact électronique (IE). L'énergie d'ionisation de la source est réglée à 70 eV pour nos analyses. La gamme de masse détectée a été paramétrée en mode *fullscan* de 25 à 1090 u.m.a. Le début d'acquisition a été fixé à 2,20 minutes pour limiter la saturation du détecteur par les solvants. Le package de logiciel d'analyse et de traitement « GCMS Solution version 4.20 » est développé par Shimadzu.

4.2.Méthode d'analyse

La température initiale du four de colonne est de 90°C, elle croît pour atteindre 120°C à 7 minutes puis 330°C à 38 minutes et 335°C à 51,90 minutes (temps total d'analyse). Le gaz vecteur est l'hélium de pureté 99.999 à 99,9999% circulant à un débit de colonne de 2,40 mL/min. La température de l'interface est fixée à 345°C et celle de la source à 255°C. Les paramètres de détection sont fixés tels que dans le Tableau 7. Le gradient de pression est le suivant : un plateau de pression à 168,8 kPa est maintenu 25 minutes puis la pression est augmentée jusqu'à 250 kPa à un

ratio de 16,0 kPa/minute.

Programme d'analyse	Début analyse (min)	Fin analyse (min)	Mode acquisition	Temps de balayage (sec)	Vitesse de scan	Ions scannés	
Programme 1	2,20	50,00	Scan	0,30	5000	Début : m/z 25	Fin : m/z 1090
Programme 2*	2,20	50,00	SIM	0,30	5000	Ch1-m/z : 396	Ch2-m/z : 219

*Spécifique pour détection de l'acide rosmarinique

Tableau 7. Paramètres d'acquisition du détecteur MS

5. Optimisation de la méthode de séparation des dérivés ester/éther tms-oxime

5.1 Paramétrage de GC-MS

Les paramètres d'acquisition étaient initialement basés sur la méthode d'analyse de Füzfai et Molnar-Perl (2007) (12) définie comme suit : un gradient de température de l'injecteur de 150 à 330°C, un gradient de four de colonne de 150 à 330°C, une température de la ligne de transfert de 280°C, et une analyse MS par un détecteur de type ion-trap sur les gammes de m/z 40 à 650 a.m.u. Au vu des nouvelles acquisitions de données, nous avons fait évoluer notre méthode d'analyse afin d'optimiser la qualité des résultats et en vue de l'appliquer à des matrices de compositions variées en métabolites. Par exemple, l'analyse d'échantillons d'oignon a montré la présence d'une forte proportion de sucres qui nécessitent une bonne séparation chromatographique pour être identifiés ; ceci implique un allongement du temps total d'analyse et en conséquence une diminution des gradients de températures de four de colonne. La fenêtre de températures de four de colonne entre 200 et 330°C permet l'élution de la majeure partie des composés. Jugée trop étroites dans les *méthodes 4acc2 et 9* (entre 5 et 8 minutes), elle a été augmentée dans la méthode 10. La *méthode 10 C*, linéaire, a finalement été établie à partir de la *méthode 10*.

Mise au point du gradient de température de CPG

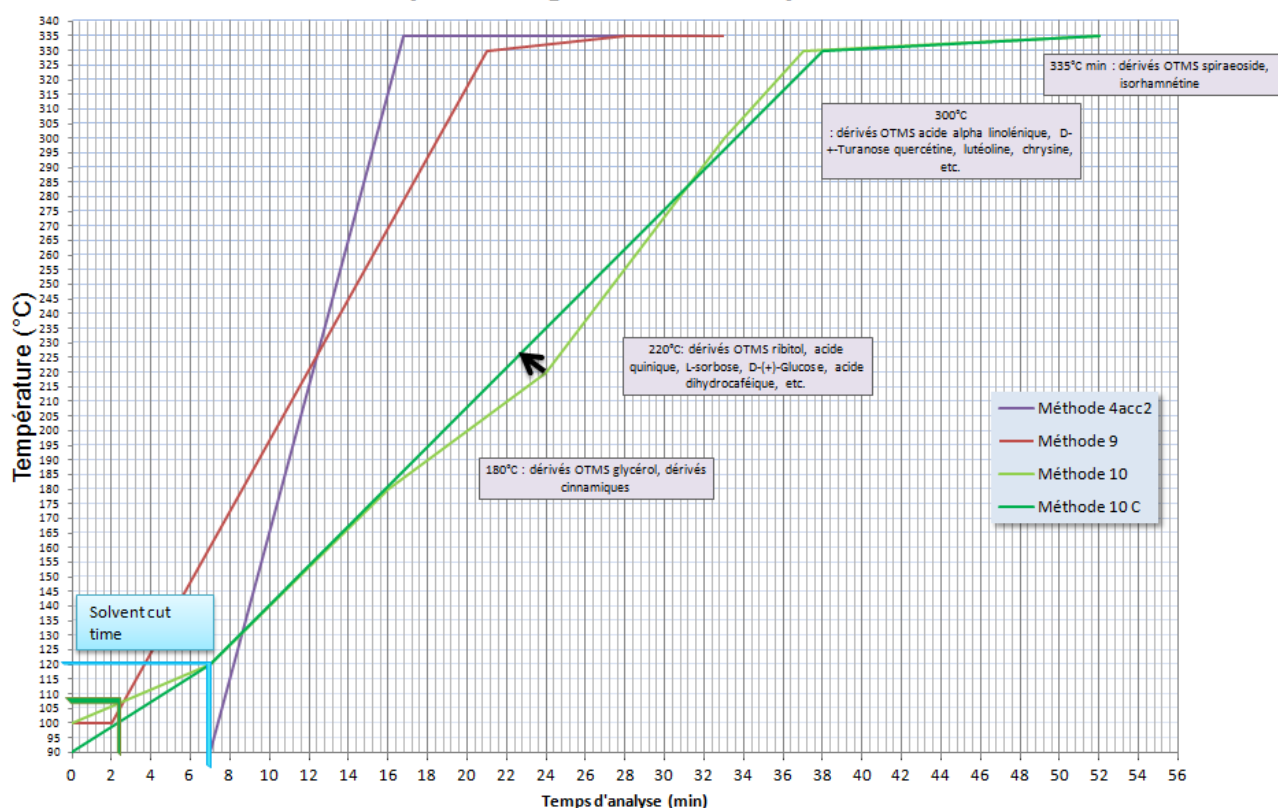


Figure 13. Outil de mise au point d'un gradient de températures du four de colonne

On observe sur le graphique des encadrés qui renseignent sur la nature des dérivés oxime-TMS élués aux environs des températures indiquées.

D'autres articles décrivant des méthodes d'analyses de sucres, acides aminés et acides organiques sous forme de dérivés oximes-TMS (13,14) ont servi à la mise au point du gradient de température et notamment à définir la température de début d'analyse.

Les méthodes intermédiaires testées ont permis de définir les nouvelles températures de l'injecteur, de la ligne de transfert et de la source, à paramétrer à leurs valeurs quasi maximales. En effet, les composés les plus lourds à éluer étant volatiles à des températures avoisinantes des 330°C, leur recondensation dans le système à des températures inférieures est à éviter. Pour faciliter leur élution, une augmentation de la pression a été paramétrée à 25 minutes d'analyse, ainsi qu'un plateau de température de four de colonne en fin d'analyse.

Le mode split (division de flux) est privilégié pour l'injection des échantillons dérivatisés qui contiennent un excès de réactifs, une part de composés non dérivatisés ou peu volatiles, qui peuvent saturer la phase stationnaire en début de colonne capillaire. De plus, les extraits de plantes étudiés contiennent des concentrations importantes de métabolites (exemple des sucres) qui

pourraient saturer le détecteur de masse en mode splitless (3). Les conditions d'acquisition de la méthode finale sont décrites dans la partie IV.4.2. Méthode d'analyse.

5.2 Modes d'acquisition

Mode Total Ion Chromatogram

(TIC). Le mode TIC permet de réaliser des analyses qualitatives et quantitatives. Le TIC permet d'obtenir un signal constitué par la somme des intensités des rapports m/z détectés à chaque scan (Figure 14., d'après (48)). Le signal est recueilli pour tous les ions compris

dans la gamme de masses fixée (m/z : 25-1090 u.m.a pour nos analyses) sur le chromatogramme rendant l'utilisation de ce mode est indispensable pour l'identification par comparaison aux bibliothèques. Le chromatogramme comprend les signaux de tous les composés injectés et le bruit de fond. La diminution de la gamme de rapport m/z balayée permet de gagner en sensibilité.

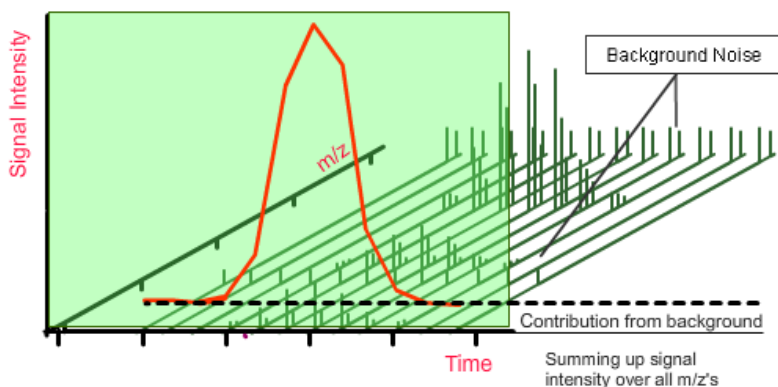


Figure 14. Acquisition de chromatogramme en mode TIC

Mode Selected Ion Monitoring (SIM). Ce mode de détection est basé sur le balayage des m/z des seuls ions sélectionnés. En mode quantitatif, il permet d'obtenir des limites de détection inférieures que celles obtenues en mode TIC car la sensibilité est accrue entre 10 et 100 fois. Il peut donc être utilisé pour détecter les composés traces dont les ions spécifiques sont connus (48).

6. Identification spectrales

Les études ont été menées sur des matrices de nature connue. Afin de rechercher les composés d'intérêt, des études bibliographiques préalables de composition ont été réalisées. De nombreux autres composés ont été identifiés de manière non ciblée. Ces études ont parfois permis de trouver les ions de référence de composés sous forme TMS.

Les analyses ont données lieu à la création de bibliothèques spectrales, lors de l'application du protocole à des témoins : flavonoïdes, dérivés cinnamiques, sucres, etc.

Pour l'identification les spectres sont étudiés et comparés à des spectres de masse issue de bases de données, le laboratoire dispose du pack NIST, une bibliothèque spectrale qui contient des

dérivés oxime-TMS, avec les spectres de masse, indices de rétention et parfois les structures des molécules. L'accès aux bases de données payantes *Human Metabolome Database* et *Golm Metabolome Database* a été utilisé dans la mesure du possible sur internet.

Un mélange d'alcane linéaires homologues allant de C8 à C40 avec un supplément de C30 (quantité arbitraire) a été injecté à chaque fin de batch d'analyse (0,1 µL) pour déterminer les indices de Kovats (IK) ou indices de rétention des composés élués dans nos conditions. Les IK ont été calculés pour chaque composé clairement identifié et enregistrés dans les bibliothèques. Ces IK permettent de caractériser les composés en plus des spectres de masse.

L'identification des dérivés oxime-TMS absents des bases de données peut être déduite, en comparant les masses ioniques observées à celles supposées d'après la structure moléculaire des dérivés oxime-TMS.

V. Résultats

1. Profils chromatographiques et identification des analytes

Des échantillons de plusieurs natures ont été analysés : extrait de plante fraîche, poudres, teintures mères et issus de différentes familles de plantes : alliées, astéracées, et lamiacées (Figure 13.). La propolis étant riche en flavonoïdes, dérivés cinnamiques et autres composés polaires, nous avons réalisés des essais sur une teinture mère de propolis préparée par la méthode. Ces essais ont servi notamment à établir les paramètres de la méthode d'acquisition, en vue de standardiser la méthode pour différentes natures d'échantillon.

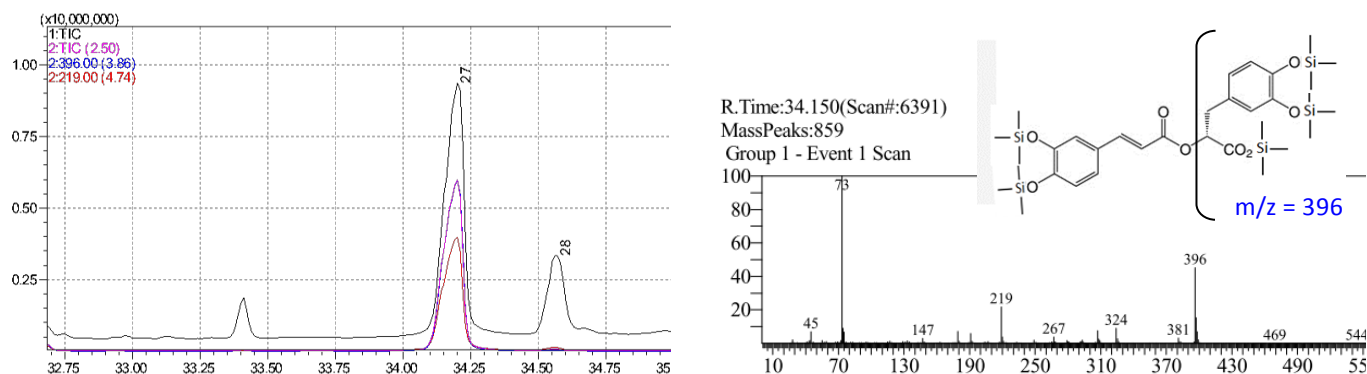


Figure 16. Chromatogramme de dérivés oximes-TMS de composés polaires de la mélisse et spectre de masse de l'acide rosmarinique

L'analyse GC-MS d'extraits polaires dérivatisés de mélisse en mode TIC et SIM (m/z : 396, 219) avec la méthode finale a permis d'obtenir des chromatogrammes de bonne résolution. 37 composés ont été identifiés automatiquement par le logiciel de traitement d'analyse, avec un pourcentage de similarité avec les bibliothèques fixé à 80% (voir Annexe III.).

2. Étude de spectres de composés complexes

Les chromatogrammes et les ions détectés révèlent la présence de plusieurs formes spectrales pour les flavonoïdes analysés. Par exemple, le dérivé oxime-TMS du kaempferol est éluée et donne un pic double sur le chromatogramme (Figure 17. (B)). L'analyse en SFI, qui permet d'afficher les chromatogrammes amplifiés d'ions spécifiques, révèle que les deux pics contiennent des dérivés différents.

Nous avons étudiés les schémas de fragmentation de composés complexes de la famille des flavonoïdes. Les nouvelles masses des ions moléculaires des dérivés oximes-TMS moléculaires peuvent être calculées : au cours des la réaction, des groupements $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ substituent les hydrogènes labiles, ajoutant ainsi des masses de $73 \times \text{nombre d'hydrogène substituables}$ sur les sites (Figure 17. (A)). Les ions moléculaires sont généralement présents dans les spectres. Les fragments ioniques retrouvés en abondance sur les spectres correspondent souvent à des pertes de groupements $-\text{CH}_3$ ($m/z = 15$) et $-\text{TMS}$ ($m/z = 73$).

Les témoins de dérivés oximes-TMS de diglucosides injectés n'ont pas permis d'observer de signaux sur les chromatogrammes.

La connaissance des fragments ioniques spécifiques de dérivés oxime-TMS est utile pour réaliser des acquisitions en mode SIM, et ainsi gagner en sensibilité analytique.

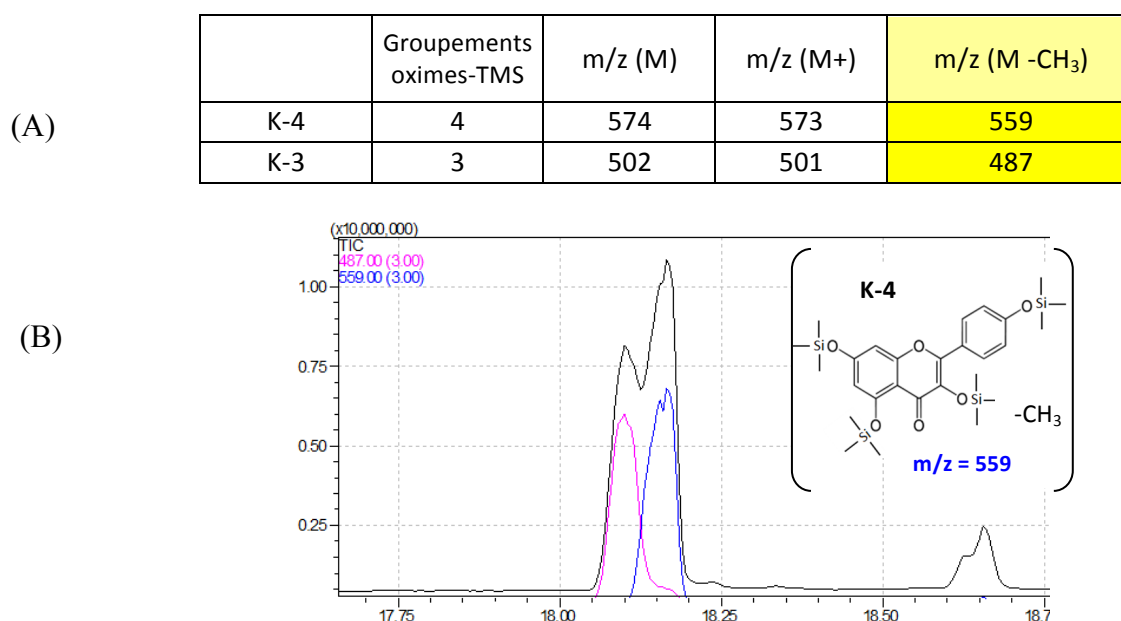


Figure 17. Chromatogramme d'acquisition et schéma de fragmentation du dérivé oxime-TMS du kampferol

3. Analyses quantitatives

Les analyses quantitatives ont été faites sur à partir d'un échantillon de parties aériennes de mélisse séchée en vue de quantifier l'acide rosmarinique. Un premier essai concerne un échantillon lyophilisé (Essai 1) et un deuxième essai est réalisé sur des échantillons préparés au Speedvac (Essais 2). Les échantillons sont dérivatisés selon le protocole décrit dans la partie expérimentale et analysé en GC-MS (Figure 18.).

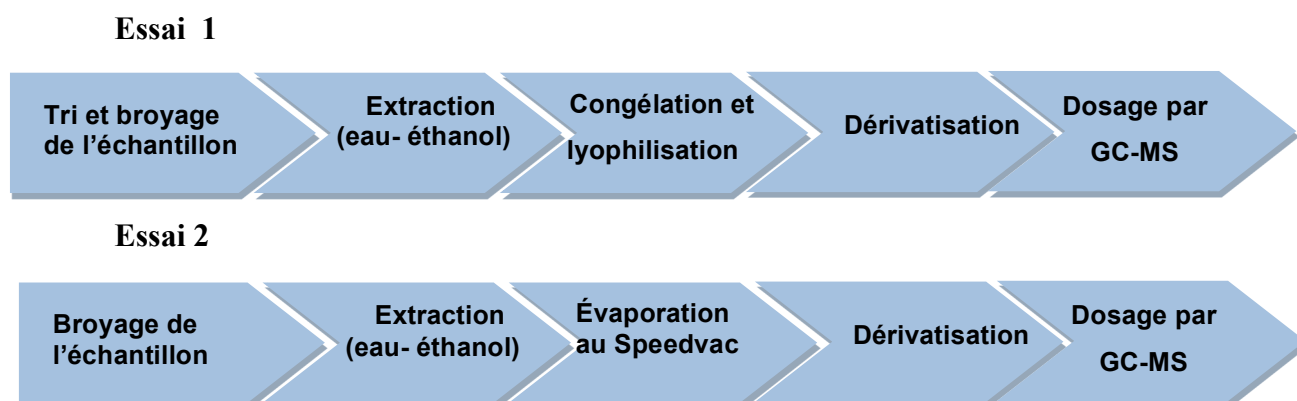


Figure 18. Traitement des échantillons de feuilles sèches de mélisse

3.1. Résultats de l'essai 1

Le rapport d'extraction est environ de 3 :1 pour l'extrait lyophilisé.

L'analyse de l'échantillon par la méthode mise au point (*méthode 10C*) a montré une bonne répétabilité des profils. L'acide rosmarinique a été dosé à 8.02% (écart type relatif de 1.79%) dans l'extrait, par étalonnage interne et comparaison à un témoin d'acide rosmarinique. Considérant la prise d'essai d'extrait lyophilisé, et le rapport à la quantité de matière initiale une quantité de 2,4 % d'acide rosmarinique a été calculée dans les feuilles sèches de l'échantillon.

Le personnel qualifié du laboratoire a effectué le dosage de l'acide rosmarinique dans l'échantillon brut de mélisse par la méthode officielle de la Pharmacopée. Une valeur de 1,9 % d'acide rosmarinique a été obtenue par HPLC.

La différence observée (20%) peut s'expliquer par la manière de procéder dans le sous-échantillonnage. Pour le dosage par HPLC, l'échantillon n'a pas été trié tandis que pour le dosage par GC-MS, les tiges de mélisse ont été retirées. Comme elles représentent environ 20% de la masse de l'échantillon mais qu'elles ne contiennent presque pas d'acide rosmarinique, l'écart observé entre les deux analyses est cohérent.

3.2. Résultats de l'essai 2

Les répétitions sont réalisées sur 3 extraits issus du broyage d'un même lot de mélisse. Le séchage de l'extrait au Speevac donne un rapport d'extraction de 2,75 :1 en moyenne. La gamme d'étalonnage comporte les points 300, 400, 500, 600, 800, 1000 µg/ml pour cet essai avec un coefficient de régression linéaire de 0,997 (une valeur aberrante est supprimée pour le point de gamme à 400).

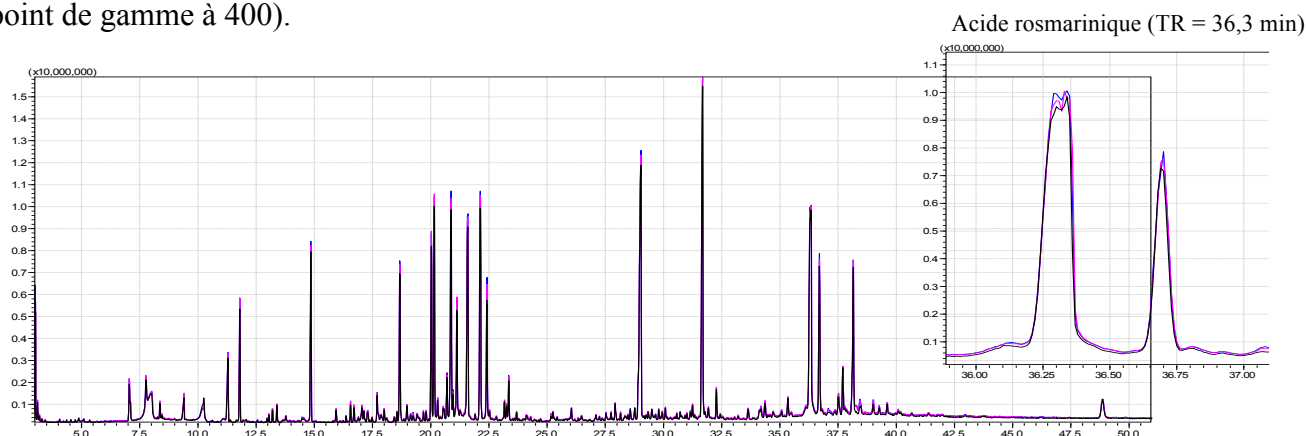


Figure 19. Chromatogrammes d'extraits de mélisse dérivatisés (triplicat échantillon 1)

Le dosage est réalisé par la méthode d'étalonnage interne, et par rapport au point de gamme à 1000 µg/ml. L'acide rosmarinique est dosé en moyenne à 8,6% dans les extraits secs *Melissa officinalis* subsp *officinalis* avec un écart type relatif de 3,2%.

En respectant les rapports d'extraction respectifs de chaque répétition d'échantillons, on obtient une moyenne de 3,5% d'acide rosmarinique dans la matière sèche de parties aériennes de mélisse (écart type relatif : 9,1%). Le résultat obtenu par la méthode de dosage officielle est de 3,93%, équivalant à un écart de 10,9% avec la méthode testée.

L'extrait de *Melissa officinalis* subsp *altissima* est dosé à 7,8% en acide rosmarinique ce qui équivaut à 3,64% dans la matière sèche initiale. Ce résultat présente un écart de 9,8% avec le résultat obtenu par le personnel du laboratoire (3,43%).

4. Robustesse de la méthode appliquée à *M. officinalis*

La robustesse d'une méthode analytique est sa capacité à supporter de petites variations des paramètres de la méthode, sans conséquences sur les résultats. Ces variations sont susceptibles de se produire en conditions réelles au laboratoire.

Dans le cas de ce dosage qui comporte de nombreuses étapes avec des opérations réalisées sur des petits volumes, on peut dire que la répétition de dosage sur l'extrait est robuste. Le temps écoulé entre la première analyse d'échantillon et la dernière est d'environ 8 heures. On obtient des résultats avec 3,2% d'écart type relatif.

Pour tous les essais réalisés, l'écart obtenu avec le résultat valide du personnel du laboratoire est toujours égal ou supérieur à 10% ; on peut supposer que les étapes intermédiaires de séchage et de transfert des échantillons induisent des variations qui impactent les résultats finaux.

VI. Discussion et perspectives

L'analyse des composés polaires par GC-MS après dérivation est réalisée depuis une trentaine d'années, permettant l'accès à de nombreuses données sur les protocoles existants. Le choix des réactifs dépend des familles de molécules à dériver. La silylation permet d'analyser un spectre large de molécules : acides aminés, acides gras, lipides, amines, alcools, sucres, sucres aminés, polyols, composés aromatiques, purines et stérols, c'est pourquoi le développement des bibliothèques spectrales a favorisé le recensement de métabolites oximés et silylés. Certaines

familles de molécules à analyser ont des cinétiques de réactions longues et produisent des dérivés instables comme nous l'avons vu pour les acides aminés, qui seront difficilement quantifiables. Les différents agents de silylation présentent des réactivités différentes. Les différents agents de silylation permettent d'obtenir des efficacités de dérivation variables, mais également des probabilités de formation d'artéfacts proportionnelles à la réactivité qui peuvent compliquer les chromatogrammes.

L'analyse de composés polaires d'extraits de plantes après déshydratation, dérivation et injection en GC-MS a été réalisée d'après une méthode éprouvée ayant permis la quantification de métabolites de la famille des *citrus*.

La diversité des matrices étudiées a permis d'obtenir des données concernant les modes préparation des échantillons avant la dérivation. Des résultats d'analyses chromatographiques satisfaisants ont été obtenus à partir d'échantillons mis à sec par évaporation sous basse pression, lyophilisation et par concentration sous vide. La méthode de séchage à l'évaporateur est longue pour les prises d'essai que nous avons testées (plusieurs heures), des réarrangements peuvent se produire entre les composés (sucres) avec le chauffage. Des prises d'essai plus faibles d'échantillons pourraient permettre de diminuer le temps de séchage. Par ailleurs, l'évaporation complète d'un mélange de deux solvants est impossible car les équilibres liquide-vapeur de solvants limitent l'évaporation. Le solvant ayant la température d'ébullition la plus élevée (l'eau généralement) se retrouve concentré dans le ballon. Néanmoins il est possible d'obtenir des profils chromatographiques corrects malgré la présence de faibles traces d'eau. De très bonnes qualités de matières déshydratées sont obtenues par la lyophilisation. La technique est limitée par la nature des solvants présents dans l'échantillon : seule la sublimation de l'eau est possible pour ce type d'appareillage, tout autre solvant doit donc être éliminé préalablement. Cette méthode ne peut être utilisée pour des analyses urgentes (échantillons frais) car elle prend 2 jours pour allier congélation et lyophilisation totale. Cette technique présente l'avantage majeur de ne pas soumettre l'échantillon à des températures élevées et limite la dégradation des composés.

La méthode de dérivation par oximation et silylation mise en pratique est inchangée par rapport à la publication de référence (14) tandis que la méthode d'analyse a été adaptée pour permettre l'élution d'un grand nombre de composés. Bien que laborieuse, la méthode de dérivation d'échantillons secs nous a permis d'analyser la composition de matrices complexes contenant des proportions importantes de sucres et de composés polaires de natures variées, telles que de l'oignon et la teinture mère de propolis. Les échantillons que nous avons dérivés ont donnés des profils différents selon les prises d'essai réalisées (de 0,010 à 0,100 g). Sachant que les plantes contiennent des ratios de composés différents d'une plante à l'autre, il est nécessaire

d'adapter la préparation aux cibles présentes dans un même échantillon. Pour l'analyse des composés concentrés on pourra effectuer une dilution dans l'hexane avant l'analyse, augmenter le ratio de split ou dans le cas de composés faiblement présent, augmenter le volume d'injection en GC-MS. Pour toutes les analyses, il faut cependant éviter la saturation du détecteur de masse pour préserver la qualité des résultats.

Les essais de quantification de marqueur de la mélisse suggèrent une bonne répétabilité des analyses par GC-MS avec des écarts types relatifs excédant à peine les 3%. La CPG, qui permet d'obtenir de très bonnes résolutions parmi les méthode de séparation chromatographique, a permis d'obtenir des profils interprétables et répétables pour un même échantillon. La méthode n'est pas encore validée, cependant les essais montrent que l'étalonnage interne par un alcane semble être une bonne approche pour la quantification d'après nos résultats. Les résultats de quantifications de l'acide rosmarinique de la mélisse sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus par la méthode officielle de dosage. Cependant, l'écart observé (10% ou plus) est trop important pour valider ces essais. Pour la poursuite des essais, la quantification de l'acide rosmarinique de la mélisse pourrait être optimisée en diluant les échantillons, et en utilisant une gamme d'étalonnage avec des points de concentrations plus faibles.

De manière générale, afin d'améliorer leur précision et de limiter les pertes de matières lors des manipulations :

- Les étapes de préparation de l'échantillon et de dérivation doivent être réalisées dans la même verrerie pour limiter les pertes au transfert ;
- Les prises d'essai doivent être supérieures à 25 mg pour tous les échantillons à dériver, en raison de la précision des balances ;
- Les quantités de solvants doivent être augmentées si nécessaire (échantillons trop concentrés) ou les échantillons doivent être dilués avant injection.

La GC-MS permet d'analyser les composés relativement volatiles. L'élution des composés sous forme de dérivés oximes-TMS est possible jusqu'à une certaine masse de composés et dans les limites de températures du système. Les composés de poids moléculaires élevés sont moins volatiles, et au delà des indices de rétention de 3500 (Indices de Kovats), les chromatogrammes contiennent très peu de pics. Nous n'avons pas pu observer sur les chromatogrammes les pics correspondant aux témoins de dérivés oximes-TMS de diglucosides (masses molaires d'environ 1 000 g/mol). Pour ces ordres de grandeur de masses et d'indices de rétention, les résultats

d'identification et de quantification sont moins fiables. La technique est donc limitée par le paramètre de la masse comme beaucoup de techniques analytiques (sauf la RMN).

De manière générale en CPG, les quantités d'injection sont infimes (1µL), ce qui pose le problème de la représentativité des échantillons. Les seuils de détection sont en conséquence inférieurs à ceux obtenus par des méthodes comme la LC-MS qui permet d'injecter de plus grands volumes. Cependant, le couplage au spectromètre de type quadrupôle permet la détection avec une haute sensibilité. Les analyses réalisées en mode SIM permettent de détecter des composés à l'état de traces. L'analyse des résultats en utilisant le mode Select Fragment Ion, permet d'amplifier les signaux des ions et ainsi de les détecter dans les chromatogrammes acquis en mode TIC. Le dérivé oxime-TMS de l'acide rosmarinique a été détecté à des concentrations 100 µg/ml avec des ratio signal/bruit excédant les 200 (données du logiciel non présentées), ce qui permet d'extrapoler des limites de quantification et de détection à des concentrations bien inférieures.

L'identification de nombreux composés par leur spectre de masse en une seule injection est un avantage important de la méthode par rapport à d'autres techniques de chromatographie, qui permettent la séparation et la caractérisation d'un nombre limité de composés à la fois. L'application du protocole à des témoins de la famille des flavonoïdes a permis d'obtenir de nouvelles informations sur les schémas de fragmentation de composés complexes. Les formes aglycones ont été détectées, comme le soutiennent les résultats de Fuzfaï et Molnar-Perl en 2007 (14) ainsi que des formes hétérosides (monoglycosylées). L'étude de fragmentation des témoins injectés a permis de faciliter l'élucidation spectrale de différentes familles de molécules. De plus, la reproductibilité de l'ionisation par impact électronique est un avantage pour l'identification de composés inconnus à travers des études bibliographiques.

La mise en œuvre du protocole a permis l'identification de 37 métabolites sur parties aériennes de mélisse. L'analyse des intermédiaires de synthèse des métabolites d'intérêt permet d'étudier l'impact des facteurs externes sur la production de métabolites secondaires. En 2011, Kim et al. ont évalué l'impact de l'administration de sucrose sur culture *in vitro* de feuilles de mélisse. L'analyse des composés dérivatisés a permis l'identification de 64 métabolites. Le traitement des résultats, réalisé par analyse des composantes principales, a révélé que le traitement par les doses de sucrose les plus fortes augmente les teneurs en sucres, polyols, sucres phosphatés. Il y a également une augmentation de proline et d'acide succinique, corrélés à la voie des pentoses, la voie de l'acide shikimique et la biosynthèse de phénylpropanoïdes. L'activation de cette voie mène à l'augmentation de production d'acide cafféique. Ainsi le profilage métabolique peut être un outil

pour la compréhension du métabolisme de plante et pourra peut être aboutir à la mise au point de nouvelles pratiques culturelles.

VII. Conclusion

La mise en pratique de la méthode a permis d'acquérir de l'expérience sur les aspects de la préparation, de la dérivation et de l'analyse d'échantillons polaires par GC-MS. Cette méthode nécessite des préparations longues d'échantillons et ne permet de préparer que peu d'échantillons à la fois. Néanmoins, la quantité d'informations de quantification et d'identification pouvant être obtenue est importante en comparaison à d'autres méthodes, avec des sensibilités nécessitant peu de matières premières. Les méthodes de dérivation et d'acquisition sont standardisées et permettent l'analyse d'échantillons de natures variées, avec des perspectives prometteuses pour l'étude des plantes médicinales.

Références bibliographiques

1. Le pharmacien et les plantes. Les cahiers de l'Ordre national des pharmaciens; 2014.
2. FranceAgriMer. Données et bilans, Filière plantes à parfums, aromatiques et médicinales, Panorama 2015. 2016.
3. Villas-Bôas SG, Smart KF, Sivakumaran S, Lane GA. Alkylation or Silylation for Analysis of Amino and Non-Amino Organic Acids by GC-MS? *Metabolites*. 2011 Jan 17;1(1):3–20.
4. Koek MM, Muilwijk B, van der Werf MJ, Hankemeier T. Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*. 2006;78(4):1272–1281.
5. Kim S, Shin MH, Hossain MA, Yun EJ, Lee H, Kim KH. Metabolite profiling of sucrose effect on the metabolism of *Melissa officinalis* by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2011 Apr;399(10):3519–28.
6. Kim S, Yun EJ, Hossain MA, Lee H, Kim KH. Global profiling of ultraviolet-induced metabolic disruption in *Melissa officinalis* by using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2012 Aug;404(2):553–62.
7. Fernandez O, Urrutia M, Bernillon S, Giauffret C, Tardieu F, Le Gouis J, et al. Fortune telling: metabolic markers of plant performance. *Metabolomics* [Internet]. 2016 Oct [cited 2017 Aug 11];12(10). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11306-016-1099-1>
8. Prasain JK, Wang C-C, Barnes S. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radic Biol Med*. 2004 Nov;37(9):1324–50.
9. Tekel J, Daeseleire E, Heeremans A, van Peteghem C. Development of a Simple Method for the Determination of Genistein, Daidzein, Biochanin A, and Formononetin (Biochanin B) in Human Urine. *J Agric Food Chem*. 1999 Sep;47(9):3489–94.
10. Moors S, Blaszkewicz M, Bolt HM, Degen GH. Simultaneous determination of daidzein, equol, genistein and bisphenol A in human urine by a fast and simple method using SPE and GC-MS. *Mol Nutr Food Res*. 2007 Jul;51(7):787–98.
11. Crighton E, Mullaney I, Trengove R, Bunce M, Maker G. The application of Metabolomics for Herbal medicine pharmacovigilance: A case study on ginseng. Vol. 60. 2016. 429 p.
12. Orata F. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. In: *Advanced Gas Chromatography-Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications* [Internet]. InTech; 2012 [cited 2017 Aug 11]. Available from: <https://www.intechopen.com/download/pdf/32817>
13. Sellers K. Why Derivatize? Improve GC Sep Deriv Retrieved Sept [Internet]. 2012 [cited 2017 Apr 4];5. Available from: <http://www.restek.com/pdfs/CFTS1269.pdf>
14. Füzfa Z, Molnár-Perl I. Gas chromatographic–mass spectrometric fragmentation study of flavonoids as their trimethylsilyl derivatives: Analysis of flavonoids, sugars, carboxylic and amino acids in model systems and in citrus fruits. *J Chromatogr A*. 2007 May;1149(1):88–101.
15. Bonaduce I, Brecolaki H, Colombini MP, Lluveras A, Restivo V, Ribechini E. Gas chromatographic–mass spectrometric characterisation of plant gums in samples from painted works of art. *J Chromatogr A*. 2007 Dec;1175(2):275–82.
16. Rohloff J. Analysis of Phenolic and Cyclic Compounds in Plants Using Derivatization Techniques in Combination with GC-MS-Based Metabolite Profiling. *Molecules*. 2015 Feb 17;20(2):3431–62.
17. Quéro A, Jousse C, Lequart-Pillon M, Gontier E, Guillot X, Courtois B, et al. Improved stability of TMS derivatives for the robust quantification of plant polar metabolites by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2014 Nov;970:36–43.
18. Horvath K, Molnár-Perl I. Simultaneous quantitation of mono-, di- and trisaccharides by GC-MS of their TMS ether oxime derivatives: II. In honey. *Chromatographia*. 1997;45(1):328–335.
19. Füzfa Z, Boldizsár I, Molnár-Perl I. Characteristic fragmentation patterns of the

- trimethylsilyl and trimethylsilyl–oxime derivatives of various saccharides as obtained by gas chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008 Jan;1177(1):183–9.
20. Kamerling JP, Vliegthart JFG, Vink J, De Ridder JJ. Mass spectrometry of pertrimethylsilyl oligosaccharides containing fructose units. In: *Tetrahedron*. Pergamon Press. 1972.
 21. Ruiz-Matute AI, Hernández-Hernández O, Rodríguez-Sánchez S, Sanz ML, Martínez-Castro I. Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses. *J Chromatogr B*. 2011 May;879(17–18):1226–40.
 22. Katona ZF, Sass P, Molnár-Perl I. Simultaneous determination of sugars, sugar alcohols, acids and amino acids in apricots by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1999;847(1):91–102.
 23. Nolvachai Y, Marriott PJ. GC for flavonoids analysis: Past, current, and prospective trends: Gas Chromatography. *J Sep Sci*. 2013 Jan;36(1):20–36.
 24. Molnár-Perl I, Horváth K, Barthá R. GC-MS quantitation of benzoic and aralkyl carboxylic acids as their trimethylsilyl derivatives: In model solution I. *Chromatographia*. 1998;48(1–2):101–110.
 25. Babulka P. La mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Phytotherapie*. 2005 Jun;3(3):114–7.
 26. Couplan F. Le règne végétal , Plantes sauvages comestibles. *Sang de la terre*. 2009.
 27. Binello A, Cravotto G, Boffa L, Stevanato L, Bellumori M, Innocenti M, et al. Efficient and selective green extraction of polyphenols from lemon balm. *Comptes Rendus Chim*. 2017 Sep;20(9–10):921–6.
 28. Shakeri A, Sahebkar A, Javadi B. *Melissa officinalis* L. – A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*. 2016 Jul;188:204–28.
 29. Dupont F, Guignard J-L. Botanique, Les familles de plantes. In Elsevier Masson; 2015. p. 279–323.
 30. SARI AO, CEYLAN A. Yield characteristics and essential oil composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) grown in the Aegean region of Turkey. *Turk J Agric For*. 2002;26(4):217–224.
 31. Wichtl M, Anton R. Plantes thérapeutiques, Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. In: Éditions TEC & DOC. Lavoisier; 2003. p. 382–6.
 32. Description de *Melissa officinalis* L. [Internet]. [cited 2017 Nov 15]. Available from: <http://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-41898-description>
 33. EDQM. Pharmacopée Européenne. Conseil de l'Europe. Vol. I. 2016. 1533-1534 p.
 34. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants - volume 2, *Folium Melissa* [Internet]. [cited 2017 Nov 16]. Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/fr/d/Js4927e/18.html#Js4927e.18>
 35. Chambre d'agriculture Rhône-Alpes. La mélisse en agriculture biologique. *Agriculture Biologique, Fiches technico-économiques*; 2015.
 36. CNPMAI. Mélisse, Acquisition de diversité génétique. 2014.
 37. iteipmai. Itinéraire technique de production de mélisse. 2009.
 38. Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. In: 5e ed. Lavoisier Tec & Doc; 2016. p. 787–9.
 39. Barros L, Dueñas M, Dias MI, Sousa MJ, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR. Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chem*. 2013 Jan;136(1):1–8.
 40. Skendi A, Irakli M, Chatzopoulou P. Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. *J Appl Res Med Aromat Plants*. 2017 Sep;6:62–9.
 41. Carnat AP, Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharm Acta Helv*. 1998;72(5):301–305.
 42. Patora J, Klimek B. Flavonoids from lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae). *Acta*

Poloniae Pharmaceutica. 2002;59(2):139–43.

43. Heitz A, Carnat A, Fraisse D, Carnat A-P, Lamaison JL. Luteolin 3'-glucuronide, the major flavonoid from *Melissa officinalis* subsp. *officinalis*. *Fitoterapia* 71. 2000;201–2.

44. Ieri F, Cecchi L, Vignolini P, Belcaro MF, Romani A. HPLC/DAD, GC/MS and GC/GC/TOF analysis of Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) sample as standardized raw material for food and nutraceutical uses. *Adv Hortie Sci.* 2017;31(2).

45. Mander L, Liu H-W (Ben). *Comprehensive natural products II*. In: Elsevier Ltd. 2010. p. 543, 554–5.

46. Talapatra SK, Talapatra B. Shikimic acid pathway. In: *Chemistry of plant natural products*. Springer. 2015. p. 635.

47. Petersen M, Abdullah Y, Benner J, Eberle D, Gehlen K, Hücherig S, et al. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*. 2009 Oct;70(15–16):1663–79.

48. Total Ion Chromatogram, Shimadzu [Internet]. Available from: http://www.shimadzu.com/an/total_ion.html

Annexes

Annexe I

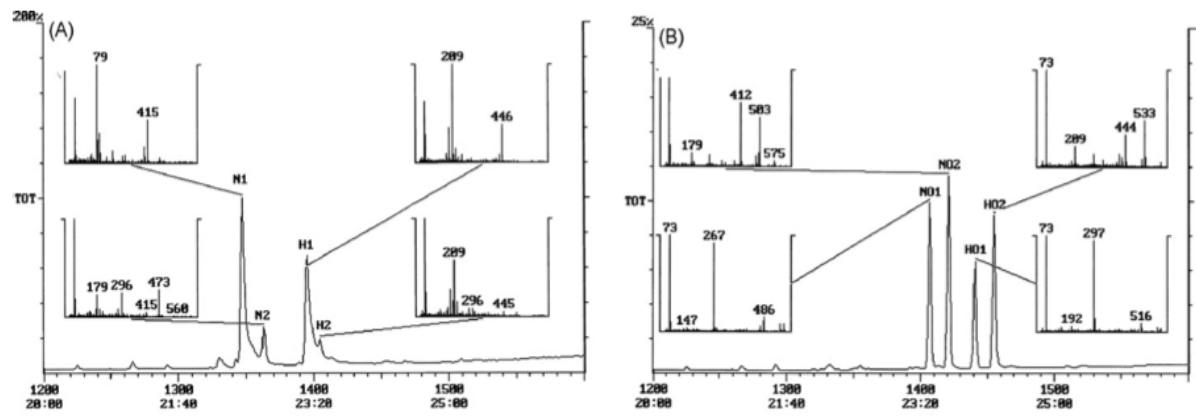


Fig. 3. (A and B) Elution profile and mass spectra of the trimethylsilyl (A: N1, N2, H1, H2) and that of the trimethylsilyl oxime (B: NO1, NO1, HO1, HO2) derivatives of naringenin and hesperetin.

D’après la publication Füzfai et Molnar Perl 2007 (14).

Annexe II : Conditions chromatographiques méthode TMS4acc2

C:\GCMSsolution\Data\GCMS DATA\INJ AOC 20\DERIVATISATION\methodeTMS acc2.qgm

Méthode TMS4acc2 :

- Viscosity Comp. Time : 0.2 sec
- Température four colonne :
- Température injecteur : 250 °C
- Injection mode : split
- Flow control mode : Pressure
- Pressure 137.2 kPa
- Débit total : 12,3 ml/min
- Débit de colonne : 1,72 ml/min
- Split ratio : 1/5^{ème}
- Total Program Time : 31. 8min
- Ion Source Temp : 255°C
- Interface temperature : 345°C
- Solvent Cut Time :2 min

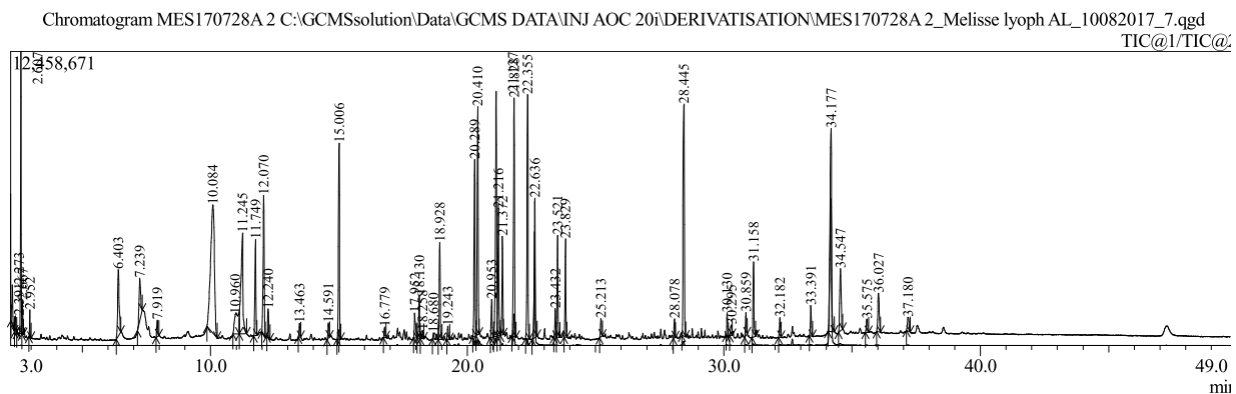
Pente (°C/min)	Température du four en °C	Durée en min
0	40	5
25	335	15

40°C

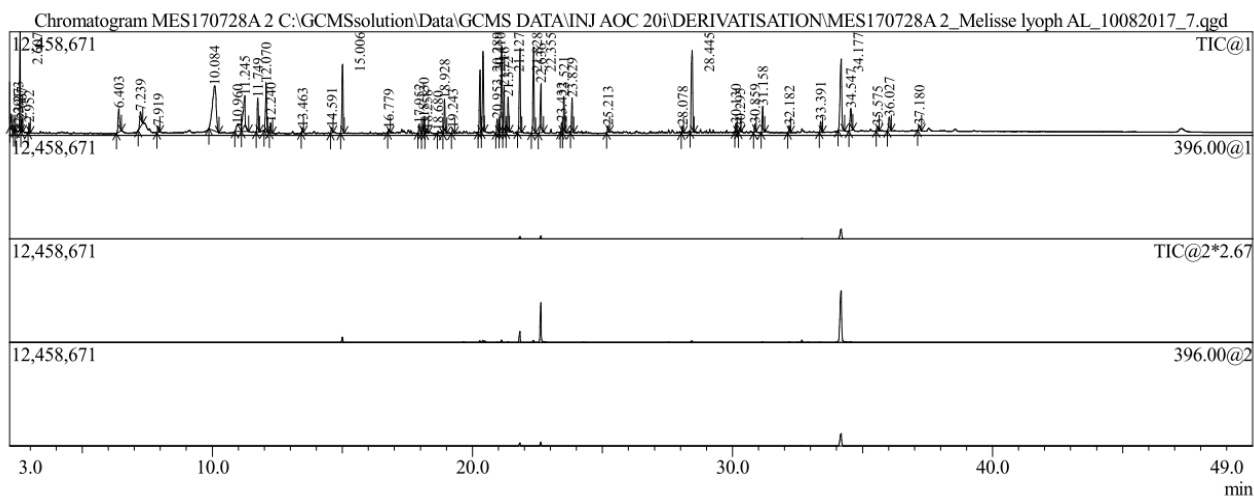
Début analyse	Fin analyse	Mode acquisition	Temps de balayage (sec)	Vitesse de scan	Start m/z	End m/z
2.5	35.20	Scan	0.3	5000	25	1090

Annexe III. Chromatogramme des dérivés oximes-TMS de composés polaires de la mélisse

❖ Mode TIC



❖ Mode TIC et SIM (m/z : 396, 219)



❖ Identification automatique des pics (similarité > 80%)

Spectre			Background			Nom du composé
Temps de rétention	Début	Fin	Temps de rétention	Début	Fin	
2,94	2,96	2,95	2,92	3	Done	2-Propenoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
6,39	6,41	6,4	6,32	6,5	Done	Glycerol, tris(trimethylsilyl) ether
7,23	7,25	7,24	7,15	7,33	Done	Butanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester
7,91	7,93	7,92	7,87	7,98	Done	Propanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
11,74	11,76	11,75	11,68	11,81	Done	Acide malique 95%
12,23	12,25	12,24	12,19	12,32	Done	94% L-Proline, 5-oxo-1-tmsl)-, TMS ester
13,45	13,47	13,46	13,42	13,51	Done	2,3,4-Trihydroxybutyric acid tetrakis(trimethylsilyl) deriv., (, (R*,R*)-)

14,58	14,6	14,59	14,54	14,64	Done	2-ketoglutaric acid oxime, tri-TMS
15	15,02	15,01	14,93	15,07	Done	L-(+)-Tartaric acid, bis(trimethylsilyl) ether, bis(trimethylsilyl) ester
16,77	16,79	16,78	16,74	16,84	Done	Erythro-Pentonic acid, 2-deoxy-3,4,5-tris-O-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester
17,94	17,96	17,95	17,91	18,04	Done	90% Shikimic acid
18,12	18,14	18,13	18,04	18,17	Done	91% Citric acid, tetrakis(tms) deriv
18,67	18,69	18,68	18,65	18,87	Done	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol
18,92	18,94	18,93	18,87	19,02	Done	Quinic acid tms
19,23	19,25	19,24	19,2	19,32	Done	Ribitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
20,28	20,3	20,29	20,22	20,34	Done	L-Sorbose, pentakis(trimethylsilyl) ether, trimethylsilyloxime (isomer 1)
20,4	20,42	20,41	20,34	20,46	Done	D-(-)-Tagatose, pentakis(trimethylsilyl) ether, trimethylsilyloxime (isomer 1)
20,94	20,96	20,95	20,9	21,03	Done	d-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxyme, (1Z)-
21,12	21,14	21,13	21,03	21,17	Done	d-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxyme, (1Z)-
21,21	21,23	21,22	21,17	21,29	Done	95% Palmitic acid, TMS
21,36	21,38	21,37	21,29	21,42	Done	d-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxyme, (1Z)-
21,82	21,84	21,83	21,74	21,9	Done	ac dihydrocafeique OxTMS - catechollactate tris(trimethylsilyl) ether
22,34	22,36	22,35	22,27	22,43	Done	96% Myo-Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(tms)-
22,63	22,65	22,64	22,53	22,73	Done	acide cafeique tri tms
23,42	23,44	23,43	23,38	23,47	Done	96% Linoleic acid, TMS
23,51	23,53	23,52	23,47	23,61	Done	94% alpha.-Linolenic acid, tms ester
23,82	23,84	23,83	23,77	23,89	Done	92% Stearic acid, tms ester
25,2	25,22	25,21	25,16	25,27	Done	Glycoside, .alpha.-methyl-trtrakis-O-(trimethylsilyl)-
28,44	28,46	28,45	28,37	28,52	Done	D-Turanose, heptakis(trimethylsilyl)-
30,12	30,14	30,13	30,09	30,18	Done	D-(+)-Turanose, octakis(trimethylsilyl) ether
30,85	30,87	30,86	30,81	30,91	Done	D-(+)-Turanose, octakis(trimethylsilyl) ether
31,15	31,17	31,16	31,1	31,24	Done	Galactinol, nonakis(trimethylsilyl) ether
32,17	32,19	32,18	32,13	32,24	Done	Melibiose, octakis(trimethylsilyl)-
33,38	33,4	33,39	33,34	33,46	Done	Cholesterol trimethylsilyl ether
34,17	34,19	34,18	34,06	34,31	Done	ac rosmarinique Ox TMS
34,54	34,56	34,55	34,47	34,63	Done	D-(+)-Turanose, octakis(trimethylsilyl) ether
37,17	37,19	37,18	37,12	37,27	Done	Maltose, octakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (isomer 2)

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.