

Contribution à l'étude phytochimique d'orchidées tropicales : identification des constituants d'Aerides rosea et d'Acampe rigida : techniques analytiques et préparatives appliquées à Vanda coerulea et Vanda teres

Veronika Čáková

▶ **To cite this version:**

Veronika Čáková. Contribution à l'étude phytochimique d'orchidées tropicales : identification des constituants d'Aerides rosea et d'Acampe rigida : techniques analytiques et préparatives appliquées à Vanda coerulea et Vanda teres. Biologie végétale. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAF035 . tel-00997451

HAL Id: tel-00997451
https://theses.hal.science/tel-00997451

Submitted on 28 May 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES ED 222

UMR 7200

THÈSE présentée par :

Veronika ČÁKOVÁ

soutenue le : **16 décembre 2013**

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

Discipline/ Spécialité : Pharmacognosie

Contribution à l'étude phytochimique d'orchidées tropicales :

Identification des constituants d'*Aerides rosea* et d'*Acampe rigida*

Techniques analytiques et préparatives appliquées à *Vanda coerulea* et *Vanda teres*

THÈSE dirigée par :

Mme LOBSTEIN Annelise	Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme OLLIVIER Evelyne	Professeur, Université Aix-Marseille
M. SKALTSOUNIS Alexios-Leandros	Professeur, Université d'Athènes

---

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. HEINTZ Dimitri	Docteur (HDR), Université de Strasbourg
M. ANDRÉ Patrice	Partenaire industriel

Table des matières

CHAPITRE I - INTRODUCTION

A. CONTEXTE **2**

B. TRAVAUX ANTERIEURS DU LABORATOIRE **4**

CHAPITRE I PARTIE I: GENERALITES ET DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

A. CARACTERISTIQUES ET DESCRIPTION BOTANIQUE **7**
A. I. MODE DE VIE 7
A. II. CROISSANCE DES TIGES 7
A. III. RACINES 8
A. IV. FEUILLES 9
A. V. FLEURS 10

B. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE **11**

C. CLASSIFICATION BOTANIQUE **13**

D. USAGES DES ORCHIDEES DANS LE MONDE ET CROYANCES **15**

E. DONNEES PHYTOCHIMIQUES **18**
E. I. LES OSES ET POLYOSES 19
E. II. LES STILBENOÏDES 20
E. III. LES FLAVONOÏDES 29
E. IV. COMPOSES PHENOLIQUES DIVERS 31
E. V. LES TERPENOÏDES 36
E. VI. LES ALCALOÏDES 38

CHAPITRE I PARTIE II INTRODUCTION DU TRAVAIL PRESENTE

A. CHOIX DES ESPECES ETUDIEES **42**

B. LES OBJECTIFS DE CETTE ETUDE **44**

C. LES TECHNIQUES UTILISEES DANS CETTE ETUDE **45**
C. I. EXTRACTION EN PHASE SOLIDE 45
C. II. COUPLAGE HPLC-ESI-HRMS/MS 47
C. III. COUPLAGE HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN 50
C. IV. CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE (CPC) 55

CHAPITRE II - CONTRIBUTION A L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE D'ORCHIDEES TROPICALES

A. CONTEXTE ET OBJECTIFS **61**

B. CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE PRELIMINAIRE **61**

C. DEREPLICATION PAR HPLC-ESI-HRMS/MS **64**

CHAPITRE II PARTIE I: IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS D'AERIDES ROSEA

A. INTRODUCTION **71**
A. I. CARACTERISTIQUES ET DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE 71
A. II. CLASSIFICATION ET DESCRIPTION BOTANIQUE 71

A. III. LE GENRE AERIDES 73
A. IV. USAGES TRADITIONNELS 73
A. V. DONNEES PHYTOCHIMIQUES 73
A. VI. STRATEGIE ADOPTEE 75

B. MATERIEL ET METHODES 76
B. I. MATIERE VEGETALE 76
B. II. BROYAGE 76
B. III. EXTRACTION DE LA MATIERE VEGETALE SECHE 77
B.IV. ANALYSE DES ECHANTILLONS PAR CLHP 77
B. V. ANALYSE DES ECHANTILLONS PAR CCM 78
B. VI. PREFRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT ACOET PAR SPE 78
B. VII. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT ACOET PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION 78
B. VIII. ISOLEMENT DE LA BATATASINE III ET DE L'ACIDE DIHYDROCONYFERYL DIHYDRO-P-COUMARIQUE PAR CLHP SEMI-PREPARATIVE 79
B. IX. PURIFICATION DE LA BATATASINE III PAR CCM SEMI-PREPARATIVE 79
B. X. IDENTIFICATION DE LA BATATASINE III ET DE L'ACIDE DIHYDROCONYFERYL DIHYDRO-P-COUMARIQUE PAR HRMS ET RMN 80
B. XI. IDENTIFICATION ON-LINE DES METABOLITES MINORITAIRES DES FRACTIONS SEPHADEX 7, 9 ET 10 PAR HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN 81

C. RESULTATS ET DISCUSSION 81
C. I. ENRICHISSEMENT DES METABOLITES D'INTERET ET RENDEMENTS D'EXTRACTIONS 81
C. II. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT ACOET PAR SPE ET SEPHADEX LH-20 82
C. III. ANALYSE DES FRACTIONS SEPHADEX PAR LA METHODE DE DEREPLICATION HPLC-HRMS/MS 84
C. IV. PURIFICATION ET CARACTERISATION STRUCTURALE DE L'ACIDE DIHYDROCONYFERYL DIHYDRO-P-COUMARIQUE 85
C. V. PURIFICATION ET CARACTERISATION STRUCTURALE DE LA BATATASINE III 89
C. VI. ANALYSE DES FRACTIONS SEPHADEX 7, 9 ET 10 96
C. VII. CARACTERISATION STRUCTURALE DES COMPOSES 1 A 5 CONTENUS DANS LES FRACTIONS 7 ET 9-10 100
C. VIII. RECAPITULATIF DE LA COMPOSITION PHYTOCHIMIQUE DES TIGES D'AERIDES ROSEA 112

D. BILAN 113

CHAPITRE II PARTIE II: IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS D'ACAMPE RIGIDA

A. INTRODUCTION 132
A. I. CARACTERISTIQUES ET DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE 132
A. II. CLASSIFICATION ET DESCRIPTION BOTANIQUE 132
A. III. LE GENRE ACAMPE 134
A. IV. USAGES TRADITIONNELS 134
A. V. DONNEES PHYTOCHIMIQUES 136
A. VI. STRATEGIE APPLIQUEE 136

B. MATERIEL ET METHODES 138
B.I. MATIERE VEGETALE 138
B. II. BROYAGE 139
B. III. EXTRACTION DE LA MATIERE VEGETALE SECHE 139
B. IV. ANALYSE DES ECHANTILLONS PAR CLHP 139
B. V. ANALYSE DES ECHANTILLONS PAR CCM 140

B. VI. PREFRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE PAR EXTRACTION LIQUIDE/LIQUIDE 140
B. VII. PRE-PURIFICATION DE LA FRACTION DIETHYL ETHERIQUE PAR SPE 141
B. VIII. ISOLEMENT DE METABOLITES DE LA FRACTION ETHERIQUE PAR CLHP SEMI-PREPARATIVE 141
B. IX. IDENTIFICATION DE M2TABOLITES DE LA FRACTION DIETHYL ETHERIQUE PAR CPG-SM ET RMN 142
B. X. FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION AQUEUSE PAR CPC 142
B. XI. ANALYSE DES METABOLITES A, B, C ET D DE LA FRACTION AQUEUSE PAR HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN 148

C. RESULTATS ET DISCUSSION 151
C. I. ENRICHISSEMENT DES METABOLITES D'INTERET ET RENDEMENTS D'EXTRACTIONS 151
C. II. EXTRACTION LIQUIDE/LIQUIDE DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE 152
C. III. PURIFICATION DES COMPOSES DE_1 A DE_3 DE LA FRACTION C4H10O PAR SPE ET CLHP SEMI-PREPARATIVE 152
C. IV. CARACTERISATION STRUCTURALE DES COMPOSES DE_1 A DE_3 154
C. V. PURIFICATION DES COMPOSES A, B, C ET D DE LA FRACTION AQUEUSE DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE D'A. RIGIDA PAR CPC 159
C. VI. ANALYSE DES COMPOSES A, B, C ET D PAR HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN 166
C. VII. BILAN 170

CHAPITRE III PARTIE I: PURIFICATION DE MARQUEURS DE VANDA TERES PAR CPC

A. INTRODUCTION 172
A. I. CARACTERISTIQUES ET DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE 172
A. II. CLASSIFICATION ET DESCRIPTION BOTANIQUE 173
A. III. DONNEES PHYTOCHIMIQUES 174
A. IV. DONNEES BIOLOGIQUES 175
A. V. STRATEGIE ADOPTEE 176

B. MATERIEL ET METHODES 178
B. I. EXTRAIT DE VANDA TERES 178
B. II. PREPARATION DE L'EXTRAIT PAR SPE 178
B. III. ANALYSE DES ECHANTILLONS PAR CLHP 178
B. IV. ANALYSE DES ECHANTILLONS PAR CCM 179
B. V. CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE (CPC) 179

C. RESULTATS ET DISCUSSION 189
C.I. PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DE L'EXTRAIT VT1801-07/612: MISE EN EVIDENCE DES COMPOSES D'INTERET 189
C. II. PRE-PURIFICATION DE L'EXTRAIT VT1801-07/612 PAR SPE 190
C. III. CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE 191
C.IV. ANALYSE DES COMPOSES PURIFIES PAR HPLC-ESI-HRMS/MS 204
C.V RECAPITULATIF DES EXPERIMENTATIONS 205
C. VI. BILAN 205

CHAPITRE III PARTIE II: ETUDES QUALITATIVES ET QUANTITATIVES DE VANDA TERES ET VANDA COERULEA

A. INTRODUCTION 211
A. I. PRESENTATION DES ESPECES ETUDIEES 211
A. II. METABOLITES D'INTERET 212

A. III. DEFINITION DES OBJECTIFS DE CETTE ETUDE 213
A. IV. ECHANTILLONS PRELEVES EN FONCTION DES HYPOTHESES POSEES 214
A. V. STRATEGIE DE L'ETUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE ADOPTEE 217

B. MATERIEL ET METHODES 218
B. I. MATIERES PREMIERES 218
B. II. LIEUX ET CONDITIONS DES PRELEVEMENTS 218
B. III. CONDITIONS DE SECHAGE ET BROYAGE 220
B. IV. EXTRACTION SOLIDE/LIQUIDE 221
B. V. ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE PAR HPLC-ESI-HRMS/MS 222

C. RESULTATS ET DISCUSSION 230
C. I. COURBES DE CALIBRATION 230
C. II. VERIFICATION DE L'EFFICACITE DES EXTRACTIONS 230
C. III. COMPARAISON DES VANDA COERULEA PROVENANT DU MILIEU ARTIFICIEL (SERRE) 230
C. IV. COMPARAISON DES SPECIMENS DE VANDA COERULEA CULTIVEES DANS UN MILIEU NATUREL (FERME D'ORCHIDEES EN THAÏLANDE) 235
C. IV. COMPARAISON DES VANDA COERULEA D'UN MILIEU SAUVAGE (RESERVE NATURELLE EN CHINE) 237
C. VI. COMPARAISON D'ECHANTILLONS DE VANDA TERES CULTIVEES DANS UN MILIEU NATUREL (FERME D'ORCHIDEES EN THAÏLANDE) 240
C. VI. BILAN 242

CHAPITRE IV - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

A. RAPPEL DES OBJECTIFS 245

B. EXPLORATION PHYTOCHIMIQUE DE DEUX NOUVELLES ESPECES D'ORCHIDEES TROPICALES 246
B. I. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DEREPLICATION PAR HPLC-ESI-HRMS/MS 246
B. II. LA SOUS-TRIBU DES AERIDINAE 247
B. III. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS D'AERIDES ROSEA 249
B. IV. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS D'ACAMPE RIGIDA 250
B. V. PERSPECTIVES 251

C. PURIFICATION DES MARQUEURS DE VANDA TERES PAR CPC-EXPLORATION DE NOUVELLES CIBLES BIOLOGIQUES 256

D. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURE ET TENEURS EN METABOLITES D'INTERET 259

E. CONCLUSION GENERALE 260

ANNEXES

A. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET SPECTRALES DES COMPOSES IDENTIFIES 262
A. I. COMPOSES IDENTIFIES DANS LES FEUILLES D’ACAMPE RIGIDA 262
A. II. DERIVES PHENANTHRENIQUES IDENTIFIES ON-LINE PAR HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN DANS LES TIGES D’AERIDES ROSEA 265
A. III. COMPOSES ISOLES A PARTIR DES TIGES D’AERIDES ROSEA 270

B. COMMUNICATIONS ECRITES (POSTERS) PRESENTES A DES CONGRES INTERNATIONAUX 273

BIBLIOGRAPHIE 280

REMERCIEMENTS

Un travail de thèse est loin d'être solitaire et c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette grande étape de ma vie à son terme.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux membres du Jury:

- Madame le Professeur Evelyne Ollivier du Laboratoire de Pharmacognosie et Ethnopharmacologie de l'Université Aix-Marseille,
- Monsieur le Professeur Alexios-Leandros Skaltsounis du Département de Pharmacognosie et Chimie des Produits Naturels de l'Université d'Athènes,
- Le Docteur Dimitri Heintz de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes à Strasbourg,
- Monsieur Patrice André, du Département d'Innovation Ethnobotanique du centre de recherche et développement de LVMH recherche,

pour l'attention, l'intérêt et le temps consacré à la lecture de ce mémoire.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à Madame le Professeur Annelise Lobstein. Vous m'avez offert une belle opportunité de réaliser une thèse dans un cadre à la fois académique et industriel sur un sujet passionnant que sont les orchidées. Vous m'avez témoigné de la confiance en m'accordant une grande autonomie dans ce travail. Malgré cette liberté que vous m'avez laissée, vous avez toujours été disponible et répondu présente à toutes mes questions et mes problématiques scientifiques, techniques ou personnelles. Votre soutien a été précieux dans toutes les étapes clés de ces trois ans de thèse. Vous m'avez toujours tiré vers le haut, ne m'avez jamais laissé baisser les bras et vous avez toujours su trouver les mots pour me remotiver après des moments difficiles. J'ai essayé de tirer le meilleur de moi-même dans l'objectif de ne jamais vous décevoir. Pour résumer, un grand MERCI pour tout et surtout pour votre amitié.

Je voudrais remercier chaleureusement Patrice André, mon tuteur dans l'industrie partenaire, qui a participé à mon recrutement et qui a tenu sa promesse de me suivre jusqu'au bout de cette thèse. Merci pour tes coups de fil réguliers qui m'ont permis de prendre du recul sur l'ensemble de mes recherches. Tes conseils ont toujours été précieux et utiles et m'ont permis de relativiser en regardant certaines problématiques d'un point de

vue un peu plus philosophique. Je te remercie non seulement pour ton suivi professionnel, mais également personnel que j'ai énormément apprécié durant ces trois dernières années.

Je souhaite adresser mes sincères remerciements au Docteur Frédéric Bonté, le directeur de la communication scientifique de LVMH recherche et le coordinateur de l'Orchidarium. Tes remarques scientifiques ont toujours été pertinentes et m'ont permis d'avancer dans mes travaux. Merci pour ta confiance que tu m'as témoignée ainsi qu'à tes encouragements pour présenter des nombreuses communications scientifiques à des congrès internationaux. Tu m'as toujours soutenu et je te remercie également pour ton humour sincère qui m'a mise de bonne humeur de nombreuses fois.

Je ne pourrais pas oublier dans mes remerciements le Docteur Aurélie Urbain qui m'a initié notamment à la chromatographie de partage centrifuge en m'apportant une formation initiale, un encadrement technique et surtout une envie d'explorer les atouts de cette technique. Tu as su m'apporter des conseils scientifiques et techniques très précis. J'apprécie énormément tes nombreuses connaissances, mais surtout le fait que tu n'as jamais hésité à les partager avec moi. Tu n'as jamais refusé de m'aider ou m'apporter une solution, même quand tu étais au bord du surmenage avec tes enseignements et ton travail de recherche. Merci d'avoir partagé avec moi des moments drôles, des déjeuners, des pauses et des sorties qui font que nous ne sommes pas que des simples collègues.

Je remercie également Monsieur François Gérard et Monsieur Martial Bouquet du pôle agrobiologique à Genève. Grâce à vous, j'ai pu réaliser des prélèvements des spécimens d'orchidées dans la serre dans des conditions optimales et agréables. Merci pour votre disponibilité et votre aide tout au long de ces travaux de doctorat.

Je tiens à remercier vivement tous mes collaborateurs du Service Commun d'Analyse, Nicole, Pascale et Barbara, mais surtout Patrick Wehrung et Cyril Antheaume (allias "Cyrilus") pour leur immense patience, leurs éternelles explications, leur grande implication dans ce projet, leur enthousiasme, leurs conseils précieux et le nombre infini de cafés que vous m'avez offerts pendant ces trois dernières années. Vous avez grandement participé à l'ensemble de mes études et analyses en m'apportant une aide technique qui n'a pas de prix. Comme j'ai dit un jour: "Sans vous, je n'aurais fait que des extractions ! " Nous avons développé une réelle collaboration qui, j'espère, n'est pas terminée.

Je voudrais remercier toute l'équipe de Pharmacognosie qui a participé activement à ma formation. Merci à Amélie, Bernard, Catherine, Fanny, Lise, Olivier, Mixalis, Saliou et

Laurence d'avoir partagé également les nombreux pots de bienvenue, d'anniversaire, de naissance, de départ, en bref, toutes les occasions sont bonnes pour en faire un et on en a jamais assez !

Je souhaite tout particulièrement remercier l'ensemble de mes stagiaires qui se sont pleinement impliqués avec enthousiasme dans le travail que je leur ai confié. Grâce à votre aide, Lorène, Camille, Anne, Thibaut, Marion, Clément, Jérémy et Olivier, j'ai pu avancer plus rapidement dans mes travaux. Sans vous, je n'y serais pas arrivée. J'espère que je vous ai transmis ma passion et mes connaissances qui vous seront utiles dans votre avenir professionnel.

Un grand merci à Grégoire Audo et Céline Le Quemener d'Armen Instrument pour la collaboration que nous avons mis en place. Merci de m'avoir donné l'occasion de travailler sur votre CPC, de m'avoir apporté des connaissances techniques et scientifiques concernant cette technique. Une grande partie de ce manuscrit est le résultat de notre collaboration fructueuse et je ne saurai jamais assez vous remercier pour tout votre soutien matériel et technique que vous m'avez apporté.

Je remercie également toute l'équipe du Département d'Innovation Ethnobotanique de LVMH recherche de m'avoir considéré comme un membre à part entière de leur équipe. Merci à Beatriz, Virginie, Laure, Sylvie, Monique, Yann et Catherine pour leur bonne humeur et leur collaboration sur l'ensemble de nos projets. Je tiens aussi à remercier le "staff" marketing de Guerlain, les "Guerlinettes", pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de cette thèse.

Rien ne serait possible sans l'aide administrative et logistique de Françoise et Marianne, les secrétaires de l'UMR 7200, ni sans Amivi et Marie, les assistantes marketing chez Guerlain. Merci pour votre gentillesse, votre patience et votre aide dans les démarches administratives pas toujours simples.

Merci à tous les membres de ma famille pour leur soutien moral et leur patience sans frontières.

Enfin, merci à Michaël d'avoir survécu à ces années chargées en travail. Merci pour ton amour et ton soutien dans n'importe quelles circonstances et d'avoir partagé des moments de joie, de tristesse, de fatigue et de stress. Mais surtout, merci d'être toujours là.

1. Communications affichées présentées à des congrès internationaux

- **Cakova V., Wehrung P, Urbain A., André P., Bonté F., Lobstein A.** (2012) Rapid on-line dereplication using hyphenated HPTLC-MS in orchid species. *8th international symposium on chromatography of natural products, Lublin, Pologne* (17-20 mai 2012) et *Journées du campus d'Illkirch (JCI), Illkirch Graffenstaden, France* (avril 2012).

- **Cakova V., Antheaume C., Archambault J.C., Cauchard J.H., André P., Bonté F. et Lobstein, A.** (2012) Phytochemical analysis and cosmetic applications of the tropical orchid Brassocattleya marcella Koss. *International Congress on Natural Products Research on Global Change, Natural Products and Human Health/8th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE and SIF, New York, Etats-Unis* (27 juillet-1 août 2012), Planta Medica, Vol. 78 (11): 1248-1248.

- **Cakova V., Urbain A., Sester A., André, P., Bonté, F. et Lobstein A.** (2012) Centrifugal partition chromatography for the isolation of tropical orchid constituents. *International Congress on Natural Products Research on Global Change, Natural Products and Human Health/8th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE and SIF, New York, Etats-Unis* (27 juillet-1 août 2012), Planta Medica, Vol. 78 (11): 1271-1271.

- **Cakova V., Wehrung P, Urbain A., André P., Bonté F. et Lobstein A.** (2012) Rapid on-line dereplication by HPTLC-MS interface in orchid extracts. *International Congress on Natural Products Research on Global Change, Natural Products and Human Health/8th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE and SIF, New York, Etats-Unis* (27 juillet-1 août 2012), Planta Medica, Vol. 78 (11): 1271-1272.

- **Cakova V., Wehrung P, Urbain A., André P., Bonté F. et Lobstein A.** (2012) Using hyphenated HPTLC-MS for quality control of *Brassocattleya marcella* Koss orchid extracts. *International Congress on Natural Products Research on Global Change, Natural Products and Human Health/8th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE and SIF, New York, Etats-Unis* (27 juillet-1 août 2012), Planta Medica, Vol. 78 (11): 1272-1272.

- **Cakova V., Antheaume C., Rimlinger N., Wehrung P., André P., Bonté F. et Lobstein A.** (2013) Hyphenated HPLC-DAD-MS-SPE-NMR interface for identification of phytochemicals: application to an orchid extract. *HPLC2013: 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques*, Amsterdam, Pays-Bas (16-20 juin 2013).

- **Cakova V., Wehrung P., André P., Bonté F. et Lobstein A.** (2013) Simultaneous qualitative and quantitative analysis of phenanthrene derivatives in *Vanda coerulea* by LC-ESI-HR-MS/MS. *61st International congress and annual meeting of the society for medicinal plant and natural product research (GA), Münster, Allemagne* (1-5 septembre 2013).

- **Bonté F., Cakova V., Lobstein. A.** (2013) Medicinal uses of orchids in Europe. *41st International congress for the history of pharmacy, Paris, France* (10-14 septembre 2013).

2. Communications orales à des symposiums nationaux et un congrès international

- **Cakova V., Wehrung P, Urbain A., André P., Bonté F., Lobstein A.** (2012) Rapid on-line dereplication by LC-MS-MS/MS and TLC-MS interface in orchid extracts. Communication orale, *Journées des doctorants en chimie,* Strasbourg, France (13 novembre 2012).

- **Cakova V.** (2013) State-of-the-art hyphenated techniques HPLC-DAD-MS-SPE-UV/NMR interface for new approaches in phytochemical exploration of orchids. Communication orale, *JCI, Illkirch Graffenstaden, France* (avril 2013).

- **Cakova V., Rimlinger N., Antheaume C., André P., Bonté F. et Lobstein A.** (2013) State-of-the-art hyphenated techniques LC-HRMS/MS and HPLC-DAD-MS-SPE-UV/NMR for new approaches in phytochemical exploration of orchids. Communication orale (short lecture), *61st International congress and annual meeting of the society for medicinal plant and natural product research (GA), Münster, Allemagne* (1-5 septembre 2013).

3. Publications

- **Cakova V., Urbain A., Rimlinger N., Antheaume C., Wehrung P., Bonté F. et Lobstein A.** (2013) On-line identification of phenanthrene derivatives in *Aerides rosea* (Orchidaceae) using HPLC-ESI-HRMS/MS and on-line HPLC-DAD-MS-SPE-UV/NMR hyphenated systems. *Publication soumise à Analytical chemistry* (septembre 2013).

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

α Coefficient de résolution (en CPC)

AA Acide acétique

ACN Acétonitrile

AcOEt Acétate d'éthyle

AF Acide formique

AU Unité d'absorbance

BuOH *n*-Butanol

$C_4H_{10}O$ Ether diéthylique

C_6H_{12} Cyclohexane

CCM Chromatographie sur couche mince

CH_2Cl_2 Dichlorométhane

$CHCl_3$ Chloroforme

CLHP (ou HPLC) Chromatographie liquide à haute performance (*High preformance liquid chromatography)*

COX-2 Cyclooxygénase 2

CPC Chromatographie de partage centrifuge

CPG (ou GC) Chromatographie en phase gazeuse (*Gas chromatography)*

d Doublet

δ Déplacement chimique

Da Dalton 1Da = 1 g/mol

DAD Détecteur à barrette de diode

dd Doublet dédoublé

EI (ou IE) Electronic impact (Impact électronique)

EOR Espèces oxygénées réactives

ESI Ionisation par Electrospray (électro-nébulisation)

EtOH Ethanol

g Grammes

H_2O Eau

HMBC (ou g-HMBC) *(gradient)-Heteronuclear multiple bond correlation*

HRMS Spectrométrie de masse à haute résolution

HSQC (ou g-HSQC) *(gradient)-Heteronuclear single quantum coherence or correlation*

Hz Hertz

i.d. Diamètre interne

J Constante de couplage

Kd Coefficient de partage

λmax Maximum d'absorbance dans l'UV/Vis

m *M*ultiplet

m/z Rapport masse/charge électrique

mAU Milli unité d'absorbance

MeOH Méthanol

mg milligrammes

µg micrigrammes

min Minutes

mL Millilitres

MMPs Matrice métallo protéinases

MS (ou SM) *Mass spectrometry* (Spectrométrie de masse)

MVS Matière végétale sèche

ng nanogrammes

NOESY *Nuclear Overhauser effect spectroscopy*

PGE-2 Prostaglandine de type 2

ppm Partie par million

QToF Quadrupôle analyseur à temps de vol (time of flight)

q quintuplet

Rf Rapport frontal

RMN Résonance magnétique nucléaire

rpm Rotations par minute

s Singulet

SPE Extraction en phase solide (*Solid phase extraction*)

t Triplet

TR Temps de rétention

UV Ultraviolet

UV/Vis Ultraviolet/Visible

Chapitre I
Introduction générale

A. Contexte

Les orchidées constituent la plus grande famille botanique des plantes à fleurs. Elles passionnent beaucoup de scientifiques ou simplement des botanistes qui sont en quête de nouvelles espèces non encore identifiées. Leur nombre ne cesse de croître, car de nouvelles régions sont régulièrement explorées pour repérer de nouvelles espèces. Cette famille botanique est l'une des plus complexes et des plus diversifiées et qui comptabilise entre 25 000 et 30 000 espèces, selon les sources. Selon les statistiques publiées par « La liste mondiale des plantes » [http://www.theplantlist.org], cette famille contient aujourd'hui 27 135 espèces réparties en 925 genres, dont la dénomination scientifique a été acceptée comme officielle. Il existe plus de 38 000 dénominations considérées comme des synonymes botaniques.

Connues pour leur faculté d'adaptation remarquable à leur milieu, ces plantes sont présentes dans toutes les régions du monde. Réputées pour leur longue et belle floraison, elles sont dotées d'un fort symbolisme au sein des cultures anciennes. La beauté de leurs fleurs riches en couleurs a passionné plus d'un horticulteur et leur intérêt ornemental en a fait un produit d'une grande importance économique. On peut aujourd'hui admirer des fleurs aux couleurs intenses et variées grâce aux croisements entre espèces, à l'origine de la création d'un nombre important d'hybrides. Cependant, le commerce international des orchidées a un impact sur l'abondance des espèces botaniques présentes à l'état sauvage. Certaines espèces sont en effet devenues rares, d'autres sont en voie d'extinction alors que d'autres encore ont déjà disparu. La raison principale de leur disparition est la détérioration de leur écosystème natif par la main de l'homme. On peut donc considérer ces plantes comme un excellent indicateur de la qualité du biotope dans lequel elles se trouvent à l'état sauvage. Il est donc important de les protéger et de créer des sites de réimplantation pour les ramener dans leur milieu sauvage et maintenir la biodiversité. Les orchidées sont ainsi au cœur des préoccupations de certains programmes de conservation et plusieurs collections d'espèces botaniques ont été rassemblées dans des jardins botaniques réputés. Les plus importantes sont celles des Jardins botaniques royaux de Kew, comptant la plus ancienne collection de plus de 5 000 espèces, ou encore celle des Jardins botaniques du Missouri (Etats-Unis) comptabilisant plus de 7 000 spécimens et représentant 230 genres.

Les orchidées ont fait l'objet de nombreuses études scientifiques concernant leur propagation, leur culture *in vitro*, leur pollinisation, leurs relations phylogénétiques ainsi que les aspects botaniques et évolutifs. Leur utilisation dans les médecines traditionnelles

ancestrales a été répertoriée dans de nombreux ouvrages, publications et articles de revue, bien que seuls certains d'entre eux soient scientifiquement prouvées. Très peu d'études concernent leur composition phytochimique. C'est dans cette direction que nous avons voulu explorer quelques espèces, afin d'apporter bien modestement des connaissances fondamentales sur la chimie de cette grande famille botanique. Certes, dans ce travail, la complexité végétale des orchidées ne pourra être qu'à peine effleurée, mais pourra illustrer un aspect de la diversité chimique de ces plantes.

Ces trois années de thèse s'inscrivent dans le cadre d'un contrat CIFRE avec la société Guerlain et le soutien scientifique de LVMH recherche. Une collaboration internationale a été mise en place en 2007 en créant une plateforme de recherche unique au monde appelée ***Orchidarium***. Entièrement dédiée aux orchidées, cette plateforme a comme mission principale de découvrir, comprendre et étudier cette vaste famille botanique. Grâce à un réseau de collaborations internationales, l'Orchidarium s'articule autour de trois pôles, chacun aux missions bien précises :

- Le pôle ***Agrobiologie***, situé à Genève (Suisse) est dirigé par François Gérard. Il comporte une collection de plus de 2 000 spécimens, soit plus de 800 espèces provenant du monde entier. Il a pour fonction d'observer et optimiser leurs conditions de floraison et de croissance. Cette collection, baptisée « **orchidothèque** », protège également des espèces en danger d'extinction.

- Le pôle ***Biodiversité*** est situé dans la province de Yunnan en Chine et est dirigé par Minguo Li Margraf. Il s'agit d'une réserve naturelle qui travaille en étroite collaboration avec une ferme d'orchidées (Joe's orchids) à Chiang Mai en Thaïlande. Leurs missions consistent à cultiver et réintroduire les orchidées épiphytes dans leur biotope naturel, tout en préservant la déforestation et la biodiversité végétale.

- Le pôle ***Phytochimie*** est constitué du Laboratoire de pharmacognosie et substances naturelles bioactives à Strasbourg, dirigé par le Pr Annelise Lobstein, et du Département d'innovation ethnobotanique « DIE » du centre de recherche et développement de LVMH Parfums et Cosmétiques à St Jean de Braye près d'Orléans, dirigé jusqu'en mars 2013 par Patrice André. La collaboration entre ces deux laboratoires a pour but d'explorer la composition phytochimique des orchidées, d'identifier des molécules pouvant être qualifiées de marqueurs phytochimiques, de repérer des points communs et des différences entre certains représentants de tribu ou de sous-tribu proches du point de vue phylogénétique.

L'ensemble de l'Orchidarium est coordonné sous la responsabilité scientifique du Dr. Frédéric Bonté, directeur de communication scientifique de LVMH recherche. Le travail de ces trois pôles fait l'objet de nombreux échanges nationaux et internationaux, l'objectif étant d'accroitre progressivement la visibilité scientifique de l'Orchidarium et de partager nos connaissances fondamentales à la communauté scientifique ou à des passionnés ou orchidophiles.

B. Travaux antérieurs du laboratoire

Dans ce contexte, une première thèse a été soutenue à l'Université de Strasbourg en octobre 2010 par Charlotte Simmler, Son mémoire intitulé « Etudes phytochimiques et biologiques de *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl et de *Vanda teres* (Roxb.) Lindl (Orchidaceae) » décrit non seulement la composition phytochimique, mais également l'activité biologique de ces deux espèces d'orchidées.

L'analyse des extraits hydro-alcooliques des tiges, feuilles et racines de *Vanda coerulea* a permis d'isoler et d'identifier des métabolites caractéristiques des tiges appartenant à la famille des stilbénoïdes. Cinq composés, la flavidine, l'imbricatine, la coelonine, la méthoxycoelonine et le gigantol, ont été identifiés pour la première fois ensemble dans une même espèce d'orchidée. Leur évaluation biologique a ciblé l'activité anti-oxydante (neutralisation des espèces réactives d'oxygène, EOR, intracellulaires), anti-inflammatoire cutanée (inhibition de la production de prostaglandine de type 2, PGE-2, et de l'expression de la cyclo-oxygénase 2, COX-2) et inhibitrice de l'expression de matrices métallo protéinases, MMPs-1,2 et 9 impliquées dans la dégradation de la matrice dermique. Les meilleures activités ont été obtenues pour les trois stilbénoïdes les plus concentrés dans un extrait de tiges de *Vanda coerulea* : l'imbricatine, la méthoxycoelonine et le gigantol.

L'étude de *Vanda teres* a conduit à l'identification de métabolites caractéristiques des tiges et des racines. Il s'agit de trois dérivés glucopyranosyloxybenzyle-malates, de structures nouvellement décrites et dénommés vandatérosides I, II et III. Leur évaluation sur les mêmes cibles biologiques que *V. coerulea* a été décevante. En revanche, après réorientation des tests biologiques, il a été montré que le vandatéroside II et dans une moindre mesure le vandatéroside I, stimulent l'activité enzymatique des complexes I et II et de la cytrochrome C oxydase de la chaîne respiratoire mitochondriale. De plus, ces deux composés favorisent l'expression de trois protéines de différenciation des kératinocytes

(l'involucrine, la desmogléine I et la transglutaminase I), contribuant au renouvellement de l'épiderme.

L'acide eucomique, un composé commun, précurseur des métabolites précités, a été identifié dans les deux espèces de *Vanda*. Ces résultats ont fait l'objet de deux publications scientifiques, l'une dans Plos One [Simmler *et al*. 2010] et la seconde dans Journal of Natural Products [Simmler *et al.* 2011].

Chapitre I
Partie I : Généralités et données bibliographiques

A. Caractéristiques et description botanique

A. I. Mode de vie

Même si la famille des Orchidacées est probablement la plus diversifiée d'un point de vue botanique, des caractéristiques communes des espèces classées dans cette famille doivent être rappelées. Les orchidées sont des plantes herbacées, terrestres ou épiphytes c'est-à-dire qui se développent sur un support tel qu'un arbre (son tronc ou ses branches). Certaines espèces vivent sur un affleurement de roches : elles sont alors qualifiées d'espèces lithophytes. Un très petit nombre d'espèces sont dépourvues de feuilles vertes et se développent comme des saprophytes : elles se nourrissent de matières organiques en décomposition. C'est le cas par exemple de certaines espèces de *Habenaria* ou *Eulophia* [Lecoufle M. 2004]. Environ 73% des orchidées sont épiphytes et sont localisées surtout dans les zones tropicales [Jalal J. S. *et al.* 2008].

A. II. Croissance des tiges

Ce sont des plantes Phanérogames (plantes à fleurs) appartenant à la classe des Monocotylédones. Elles ne possèdent qu'un seul cotylédon, un embryon contenu dans la graine formant les premières feuilles à la naissance de la plantule. La tige est souvent non ramifiée et son diamètre ne croît pas pendant la durée de vie de la plante. On distingue deux modes de croissance chez les orchidées : monopodiale et sympodiale.

- Les premières ont un seul pied qui pousse à partir d'un apex végétal et qui se développe chaque année au sommet de la tige (ex. *Vanda coerulea*). La plante croît progressivement en hauteur. Parfois, lorsqu'elle est exposée à des températures extrêmes pendant sa croissance, ou lorsque sa tige a été accidentée, les orchidées à croissance monopodiale peuvent développer des « keikis » servant à multiplier les pieds-mères.

- Les espèces à croissance sympodiale possèdent plusieurs pieds, développent des pousses horizontales, plus ou moins longues ou rampantes, à partir du rhizome sous forme de pseudobulbes (ex. *Dendrobium chrysotoxum*). Les nouvelles pousses vont nourrir les vieilles avec les réserves nutritives accumulées [Vaddhanaphuti N. 2005].

A. III. Racines

Les racines des orchidées sont différentes des autres végétaux car elles sont uniformes de grosseur sur toute leur longueur et partent toutes de l'axe de la plante. On n'observe jamais de pseudobulbes. Chez les espèces terrestres, les parties souterraines sont fréquemment tubéreuses et souvent de courte longueur. Chez les orchidées épiphytes, les racines sont aériennes, souvent pendantes, longues, charnues et rondes (ex. chez *Aerides*). Chez le genre *Dendrobium*, les racines développées sont très nombreuses et fines et peuvent parfois dépasser les deux tiers du poids de la plante.

La principale fonction des racines aériennes est de maintenir la plante solidement fixée à son support. L'adhérence à celui-ci est assurée par des petites protubérances, appelées papilles. Les racines croissent à l'opposé de la lumière et ces papilles ne se développent plus lorsque l'orchidée est détachée de son support. Certaines racines aériennes peuvent être munies de chloroplastes et ont un pouvoir photosynthétique.

Les racines aériennes arrivent à puiser l'humidité et les matières nutritives de l'atmosphère. Elles sont démunies de poils absorbants, qui sont remplacés par un voile appelé velamen, et formé de cellules hygroscopiques. Blanc, nacré et feutré, le velamen assure des fonctions importantes comme celles d'absorber la moindre goutte d'eau ou de rosée ainsi que former un isolant de protection thermique contre les périodes de sécheresse (**Figure I:1**).



Ra = racine aérienne ; V = velamen

Figure I:1. Racine aérienne recouverte du vélamen d'un spécimen du genre *Phalaenopsis* (photographie personnelle).

A. IV. Feuilles

Pour les orchidées, comme pour les plantes en général, les feuilles sont un organe vital, car leur rôle est en premier lieu la photosynthèse. Leur forme est souvent liée à leur exposition au soleil. Elles servent en effet à leur respiration et aux fonctions d'assimilation des gaz de l'atmosphère. Leurs vaisseaux sont fournis en eau et en sels nutritifs par pression osmotique depuis les racines. De croissance lente, les orchidées économisent leurs dépenses énergétiques et n'émettent en général qu'un nombre restreint de feuilles. Leur forme est différente d'un genre à l'autre et prend souvent un aspect succulent. Elles sont simples, non divisées, à nervure parallèle, comme toutes les Monocotylédones. Elles sont très souvent non pétiolées et les parties supérieures du limbe sont dépourvues de stomates afin de limiter les pertes en eau durant la journée. Quelques espèces présentent des feuilles cylindriques (*Vanda teres*) ou légèrement canaliculées afin que l'échauffement par unité de surface soit le plus faible possible. Chez les orchidées monopodes, les feuilles sont engainantes et alternes, disposées en deux rangées opposées (*Aerides rosea*). La plupart des espèces exotiques possèdent des feuilles persistantes, de couleur verte plus ou moins foncée comme teinte dominante. Certaines espèces possèdent des feuilles de couleur variant du pourpre au noir. Quelques orchidées possèdent des feuilles caduques (ex. *Dendrobium*) alors que d'autres en sont totalement dépourvues car elles possèdent une quantité suffisante de chlorophylles dans leurs tiges et leurs racines [Lecoufle M. 2004]. La **Figure I:2** résume les différents termes cités ci-dessus.

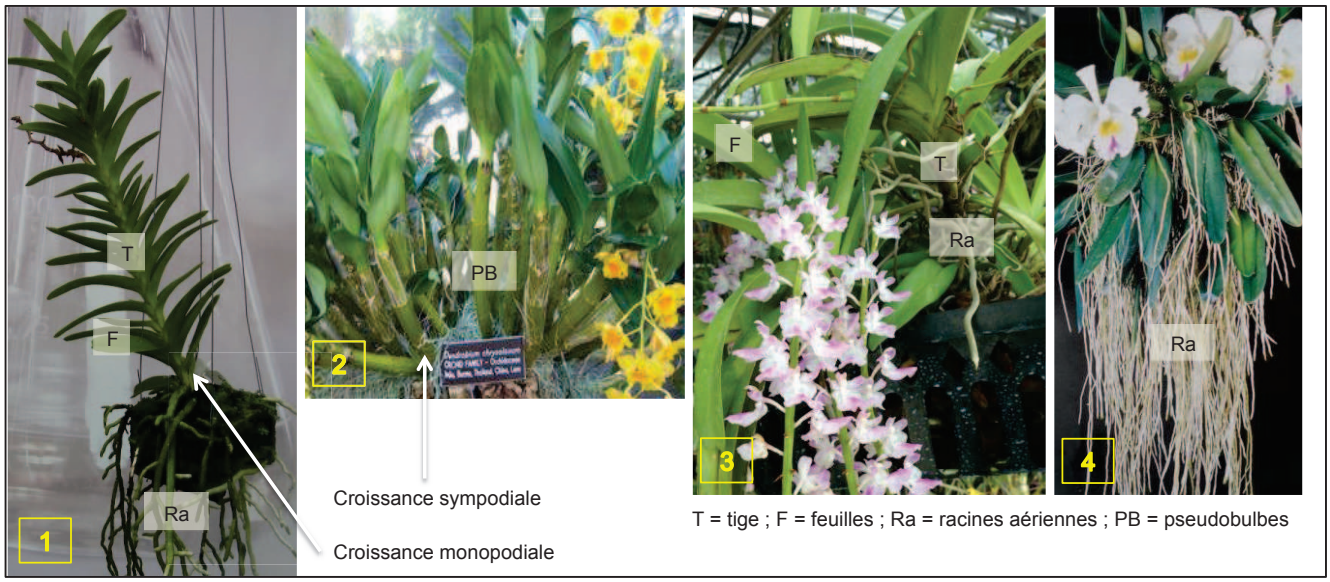


Figure I:2. Les deux types de croissance des orchidées: monopodiale chez *Vanda coerulea* (1) et sympodiale chez *Dendrobium chrysotoxum* (2). Différents organes de la plante: tige ou pseudobulbe, feuilles et racines aériennes longues et rondes (3) ou longues, fines et pendantes (4). Sources: (1) *Vanda coerulea* et (3) *Aerides rosea* (source personnelle), (2) *Dendrobium chrysotoxum* (photo Encyclopedia of life eol.org), (4) *Cattleya elongata* (photo Lecoufle).

A. V. Fleurs

Si les autres organes des orchidées se ressemblent beaucoup au sein d'un même genre, c'est la fleur qui peut clairement les différencier. Malgré leur diversité extraordinaire d'une espèce à l'autre, les fleurs de toutes les orchidées sont construites selon un plan unique avec un diagramme précis, relativement simple, qui permet de les distinguer des autres familles botaniques. Elles peuvent être odorantes ou non et certaines espèces doivent leur nom à leur parfum. Comme c'est souvent le cas dans le groupe des Monocotylédones, la fleur est de type 3 (trimère). Chez les orchidées, la symétrie de la fleur est bilatérale, dite zygomorphe.

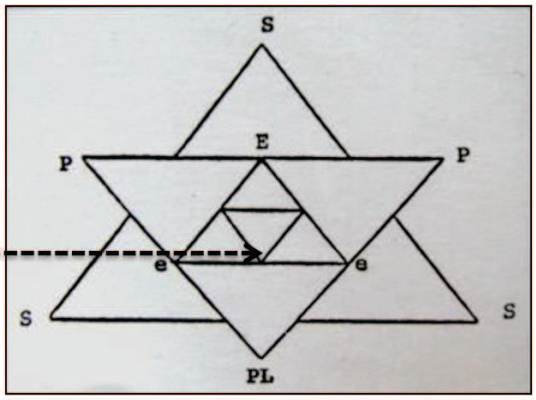
Les fleurs d'orchidées possèdent trois sépales vers l'extérieur. Les deux inférieurs sont presque toujours identiques entre eux, tandis que le sépale supérieur diffère fréquemment en largeur ou longueur. La corolle est formée de trois pétales, plus colorés et évolués, dont deux latéraux sont toujours identiques, tandis que l'inférieur est modifié en labelle. Ce dernier pétale modifié possède souvent des extrémités recourbées, appelées *cirrhes*, ou peut parfois évoluer en éperon et former des parties productrices de nectar. Les étamines (parties mâles), situés sur une seule face de la fleur, se réduisent en une seule chez la plupart des orchidées, parfois deux. Elles s'agglomèrent en masses appelées *pollinies*. Le pistil (partie femelle) est constitué d'un style, d'un stigmate et d'un ovaire, dit infère (situé en dessous du point d'insertion des pièces florales), et est destiné à se transformer en fruit. Les étamines et le pistil sont unis totalement ou partiellement sur une seule colonne, ou *gynostème*, qui constitue une pièce centrale de la fleur.

Pour ne pas être autofécondée, la fleur possède un *rostellum* qui sépare le stigmate et l'étamine. Les boutons floraux sont tournés vers le bas, mais juste avant son épanouissement, la fleur tourne son axe de 180° et tourne ainsi le labelle vers le bas. Ainsi, il pourra assurer son rôle attracteur pour les pollinisateurs. Ce phénomène est appelé la *résupination*.

Le passage d'une jeune orchidée à l'état adulte peut demander entre trois et dix ans. Les fleurs se présentent réunies en inflorescence formant une grappe simple ou composée. Chez quelques rares espèces, les fleurs sont solitaires. Chez les plantes à croissance monopodiale, les inflorescences naissent à l'aisselle des feuilles. Chez celles à croissance sympodiale, soit elles se développent au sommet ou aux articulations des pseudobulbes, soit à leur base. La plupart des espèces ne fleurissent qu'une fois par an [Vaddhanaphuti N. 2005, Lecoufle M. 2004].

La **Figure I:3** représente la structure des fleurs d'orchidées illustrée sur *Aerides rosea*.

Le triangle intérieur simule l'ovaire



S = sépales ; P = pétales ; PL = pétale modifié ; E = étamine (pour les orchidées à une seule étamine) ; e = étamines (pour les orchidées à deux étamines) ; O = ovaire infère ; Co = colonne (gynostème) portant des pollinies ; r = rostellum ; c = cirrhes

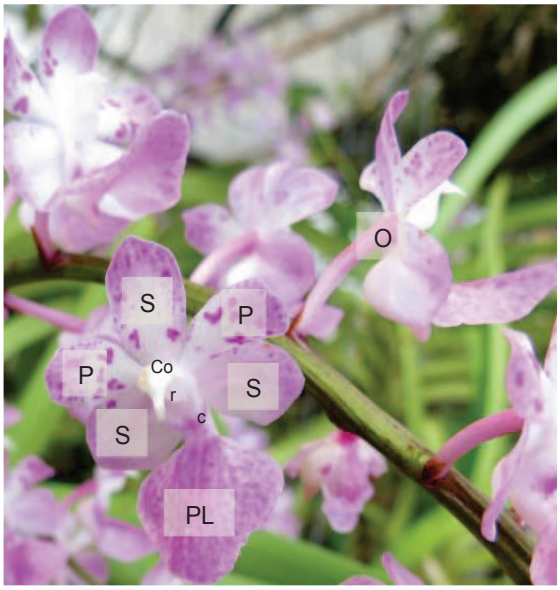


Figure I:3. Diagramme floral des orchidées selon John Lindley [Lecoufle M. 2004] à gauche et structure florale d'*Aerides rosea* (photographie personnelle) à droite.

B. Distribution géographique

Les orchidées sont capables de s'adapter aux milieux extrêmes. Cette famille cosmopolite est en effet répartie dans toutes les régions du globe terrestre, à l'exception des déserts très secs et de la région arctique presque entièrement couverte de glace. Leurs habitats s'étendent du nord de la Suède et l'Alaska jusqu'à Tierra del Fuego (province du sud d'Argentine) et l'île Macquarie dans le Pacifique [Dressler R. 1990]. Les orchidées épiphytes quant à elles se développent dans des territoires limités aux régions subtropicales et tropicales. Leur distribution générale est représentée sur la **Figure I:4**. Leur nombre varie également selon les régions. Dressler a fait une estimation de nombre d'espèces d'orchidées par région du globe (**Figure I:5**).

Les orchidées d'Europe, d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient sont toutes terrestres, et poussent dans un large éventail d'habitats, y compris forêts, marais et prairies. Peu d'entre elles sont persistantes, la plupart sont caduques.

En Afrique, comme dans d'autres parties du monde, les orchidées terrestres sont plus fréquentes dans les zones climatiques tempérées alors que les orchidées épiphytes sont répandues dans les zones équatoriales. Ainsi, en Afrique du Sud, environ un dixième des orchidées sont épiphytes alors au Kenya et au Zaïre, c'est plus de la moitié. Les orchidées

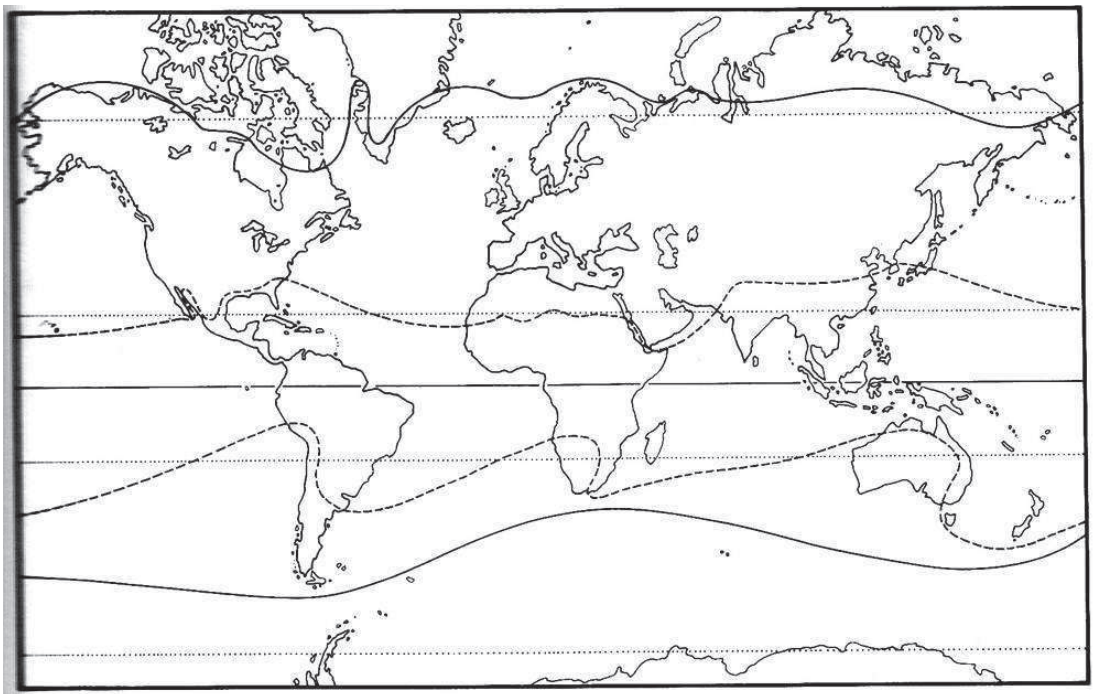


Figure I:4. Les limites de distribution géographique des orchidées entre le nord et le sud des espèces terrestres (lignes continues) et frontières approximatives des espèces épiphytes (lignes pointillées) [selon Dressler R. 1990].

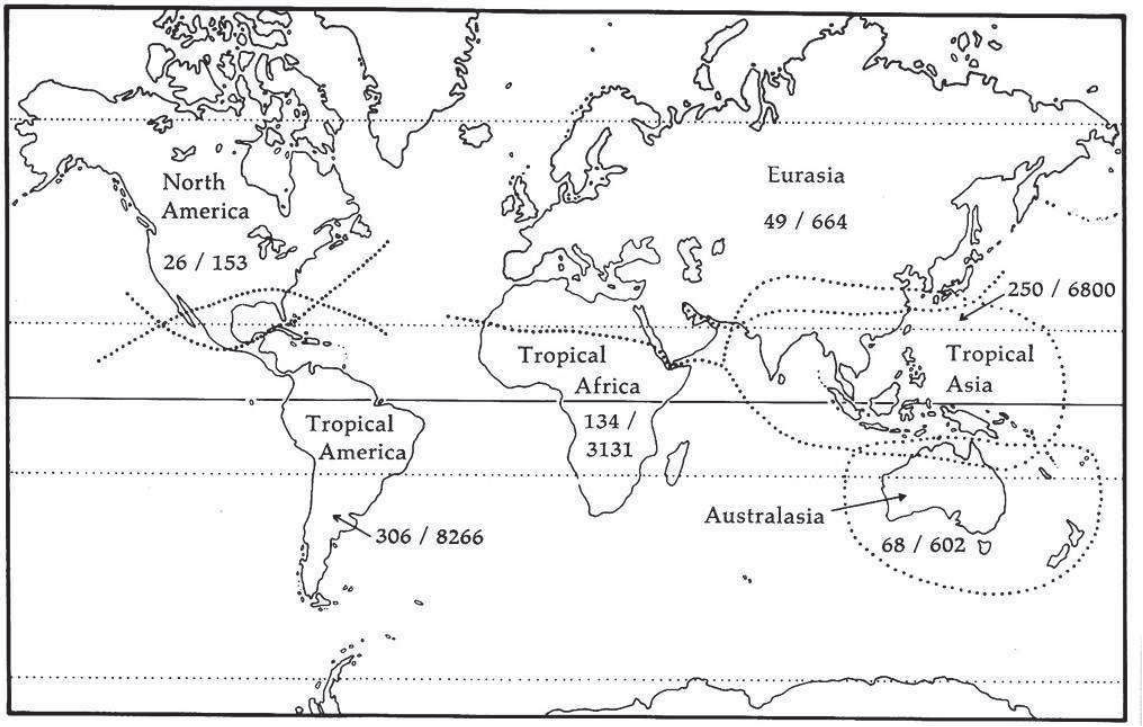


Figure I:5. Estimations de nombre d'espèces d'orchidées par région (genres/espèce). Les régions adjacentes se superposent lorsqu'elles sont séparées par une barrière océanique ou désertique [selon Dressler R. 1990].

africaines terrestres se trouvent souvent dans les prairies humides à plus de 3000 m d'altitude.

L'Australie, considérée comme la plus grande île du monde, a été longtemps isolée et 85% de sa flore est unique et endémique. Bien que peut-être mieux connu pour ses déserts, l'Australie a une grande diversité de climats et de paysages qui donnent lieu à un large éventail de types de végétation, en particulier dans les zones côtières. 40% des orchidées sont des espèces épiphytes ou lithophytes et poussent dans les régions tropicales du nord et du nord-est du pays. Seules cinq espèces épiphytes se produisent aussi loin au sud de Victoria. Les 60% d'orchidées australiennes sont terrestres et se trouvent principalement dans le sud-ouest et le sud-est du pays ; elles sont presque toutes endémiques [Stewart J. 1992].

Le nombre le plus important des orchidées se trouve en Amérique latine et en Asie et comme dans d'autres parties du monde, la proportion des orchidées terrestres est plus faible près de l'équateur et plus importante dans les régions tempérées. Plus de 3 000 espèces se trouvent en Colombie, suivie de l'Equateur et du Brésil avec 2 500 espèces chacun [Gutiérrez 2010]. Pour certains pays, comme la Colombie ou le Guatemala, les orchidées sont un symbole national. C'est également le cas pour la Thaïlande, d'où proviennent les espèces explorées dans cette étude.

C. Classification botanique

La place des Orchidacées diverge au sein des différentes classifications évolutives. La plupart sont basées sur des ressemblances morphologiques, comme celle de Cronquist (1981) et Thorne (1992), mais d'autres tiennent compte plutôt des études phylogénétiques, comme celle d'APG III (2009). Tous les botanistes restent unanimes que les orchidées font partie du groupe des plantes à fleur (Angiospermes) classés sous les Monocotylédones (**Tableau I:1**). En effet, elles n'ont pas de cambium vasculaire permettant à la tige d'augmenter de diamètre pendant la durée de la vie de la plante. En 1981, Cronquist classait les Monocotylédones sous le terme Liliopsida au rang de la classe, alors qu'onze ans plus tard, Thorne les a considérées comme la sous-classe des Magnoliopsida, désignant les Angiospermes. Avec les évolutions de la science, les avancés dans le domaine phylogénétique ont placé les Monocotylédones au clade du rang inférieur évoluant du clade des Angiospermes. Les deux types de classifications, morphologique et phylogénétique, divergent au rang de l'ordre. Les premières les classaient sous l'ordre des Orchidales, alors

que les deuxièmes démontrent l'évolution des orchidées à partir d'Asparagales, tout comme celle de Robert L. Dressler (1993). Ce botaniste américain a consacré quelques ouvrages à la taxonomie des orchidées et c'est sa classification, basée également sur la phylogénétique, qui sert aujourd'hui de référence, publiée dans *Phylogeny and classification of the orchid family*. Il reconnaît 5 sous-familles de la famille des Orchidaceae, chacune est ensuite divisée en tribus puis en sous-tribus. Les cinq sous-familles sont les suivantes :

- Les Apostasioideae
- Les Vanilloideae
- Les Cypripédioideae
- Les Orchidoideae
- **Les Epidendroideae**

Tableau I:1. La place des Orchidaceae au sein des classifications évolutives.

Auteur	**Cronquist (1981)**	**Thorne (1992)**	**Dressler (1993)**	**APG III (2009)**
Division	Magnoliophyta (Angiospermes)			
Classe	Liliopsida (monocotylédones)	Magnoliopsida (Angiospermes)		
Clade			Angiospermes	
Sous-classe	Liliidae	Monocotylédones		
Clade du rang inférieur				Monocotylédones
Superordre		Lilianeae		
Ordre	Orchidales	Orchidales	Asparagales	
Sub-ordre		Orchidineae		
Famille	**Orchidaceae**			

Nous nous intéressons dans cette étude plus particulièrement à la sous-famille des Epidendroïdées. C'est la plus grande et elle-même contient plus de la moitié de toutes les espèces. En effet, elle en comprend près de 15 000 espèces, réparties en plus de 550 genres, présents sur tout le globe terrestre. Presque toutes les espèces sous les tropiques appartiennent à cette sous-famille.

En raison de l'importante diversité morphologique des espèces qui la constituent, les classifications phylogénétiques la divisent en 16 tribus, puis en sous-tribus et enfin en

genres. Les espèces étudiées ici font partie de la tribu des **Vandeae** et la sous-tribu des **Aeridinae**.

Cette classification évolue constamment en fonction des progrès en matière de connaissances scientifiques, notamment grâce à des études évolutives et phylogénétiques.

D. Usages des orchidées dans le monde et croyances

La beauté des fleurs d'orchidées a toujours été appréciée et leur utilisation principale est ornementale. Les horticulteurs ont créé plus de 100 000 hybrides, notamment pour augmenter la palette de couleurs de ces plantes. Les orchidées sont ainsi devenues un produit horticole d'une grande importance économique. Une des espèces ornementales les plus connues est *Paphiopedilum wardii* avec des feuilles aux motifs très colorés [Gutiérrez 2010]. Beaucoup ignore que la vanille est également le fruit d'une orchidée. Introduit en Europe pour la première fois en 1510, le vanillier est cultivé depuis 1739 en Angleterre. On a attribué à sa gousse après fermentation des propriétés aphrodisiaques, au parfum exquis et capable de guérir la mélancolie, l'hypochondrie et les dyspepsies. Cependant, rarement employée comme médicament, la vanille est surtout utilisée pour parfumer des produits de beauté et aromatiser des aliments. Le genre *Vanilla* comprend environ 120 espèces, dont une quinzaine seulement produit de la vanilline. Les cultures les plus importantes sont localisées à Madagascar, au Sri Lanka, à Java ou encore au Mexique, à Tahiti et à la Réunion. L'espèce la plus cultivée est *Vanilla planifolia* [Lecoufle M. 2004].

Les peuples orientaux ont donné aux orchidées une consécration religieuse, d'où leurs usages décoratifs et symboliques dans de nombreux lieux de culte. Ces plantes ont toujours eu des significations symboliques en Extrême-Orient et y sont mentionnées pour leur beauté et leur parfum qui représentent à la fois la perfection, l'élégance, la noblesse, la délicatesse, mais aussi la fécondité. Les Chinois ont été probablement les premiers à décrire les orchidées dans les ouvrages anciens. Les premiers usages dans leur médecine traditionnelle apparaissent en 2800 avant J-C [Hossain MM. 2011]. Le mot « lan » qui définit l'orchidée signifie « homme supérieur », « femme élégante » ou encore « fort » et « viril ». Pour les **Chinois**, l'orchidée représente le symbole d'une personnalité parfaite d'une personne extraordinaire. Les espèces qui apparaissent le plus dans les ouvrages anciens, notamment la *Materia Medica* chinoise, appartiennent aux genres *Dendrobium, Gastrodia, Cymbidium* ou encore *Bletilla* [Kong J-M. *et al.* 2003]. Cinq espèces de *Dendrobium* sont

aujourd'hui incluses dans la Pharmacopée chinoise, comme *D. nobile* ou *D. monilforme* par exemple [Bulpitt C. J. *et al.* 2007].

Au Japon, les « ran » (mot qui désigne orchidée en japonais) étaient le symbole de la vertu, de la simplicité et de la féminité achevée. Elles étaient longtemps exclusives à l'élite, comme les familles de l'aristocratie impériale. L'utilisation des orchidées est accompagnée d'une légende qui raconte que l'empereur Shi-Kotei (250-233 avant J.-C.) a placé *Cymbidium ensifolium* dans les chambres de l'impératrice Yokhi-Hi après des années de mariage sans enfants. Suite à l'inhalation de son parfum, elle a donné naissance à treize fils. Les espèces les plus reportées dans la littérature japonaise décrivant les orchidées sont, comme en Chine, rattachées aux genres *Cymbidium, Dendrobium*, et *Bletilla*, mais également *Aerides* et *Neofinetia* [Hossain MM. 2011].

En Inde, il est défendu au peuple de posséder des orchidées et d'en porter les fleurs : ce droit est réservé aux princesses et aux dames de haute distinction. Les fleurs de *Cattleya* symboliseraient le mariage [Lecoufle M. 2004]. Leur utilisation a été reportée dans les ouvrages de l'Ayurveda. Un des ingrédients importants de différentes formulations de cette médecine traditionnelle indienne est Asthavarga, composé de 8 plantes, dont 4 orchidées du genre *Malaxis* et *Habenaria* [Singh A *et al.* 2009]. En plus des genres *Bulbophyllym, Cymbidium* et *Pholidata*, on trouve également des études ethnobotaniques du sud indien concernant les genres *Vanda* et *Aerides* [Rajendran A *et al.* 1997]. Selon Reddy KN., différents groupes ethniques d'Andhra Pradesh utilisent 23 espèces d'orchidées pour traiter différentes maladies associées à l'alimentation [Reddy K.N. 2008 et Reddy K.N. *et al.* 2005]. Par ailleurs, la dénomination *Vanda* provient du sanskrit, langue classique de la civilisation brahmanique de l'Inde. Elle désigne en fait l'orchidée *Vanda tesselata*, l'espèce locale la plus importante et cultivée en abondance [Dash P.K. *et al.* 2008]. L'origine de cette nomenclature reflète l'importance des *Vanda* dans la culture indienne. L'espèce *Vanda tesselata* est utilisée par des populations indiennes pour ses propriétés anti-inflammatoires, anti-cancéreuses et pour traiter diverses pathologies cutanées [Kumar P. *et al.* 2005, Simmler, 2010 et Ho *et al.* 2003].

En **Europe**, le terme « orchis » a été employé en Grèce depuis l'Antiquité. C'est le philosophe grec Théophraste (372-286 avant J.-C.) qui l'a utilisé pour la première fois dans son ouvrage *L'histoire des plantes.* Ce nom a ensuite servi pour désigner la famille botanique elle-même. Les botanistes européens ont continué à se référer aux ouvrages des auteurs grecs pour désigner les espèces du même genre [Lecoufle M. 2004]. *Orchis* est un mot grec qui signifie testicules, en allusion à la structure racinaire tubéreuse de la plupart

des espèces européennes terrestres [Hossain MM. 2011]. Cette morphologie particulière est à l'origine de la croyance populaire que la consommation des orchidées du genre *Orchis* améliore la virilité et la puissance sexuelle. D'autres genres européens comme *Epipactis* ou *Spiranthes* devaient combattre les états sévères de démence, les rhumatismes, ou agir comme diurétique et aphrodisiaque [Hossain MM. 2011].

On ne sait pas exactement à quand remonte l'utilisation des orchidées en **Afrique**. Cependant, le peuple des Zoulous les employait à des visées thérapeutiques depuis longtemps, notamment les espèces *Habenaria foliosa* et *Ansellia humilis*, utilisées comme vomitif ou antidote aux cauchemars. D'autres espèces ont également été utilisées pour traiter la folie [Hossain MM. 2011].

En **Amérique**, ce sont les Aztèques qui reportent les premières utilisations de ces plantes sur ce continent. C'était le premier peuple qui utilisait la vanille pour parfumer le cacao et le chocolat. Le genre le plus utilisé en Amérique du Nord est *Cypripedium*, appelé également « chaussons de femme ». L'espèce *Cypripedium parvifolium* est employée par les Cherokees, Iroquois Menominee et autres tribus pour traiter notamment l'insomnie, l'anxiété, les palpitations, le delirium et les fièvres [Wilson MF. 2007]. Le Dr Moerman de l'Université de Michigan a répertorié les emplois des plantes des peuples indigènes américains, et cite notamment quatre espèces utilisées comme analgésique, sédatif ou encore pour des problèmes gynécologiques : *C. acaule, C. reginae, C. candidum* et *C. parvifolium* [http://herb.umd.umich.edu].

Les genres traditionnellement employés en **Australie** sont, comme en Chine, *Dendrobium, Gastrodia* et *Cymbidium*. Autrefois, les graines de *Selenipedium chica*, une orchidée pouvant atteindre 3m de hauteur, remplaçaient la vanille [Hossain MM. 2011]. Les tubercules de certaines orchidées australiennes ont un goût sucré mais la présence d'alcaloïdes potentiellement toxiques limite leur usage alimentaire [Lawler LJ. *et al.* 1970].

Cette liste, non exhaustive, ne fait qu'illustrer la richesse des utilisations des orchidées à travers le monde et démontre l'importance de cette famille botanique au sein des peuples indigène à travers les continents. Il en découle de nombreuses potentialités médicinales, comme l'attestent les publications.

Les utilisations traditionnelles des genres explorés dans cette étude seront reportées dans les parties concernées de ce mémoire.

E. Données phytochimiques

Comme tous les végétaux, les orchidées produisent un grand nombre de métabolites. Parmi ceux déjà identifiés, citons la présence d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de stilbénoïdes, d'anthocyanes et de stérols. Seul un petit nombre d'espèces a fait jusqu'à présent l'objet d'investigation phytochimique. Ces recherches concernent en priorité les orchidées utilisées dans les préparations traditionnelles. En effet, la phytochimie des genres *Dendrobium, Bletilla, Cymbidium* et *Gastrodia* est largement décrite dans la littérature scientifique. *Dendrobium* constitue le genre le plus étudié avec une centaine de métabolites décrits dans 42 espèces, soit 32 alcaloïdes, 6 coumarines, 15 bibenzyls, 4 fluorenones, 22 phénanthrènes et 7 sesquiterpènes [Hossain MM. 2011].

Même si les travaux phytochimiques concernant la sous-famille des Epidendroideae sont nombreux, très peu de genres dans la sous-tribu des Aeridinae ont été explorés. Lorsque des études ont été publiées, elles concernent en majorité le genre *Vanda*. Il s'agit par exemple de phénanthropyranes, la parviflorine et la tessalatine, isolés de *V. parviflora* et *V. tesselata*, respectivement [Anarudha V. *et al.* 1998]. Un glucoside, le tris[4-(β-D-glucopyranosyloxy)benzyl]citrate nommé parishine, a été identifié dans *V. parishii* [Dahmén *et al.* 1976]. Une seule espèce *V. tesselata* (syn. *Vanda roxburghii*) a fait l'objet d'évaluation biologique, avec mise en évidence de propriétés cicatrisantes, anti-inflammatoires ou encore antiarthritiques [Nayak BS *et al.* 2005, Prasad *et al*. 1966]. Comme évoqué précédemment, les travaux antérieurs au laboratoire ont permis d'identifier des stilbénoïdes et des dérivés glucopyranosyloxybenzyle-malates, isolés de *V. coerulea* et *V. teres,* respectivement [Simmler *et al.* 2010 et 2011].

Au final, un certain nombre de classes chimiques a été repéré dans la famille des Orchidacées, dans des genres classés dans différentes tribus et les sous-tribus. Leur degré de spécificité à une tribu ou à une sous-tribu est difficile à définir, dans la mesure où ces études ne concernent que quelques représentants de ces mêmes tribus et sous-tribus et sont donc loin d'être représentatives. Charlotte Simmler a notamment mis en évidence une diversité phytochimique au sein de 2 espèces de *Vanda* classées dans la même sous-tribu des Aeridinae. Il est donc tout à fait probable que de nouvelles originalités structurales peuvent être découvertes au sein de genres taxonomiquement proches. La difficulté de prédire le type de structures biosynthétisées par les espèces explorées dans cette étude nous a donc conduits à faire un bref état des lieux bibliographique concernant la phytochimie de la sous-famille des Epidendroideae.

E. I. Les oses et polyoses

Les sucres simples sont fréquemment présents de façon uniforme dans tout le règne végétal. Le plus souvent, on retrouve le glucose, le fructose et leur diholoside correspondant au saccharose. Dans une moindre mesure, la présence du xylose, de rhamnose et de galactose est également possible [Bruneton J. 2009]. Dans les orchidées, des oligosaccharides ont été identifiés notamment dans leur nectar et ont pour fonction d'attirer les insectes pollinisateurs. Jeffrey DC a répertorié le contenu des exsudats et des nectars d'une quarantaine de genres [Jeffrey DC. 1970]. Le glucose, le fructose et le saccharose sont présents systématiquement, mais des différences dans la nature d'autres oses apparaissent. Le raffinose est commun aux genres *Oncidium, Angraecum* et *Laeliocattleya*. Le mélibiose a été identifié dans le genre *Sobralia* alors que le stachyose, un tetrasaccharide, est présent dans certains *Cymbidium*. D'autres oses sont également présents mais en plus faibles teneurs, notamment le gentibiose, le lactose, le maltose ou encore le cellobiose. Seul le genre *Oncidium* renferme du mélezitose.

Les polysaccharides ont également fait l'objet des recherches dans les orchidées, surtout les polysaccharides hydrosolubles de type amidon et mucilages. Certaines préparations traditionnelles sont particulièrement riches en ce type de polysaccharides. Le « salep », une célèbre boisson d'origine turque utilisée par les Ottomans, est composé des tubercules séchés et broyés d'*Orchis mascula*, *Orchis militaris* et des espèces proches qui contiennent un polysaccharide très nourrissant, appelé le glucomannane. Il s'agit d'une chaîne de D-glucose et D-mannose reliés par une liaison β-(1→4). La composition du salep varie en fonction des cultures, des saisons de prélèvement et des espèces dont il est constitué. 48% de sa composition sont constitués de mucilages. En Inde, le salep est préparé à partir d'espèces appartenant aux genres *Eulophia*, *Orchis* et *Satyrium* [Hossain MM. 2011].

Différents types de polysaccharides ont été isolés de bulbes et pseudobulbes d'orchidées sympodiales, telles que *Dendrobium nobile*, *Catasetum macroglossum* ou encore *Cyrtopodium cardiochilum.* Beaucoup d'entre eux ont fait l'objet d'évaluations biologiques résumées dans le **tableau I:2**. Zha XQ a démontré que le profil par électrophorèse des polysaccharides de différentes espèces de *Dendrobium* pourrait devenir un outil pour authentifier les espèces de différentes provenances et contrôler ainsi la qualité des drogues [Zha XQ *et al.* 2012].

Aucun polysaccharide n'a été mis en évidence dans les orchidées à croissance monopodiale qui ne possèdent pas de pseudobulbes.

Tableau I:2. Quelques exemples de polysaccharides isolés d'orchidées et de leurs activités biologiques.

Espèce	Organe	Composition	Activités biologiques	Références
Catasetum macroglossum	pseudobulbes	glucomannane	Anti-inflammatoire	[Ramos P. *et al.* 2012]
Cyrtopodium cardiochilum	pseudobulbes	glucomannane	Anti-inflammatoire et immuno modulatrice	[Barreto DW *et al.* 2006]
Dendrobium nobile	tiges	Hétéropolysaccharides composés de mannose, glucose, galactose, rhamnose, arabinose et xylose	Activité anti-tumorale	[Wang JH. *et al.* 2010]
		Galactomannoglucane Rhamnoarabinogalactane	Prolifération des lymphocytes T et B	[Wang JH. *et al.* 2010]

E. II. Les stilbénoïdes

Les stilbénoïdes regroupe des composés phénoliques possédant deux noyaux benzéniques séparés par un pont éthane ou éthène. Leur nom a été créé pour souligner le lien de parenté biogénétique avec les flavonoïdes. On peut les diviser en deux sous-groupes : les **stilbènes** et les **bibenzyls** (comme le resvératrol) qui sont biosynthétiquement rattachés à leurs dérivés, **les phénanthrènes** et **9,10-dihydrophénanthrènes** (comme la coelonine). Plus de 200 dérivés phénanthréniques ont été identifiés dans une cinquantaine d'espèces d'orchidées, en particulier dans les genres *Dendrobium, Bulbophyllum, Eria, Maxillaria, Bletilla, Coelogyna, Cymbidium, Ephemerentha* et *Epidendrum* [Kovacs A. 2009]. Cette classe chimique est également présente dans d'autres familles végétales comme les Dioscoreacées, les Combretacées mais aussi les Bryophytes [Bruneton J. 2009, Asakawa Y. *et al.* 2013].

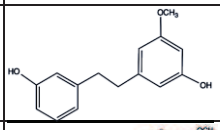
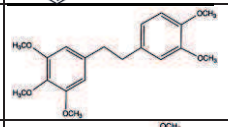
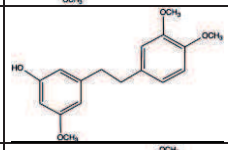
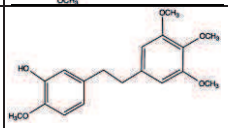
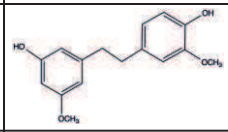
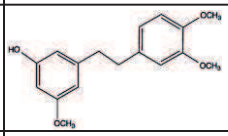
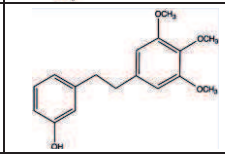
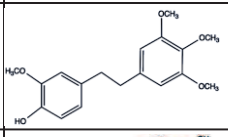
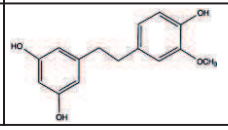
Le **tableau I:3** répertorie quelques exemples de bibenzyls identifiés dans les orchidées ainsi que certaines activités biologiques qui leur ont été attribuées. Concernant leur fonction dans la plante, certains stilbènes et bibenzyls sont des phytoalexines qui peuvent, parfois, intervenir aussi comme régulateurs de croissance. Ils sont également

souvent antifongiques et antimicrobiens et participent ainsi à la défense de la plante contre les attaques par des microorganismes [Bruneton J. 2009].

Les **phenanthrènes** naturels peuvent être divisés en trois groupes principaux :

- les phénanthrènes monomériques (= monophénanthrènes)
- les phénanthrènes dimériques (= diphénanthrènes)
- et les phénanthrènes trimériques (= triphénanthrènes).

Tableau I:3. Quelques exemples de bibenzyls isolés d'orchidées et de leurs activités biologiques.

Nom du composé	Structure	Exemple d'espèces	Activité biologique	Références
Batatasine III		*Epidendrum rigidum*	Cytotoxique, herbicide	[Hernandez-Romero Y. *et al.* 2005]
Chrysotoxine		*Dendrobium auranticum var. denneanum* *D. chrysanthum*	Non précisée	[Yang L. *et al.* 2005] [Yang L. *et al.* 2006]
Cumulatine		*Bulbophyllum kwangtungense*	Non précisée	[Wu B. *et al.* 2006]
Erianine		*Eria carinata*	Anti-angiogénique	[Majumder P.L. *et al.* 1984] [Gong Y-Q. *et al.* 2004]
Gigantol		*Vanda coerulea* *Epidendrum rigidum* *Dendrobium nobile* *Cymbidium goeringii*	Anti-oxydante, anti-inflammatoire, phytotoxique, antimutagène	[Simmler C. *et al.* 2010] [Hernandez-Romero Y. *et al.* 2005] [Miyazawa. *et al.* 1997]
3-méthylgigantol		*Ephemerentha lonchophylla*	Anti-agrégante plaquettaire	[Chen CC. *et al. 2000*]
Isoamoenyline		*Dendrobium amoenum*	Anti-oxydante, faiblement anti-microbienne	[Venkateswarlu S. *et al. 2002*]
Moscatiline		*Dendrobium moschatum* *D. loddigesii*	Anti-agrégante plaquettaire	[Chen CC. *et al. 1994*]
Tristine		*Bulbophyllum triste*	Non précisée	[Majumder P.L. *et al.* 1993]

a. Phénanthrènes monomériques

C'est la forme naturelle la plus fréquente dans la nature avec environ 210 composés connus. Presque la moitié d'entre eux sont des **dérivés phénanthréniques purs** et des **9,10-dihydrophénanthrènes** (**Figure I:6**) qui sont seulement hydroxy- et/ou méthoxy-substitués. Leur diversité repose essentiellement sur le nombre et la position des fonctions –OH et $–OCH_3$. Très souvent, leur nombre varie entre 3 et 6 et leur position en C-2, C-3, C-5, C-6 et C-7. Les phénanthrènes substitués de façon homogène avec un seul type de substituant sont rares, mais existent tout de même dans les orchidées [Kovacs *et al.* 2008]. La substitution en C-9 et C-10 existe encore moins souvent. Certains phénanthrènes peuvent être glycosylés, comme c'est le cas du dendriside A, isolé de *Dendrobium chrysanthum* [Ye Q-H. *et al.* 2003] ou de 4 dérivés isolés de *Bletilla striata* [Yamaki M. *et al.* 1993]. D'autres sont substitués avec un groupement carboxyl (-COOH). C'est le cas de l'acide ochrolique, substitué en C-5, qui a été isolé de *Coelogyne ochracea* [Anuradha V. *et al.* 1994].

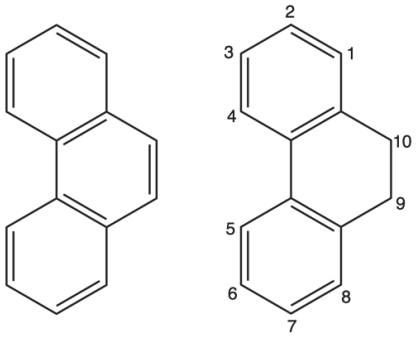


Figure I:6. Structure de base des phénanthrènes (gauche) et des dérivés 9,10-dihydrophénanthrènes (droite).

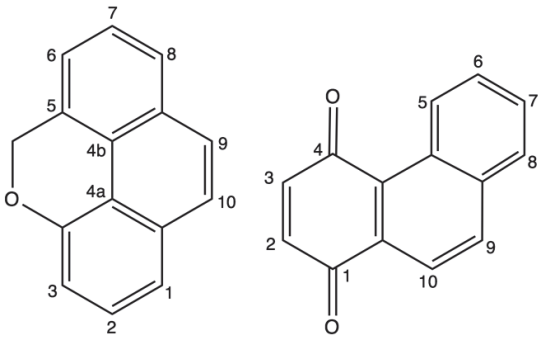


Figure I:7. Structure de base des phénanthropyranes (gauche) et des phénanthroquinones (droite).

Dans le groupe des phénanthrènes monomériques, également présents dans les Orchidacées, on classe leurs dérivés **phénanthroquinones** et **phénanthropyranes** (**Figure I:7**) (ou leurs formes 9,10-dihydro-)**.**

Comme évoqué précédemment, des dérivés phénanthréniques monomériques ont été identifiés dans la sous-tribu des Aeridinae. En plus des phénanthropyranes tels la parviflorine et la tesselatine, isolés de *Vanda parviflora* et *V. tesselata*, respectivement, la présence d'un phénanthropyrane, l'aeridine, a été signalée dans *Aerides crispum* [Anuradha V. *et al.* 1998].

Les activités biologiques répertoriées pour cette classe chimique soulignent leurs propriétés multiples. En effet, leurs propriétés anti-tumorales, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antiagrégantes plaquettaires, voire antiallergiques, ont été décrites En ce qui concerne leur rôle pour le végétal qui les synthétise, il a été postulé que certains dérivés comme la coeloginanthrine et la coeloginanthridine pourraient participer à la régulation de la croissance de l'orchidée *Coelogyne cristata*, d'où ils ont été isolés [Majumder P.L. *et al* 2001].

Quelques exemples des phénanthrènes monomériques et leurs dérivés isolés à partir des orchidées, ainsi que leurs activités biologiques sont répertoriés dans le **Tableau I:4 à I:6**.

Tableau I:4. Quelques exemples de phénanthrènes isolés d'orchidées et leurs activités biologiques.

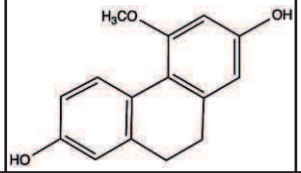
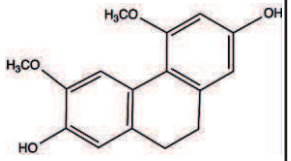
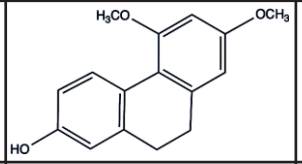
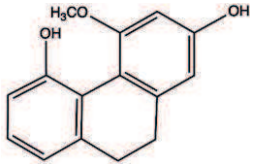
Dérivé	Nom du composé	Structure	Exemple d'espèces	Activité biologique	Références
Phénanthrènes et 9,10-dihydrophénanthrènes	Coelonine		*Bletilla striata* *Vanda coerulea* *Cymbidium aloifolium*	Anti-inflammatoire Anti-oxydante	[Yamaki M. *et al.* 1991] [Simmler C. *et al.* 2010] [Juneja R.K.. *et al.* 1987]
	Methoxycoelonine		*Bulbophyllum vaginatum* *Agrostophyllym callosum* *Vanda coerulea*	Anti-inflammatoire Anti-oxydante	[Leong Y-W. *et al.* 1997] [Majumder P. L. *et al.* 1996] [Simmler C. *et al.* 2010]
	Orchinol		*Orchis militaris*	Antifongique	[Baller A. *et al.* 1957] [Fisch M. H. *et al.* 1973]
	Moscatine		*Dendrobium moscatum* *Dendrobium chrysanthum* *Dendrobium loddigesii*	Anti-agrégante plaquettaire	[Majumder P. L. *et al.* 1987] [Yang L. *et al.* 2006] [Chen C-C. *et al.* 1994]

Tableau I:5. Quelques exemples de phénanthroquinones isolés d'orchidées et leurs activités biologiques.

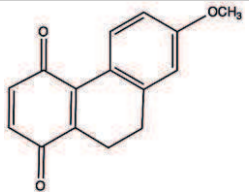
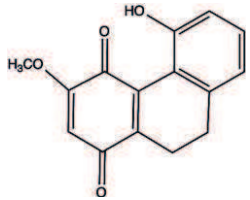
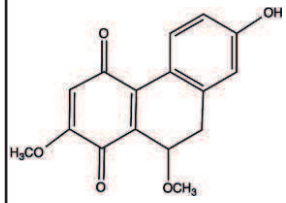
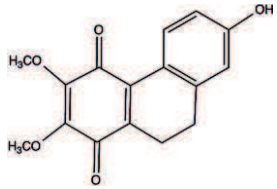
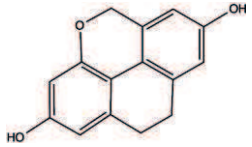
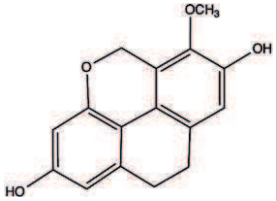
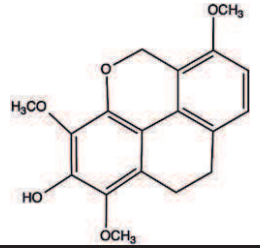
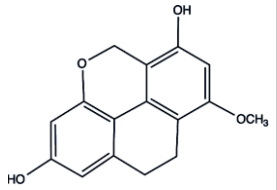
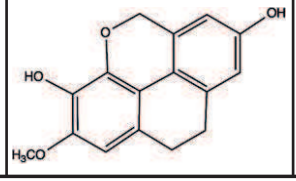
Dérivé	Nom du composé	Structure	Exemple d'espèces	Activité biologique	Références
Phénanthroquinones	Ochrone A		*Coelogyne ochracea*	Aucune indication	[Bhaskar M.U. *et al.* 1991]
	Cymbinodine A		*Cymbidium aloifolium*	Aucune indication	[Barua A.K. *et al.* 1990]
	Cypritibetquinone B		*Cypripedium tibeticum*	Aucune indication	[Liu D. *et al.* 1995]
	Denbinobine B		*Dendrobium sinense*	Antibactérienne	[Chen X. J.. *et al.* 2013]

Tableau I:6. Quelques exemples de phénanthropyranes isolés d'orchidées et leurs activités biologiques.

Dérivé	Nom du composé	Structure	Exemple d'espèces	Activité biologique	Références
Phénanthropyranes	Flavidine		*Coelogyne flavida* *Vanda coerulea*	Anti-oxydante	[Majumder P. L. *et al.* 1982] [Simmler C. *et al.* 2010] [Jayaprakasha G. K. *et al.* 2004]
	Imbricatine		*Vanda coerulea* *Pholidota imbricata*	Anti-inflammatoire Anti-oxydante	[Majumder P. L. *et al.* 1982] [Simmler C. *et al.* 2010]
	Aeridine		*Aerides crispum*	Aucune indication	[Anuradha V. *et al.* 1998]
	Parviflorine		*Vanda parviflora*	Aucune indication	[Anuradha V. *et al.* 1998]
	Tessalatine		*Vanda tesselata*	Aucune indication	[Anuradha V. *et al.* 1998]

b. Phénanthrènes dimériques et trimériques

Ils sont nettement moins nombreux, avec une quarantaine de composés identifiés actuellement. Il s'agit d'association de deux monomères de phénanthrènes et leurs dérivés 9,10-dihydro, généralement reliés entre les positions C-1-1' (**Figure I:7**). Notons que les liaisons C1-3', 1-8' et 3-3' existent également dans la nature [Kovacs A. *et al.* 2008]. Cependant, un dimère phénanthrène-phénanthroquinone, appelé denthyrsinone, a été isolé des tiges de *Dendrobium thyrsiflorum* [Zhang G-N. *et al.* 2005].

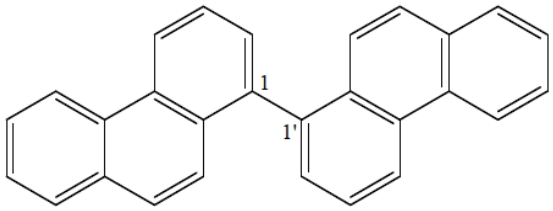


Figure I:7. Structure de base des phénanthrènes dimériques, généralement connectés par une liaison 1-1'.

Leurs activités biologiques sont beaucoup moins répertoriées. A titre d'exemple, les phénanthrènes dimériques ont été identifiés dans *Bletilla striata* et baptisés blestriarenes A et B. Ils présentent une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus mutans* [Yamaki M. *et al.* 1989]. Quelques exemples isolés des orchidées sont illustrés par le **Tableau I:7**. Aucun diphénanthrène n'a été répertorié dans la sous-tribu des Aeridinae.

Un seul triphénanthrène a été isolé à ce jour des tubercules de l'orchidée *Cremastra appendiculata.* (**Figure I:8**) [Xue Z. *et al.* 2006].

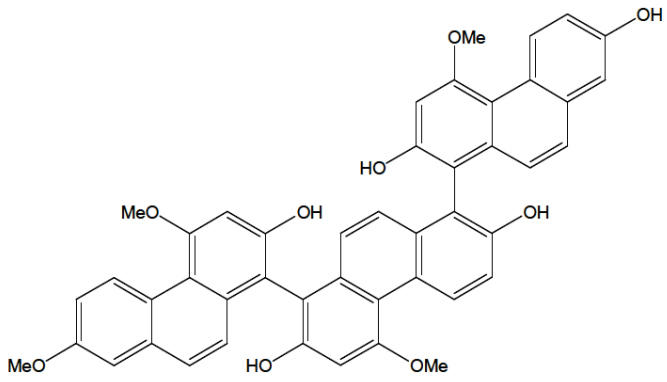
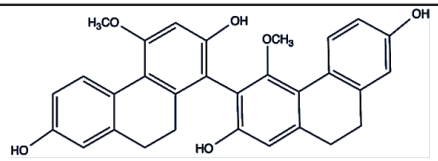
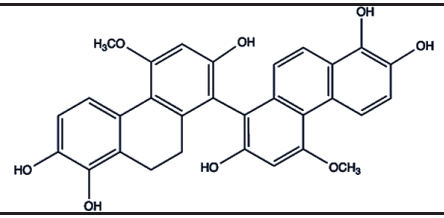
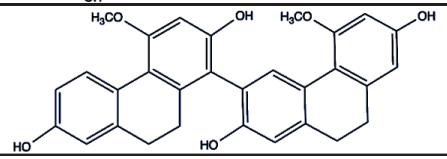
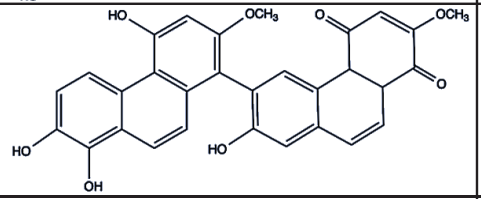
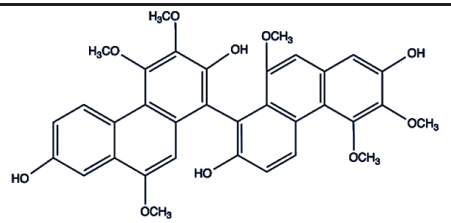
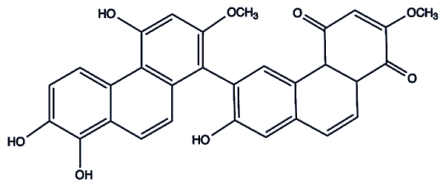


Figure I:8. Structure du triphénanthrène isolé à partir des tubercules de *Cremastra appendiculata* [Xue Z. *et al*. 2006].

Tableau I:7. Quelques exemples de phénanthrènes dimériques isolés d'orchidées [Kovacs A *et al.* 2008].

Dérivé	Nom du composé	Structure	Exemple d'espèces	Références
Phénanthrènes dimériques	Blestrianol A		*Bletilla striata*	[Bai L. *et al.* 1991]
	Blestriarene B		*Bletilla striata*	[Bai L. *et al.* 1991]
	Gymnocopine C		*Bletilla striata* *Bletilla formosana*	[Yamaki M. *et al.* 1989] [Lin Y-L. *et al.* 2005]
	Denthyrsinol		*Dendrobium thyrsiflorum*	[Zhang G-N. *et al.* 2005]
	Isoreptanthrine		*Bulbophyllum reptans*	[Majumder P. L. *et al.* 1999]
	Denthrysinone		*Dendrobium thyrsiflorum*	[Zhang G-N. *et al.* 2005]

E. III. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes au sens large sont des pigments quasiment universels des végétaux. Ils sont notamment responsables de la coloration des fleurs pour attirer les insectes pollinisateurs. La couleur jaune des pétales provient de la présence de chalcones, d'aurones et de flavonols, les couleurs rouge et mauve sont liées aux anthocyanosides. Certains ne sont pas directement visibles mais peuvent jouer le rôle de co-pigments, ce qui est le cas par exemple de la coloration bleue liée à l'association des flavones-anthocyanosides [Bruneton J. 2009]. Ces composés sont largement répandus dans le règne végétal et il n'est donc pas surprenant que certains aient été retrouvés au sein des Orchidacées.

Le terme flavonoïdes inclut les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavonoïdes, les anthocyanidines, les chalcones et les aurones. Ils reposent tous sur une structure proche basée sur un noyau hétérocyclique central en C15, variant d'un groupe à l'autre selon la position du cycle B et le nombre de substituants phénoliques, méthoxyles et autres (**Figure I:9**). Ce sont principalement les **flavones**, les **flavonols** et les **anthocyanidines** qui ont été répertoriés dans les orchidées.

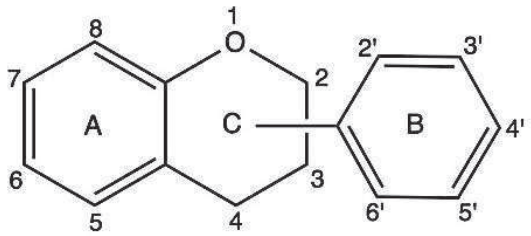


Figure I:9. Structure de base des flavonoïdes au sens large.

a. Les flavones et flavonols

Chez ce type de flavonoïdes, le cycle B est connecté en position C-2 et dans la majorité des cas, le cycle A est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. La principale différence entre ces deux sous-groupes est l'absence de l'hydroxyle en position C-3 chez les flavones. Ainsi, ces hydroxyles peuvent être libres ou éthérifiés et l'un d'entre eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique et créer ainsi des formes C-glycosylées, très fréquentes chez les végétaux. En règle générale, ce sont l'hydroxyle en C-7 des flavones et l'hydroxyle en C-3 des flavonols qui sont impliqués.

L'étude menée par Williams C. A. sur 142 espèces représentant 75 genres d'orchidées a démontré que les flavonoïdes les plus fréquents dans leurs feuilles sont des C-hétérosides de flavones (53%) et des flavonols (37%) [Williams C. A. 1979]. Cependant, leur distribution selon les provenances géographiques des espèces n'est pas évidente à déterminer. Une seule corrélation a été dégagée de cette étude : les C-hétérosides de flavones sont plus répandus dans les espèces subtropicales (notamment les Epidendroideae). Les autres composés restent rares dans les orchidées, des dérivés très substitués ou hautement glycosylés n'ont pas été retrouvés dans cette famille [Hossain M.M. 2011].

Parmi les flavonols aglycones, le kaempférol ou la quercétine ont été répertoriés dans le genre *Dendrobium.* Concernant les flavones, la présence de chrysine, d'homoéridyctol ou encore de naringénine est signalée dans les genres *Dendrobium* et *Cypripedium* [Hossain M.M 2011]. Quelques flavonols O-glycosylés ont été retrouvés dans l'espèce *Anoectochilus roxburghii*, appartenant à la sous-famille des Orchidoideae [Gutiérrez R. M. 2010].

b. *Les anthocyanidines*

Les anthocyanidines (ou anthocyanidols) et leurs dérivés hétérosidiques, appelés anthocyanines (ou anthocyanes ou encore anthocyanosides) sont des pigments naturels des feuilles, des pétales et des fruits. Leur noyau aglycone influence la couleur des pétales et dépend également du pH. Ainsi, les anthocyanidines passent du rouge en milieu acide au bleu en pH intermédiaire et deviennent incolores puis jaunes en milieu basique. Leur forme libre est souvent instable et donc peu présente dans les tissus végétaux. L'O-glycosylation en position C-3 leur confère une meilleure stabilité et hydrosolubilité. De nombreuses anthocyanines existent également sous forme acétylée.

Plusieurs études ont été menées sur la présence des anthocyanidines dans les fleurs d'orchidées et mettent en évidence la cyanidine comme aglycone majoriatire. Saito *et al*. ont isolé la cyanidine 3,7,3'-triglucoside et ses deux formes acétylées par l'acide *p*-hydroxybenzoïque et l'acide malonique dans les fleurs rouge-pourpre du genre *Dendrobium* [Saito N. *et al.* 1994]. Ils se sont ensuite intéressés aux fleurs de teinte mauve-rosâtre à blanche de *Bletilla striata* afin de mettre en évidence la présence de 8 anthocyanines également basées sur la même forme glycosylée de la cyanidine, acétylée avec l'acide malonique, l'acide *p*-coumarique et l'acide caféique [Saito N. *et al.* 1995]. Le même type de

composés a été répertorié par Tatsuzawa *et al*. dans cinq espèces de *Phalaenopsis* [Tatsuzawa F. *et al.* 1997].

Dans la tribu des Vandeae, 11 anthocyanines responsables de la couleur rouge-pourpre de quatre espèces botaniques et treize hybrides de *Vanda* ont été répertoriés. Leurs structures sont basées sur la cyanidine et la delphinidine 3,7,3'-triglucoside, certaines acétylées avec l'acide malonique ou l'acide hydroxycinnamique [Tatsuzawa F. *et al.* 2004]. Majoritairement, des dérivés de la cyanidine ont été retrouvés dans *Aerides rosea* et, dans une moindre mesure, des dérivés de la pélargonidine dans *Aerides multiflorum* [Junka N. *et al.* 2007].

E. IV. Composés phénoliques divers

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de métabolites végétaux, il est donc difficile de les définir simplement. Il s'agit de composés dont l'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction (éther, ester, hétéroside).

a. Les dérivés d'acides organiques et de l'alcool 4-hydroxybenzylique

Les phénols et les acides phénoliques sont présents dans la paroi cellulaire des plantes et sont rarement retrouvés seuls, mais plutôt sous forme glycosylée et parfois estérifiée avec un acide organique (acide citrique, acide malique, acide tartrique, acide cinnamique ou encore acide succinique, par exemple).

Yang *et al*. ont identifié des dérivés glycosylés d'acide cinnamique, nommés *cis*- et *trans*-mélilotosides et dihydromélilotoside dans *Dendrobium auranticum* var. *denneanum* qui auraient des activités anti-oxydantes [Yang L. *et al.* 2007]. Le plus grand nombre de composés phénoliques isolés à partir des orchidées est basé sur la structure de 4-hydroxybenzyl alcool, souvent estérifié avec un acide organique. Ainsi, un hydroxybenzyl ester d'acide malique, nommé habenariol, a été identifié et isolé à partir d'une orchidée aquatique *Habenaria repens*. Il possède des activités anti-oxydantes ou encore des propriétés répulsives envers des insectes phytophages [Johnson M. K. *et al.* 1999 et Wilson D. M. e*t al.* 1997] (**Figure I:10**).

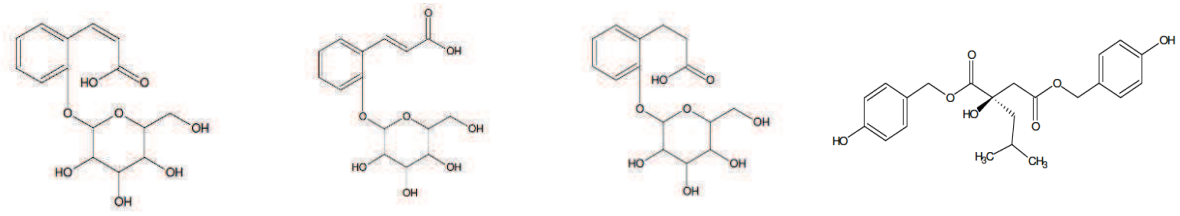


Figure I:10. Structure des dérivés phénoliques isolés à partir de *Dendrobium auranticum* et *Habenaria repens* [Gutiérrez R. M. 2010].

Des investigations phytochimiques de différentes espèces appartenant à la sous-famille des Orchidoideae ont mené à l'identification de nombreux dérivés hétérosidiques de type ester de l'alcool hydroxybenzylique et d'acide organique dans les genres *Gymnadenia* et *Coeloglossum* [Huang S-Y. *et al.* 2004 et Yue Z. *et al.* 2010]. La majorité de ces composés engage l'acide tartrique (par ex. les coelovirines A à G, la dactylorhine B ou encore la loroglossine) ou l'acide malique (comme les dactylorhines A et E ou la militarine) sous forme de mono- et bis (4-*O*-β-D-glucopyranosylbenzyl) (**Figure I:11**). L'intérêt biologique de ces métabolites réside dans leur capacité anti-oxydante et neuro-protectrice [Yue Z. *et al.* 2010 ; Qin X. Y. *et al.* 2010 et Zhang D. *et al.* 2006].

Ce type de métabolites a également été répertorié dans la sous-famille des Epidendroideae. La loroglossine et la militarine, notamment, ont été isolés *d'Orchis militaris* [Aasen A. *et al.* 1975]. Comme évoqué précédemment, le tris[4-(β-D-glucopyranosyloxy)benzyl] citrate, nommé parishine, a été identifié dans *Vanda parishii* [Dahmén *et al.* 1976]. Plus récemment, les explorations phytochimiques de *Vanda teres* ont mené à l'isolement de vandatérosides I à III et de leur précurseur biosynthétique, l'acide eucomique (=acide 2-(4-hydroxybenzyl)-malique). Ce dernier a été retrouvé également dans *Vanda coerulea* [Simmler C. 2010].

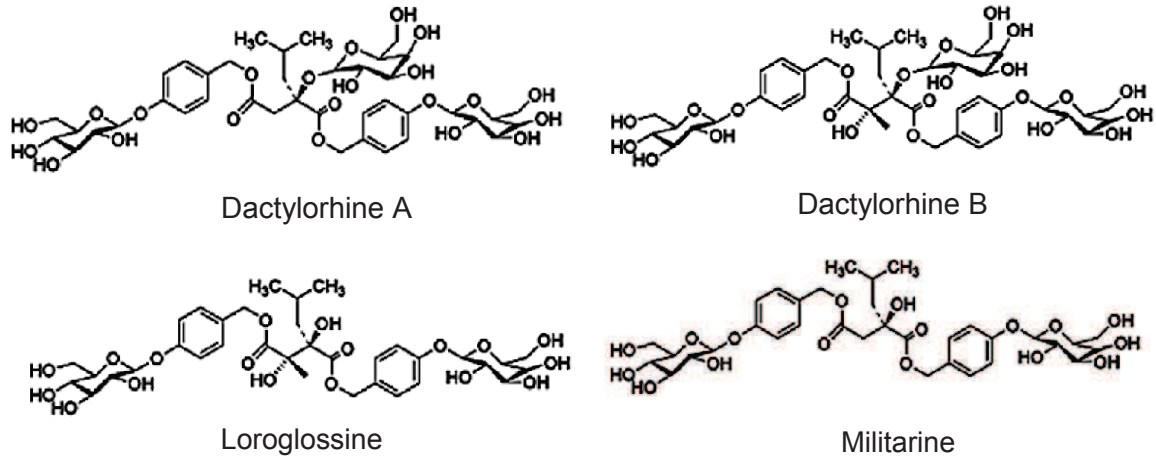
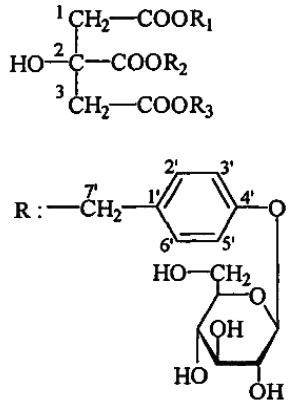


Figure I:11. Exemples d'hydroxybenzyl esters d'acides organiques isolés à partir des orchidées des genres *Gymnadenia* et *Coeloglossum* [Qin X-Y. *et al.* 2010].

L'orchidée la plus étudiée pour ses dérivés de type hydroxybenzyl estérifiés ou non, avec ou sans un acide organique, reste sans doute *Gastrodia elata*. Cette plante médicinale chinoise est l'une des rares espèces saprophytes et les composés qu'elle contient auraient notamment des propriétés anti-inflammatoires [Lee J. Y. *et al.* 2006], anti-angiogéniques [Ahn E. K. *et al.* 2007], anti-asthmatiques [Jang Y. W. *et al.* 2010] ou encore neuro-protectrices et préviennent l'ischémie cérébrale [Kim H. J. *et al.* 2007]. Parmi les dizaines de composés isolés, citons notamment la gastrodine, les parishines B et C (dérivés d'acide citrique) (**Figure I:12**), puis des molécules de petite masse comme le 4-hydroxy-benzyl-méthyléther, le 4-hydroxybenzyl alcool, le 4-hydroxybenzaldéhyde ou encore la vanilline [Lin J-H. *et al.* 1996 ; Noda N. *et al.* 1995 ; Zeng X. *et al.* 2006 et Yang X-D. *et al.* 2006] (**Figure I:13**).

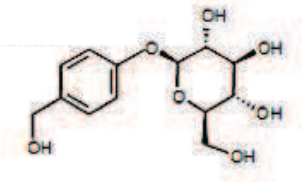
b. Coumarines

Il s'agit de composés dérivant tous de la même structure de base correspondant à la coumarine. Ce sont des 2*H*-1-benzopyran-2-ones, considérées comme étant des lactones d'acides 2-hydroxy-*Z*-cinnamiques. Sauf exceptions, toutes les coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle, formant ainsi la 7-hydroxycoumarine ou ombelliférone. Les dérivés sont appelés hydroxycoumarines, leurs substituants peuvent également être engagés dans une liaison hétérosidique. Il existe encore deux autres sous-groupes, les furano- et pyrano-coumarines, créés par prénylation des hydroxycoumarines en C-6 ou C-8 [Bruneton J. 2009].



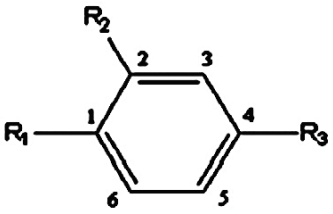
1: $R_1=R_3=R$, $R_2=H$

2: $R_1=R_2=R_3=R$

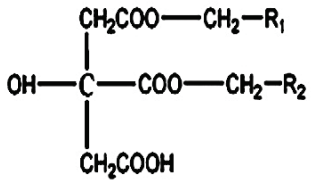


3: Gastrodin

Figure I:12. Structure des parishines B (1) et C (2) [Lin J-H. *et al.* 1996] et de la gastrodine (3).



(1)	$R_1=OH$	$R_2=H$	$R_3=CHO$
(2)	$R_1=OH$	$R_2=H$	$R_3=CH_2OH$
(3)	$R_1=H$	$R_2=H$	$R_3=CH_2OH$
(4)	$R_1=OH$	$R_2=H$	$R_3=CH_2C_6H_5OH$
(5)	$R_1=OH$	$R_2=H$	$R_3=CH_2OC_6H_5CH_2OCH_3$
(6)	$R_1=OH$	$R_2=H$	$R_3=CH_2OH$
(7)	$R_1=OH$	$R_2=OCH_3$	$R_3=CHO$
(8)	$R_1=OH$	$R_2=OCH_3$	$R_3=COOH$



(9) $R_1=R_2=R$

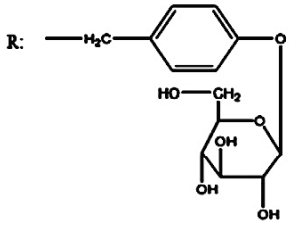
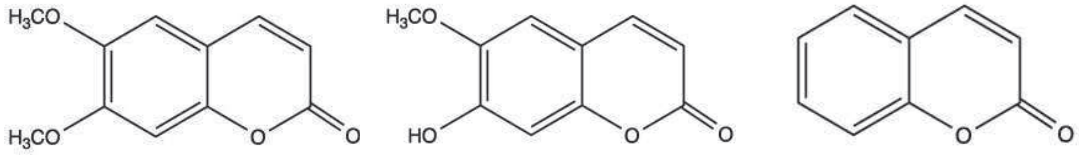


Figure I:13. Structure des dérivés de type hydroxybenzyl identifiés dans *Gastrodia elata* : (1) 4-hydroxybenzaldehyde, (2) 4-hydroxybenzyl alcool, (3) benzyl alcool, (4) bis-(4-hydroxyphenyl) methane, (5) 4(4'-hydroxybenzyloxy)benzyl methyléther, (6) 4-hydroxy-methoxybenzyl alcool, (7) 4-hydroxybenzaldéhyde, (8) acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque, (9) parishine [Jang Y-W. *et al.* 2010].

Les coumarines sont présentes dans un grand nombre de familles botaniques et se trouvent également au sein des Orchidaceae. Les données bibliographiques restent cependant rares. Dans la sous-famille des Orchidoideae, deux coumarines prénylées ont été identifiées dans *Spiranthes sinensis* et ont été nommées sinensines A et B [Peng J-Y. *et al.* 2008]. Chez les Epidendroideae, la coumarine a été isolée dans *Dendrobium aurantiacum* var. *denneanum* [Hossain M.M. 2011]. La scoparone et la scopoletine ont également été retrouvées dans *Dendrobium densiflorum* et présentent *in vitro* une activité anti-agrégante plaquettaire [Fan C. *et al.* 2011] (**Figure I:14**).



Scoparone Scopoletine Coumarine

Figure I:14. Exemples de coumarines isolées à partir des orchidées.

c. Lignanes

Les lignanes sont chimiquement associés aux polymères de lignine, constitutifs de la paroi cellulaire des plantes. On les trouve dans les tissus ligneux, mais leurs formes glycosylées peuvent se retrouver dans les feuilles, les fleurs et les racines. Ce sont habituellement des composés dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones C3 des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1-phénylpropane. Ils correspondent également à des dimères d'alcools ou d'acides cinnamiques [Bruneton J. 2009]. Il existe de très nombreux lignanes, qui diffèrent par le type de liaison entre les deux unités et les modifications qui interviennent après la dimérisation.

Des lignanes ont été répertoriés par exemple dans *Dendrobium chrysanthum, Pleione bulbocodoides* ou *Otochilus fuscus* [Ye Q-H. *et al.* 2004 ; Bai L. *et al.* 1997 et Wang L. *et al.* 2012] (**Figure I:15**). Leur activité biologique n'a pas été évaluée.

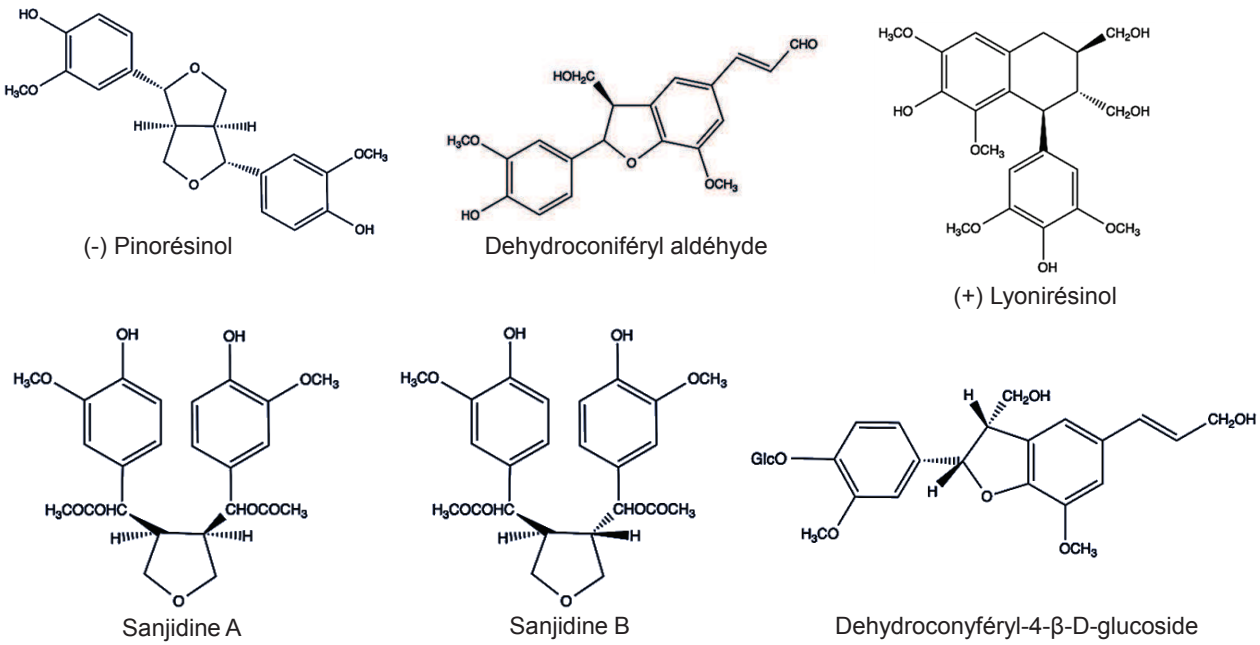
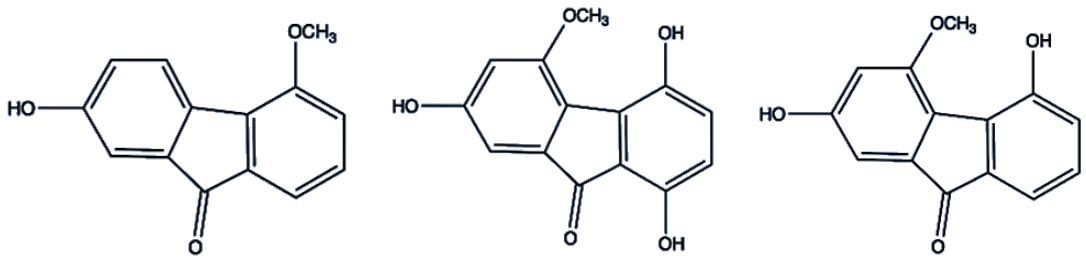


Figure I:15. Exemples de lignanes isolés à partir des orchidées.

d. Fluorénones

Les fluorénones sont des structures phénoliques caractérisées par un noyau central en C5, possédant une fonction carbonylée ou hydroxylée, et couplées à deux autres cycles aromatiques. Leur présence a été détectée au sein des Orchidaceae, notamment dans le

genre *Dendrobium* [Fan C. *et al.* 2001 ; Ye Q-H. *et al.* 2003 ; Yang L. *et al*. 2007 et Zhang X. *et al*. 2007]. Selon Zhang *et al.,* les fluorénones de *D. nobile* possèdent des activités anti-oxydantes. Quelques exemples de structure des fluorénones isolés à partir des orchidées sont présentées sur la **Figure I:16**.



Nobilone Dendroflorine Dengibsine

Figure I:16. Exemples de fluorénones isolées à partir des orchidées.

E. V. Les terpénoïdes

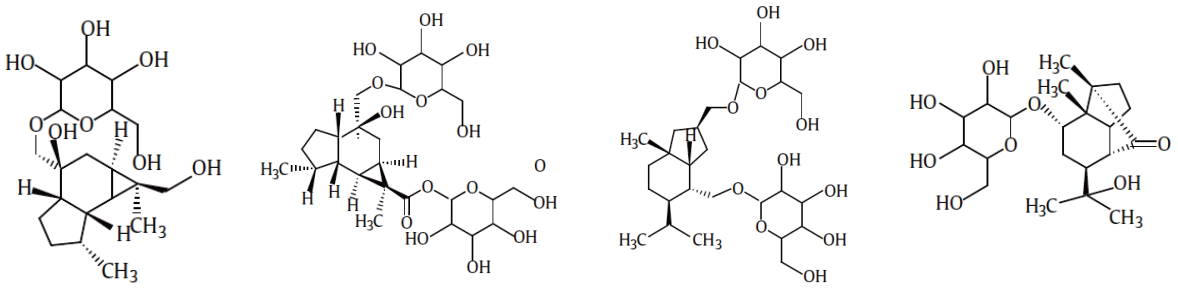
Les terpénoïdes constituent un très vaste ensemble de métabolites secondaires des végétaux. Ce sont principalement des monoterpènes, des sesquiterpènes, des diterpènes, des triterpènes et des phytostérols qui ont été répertoriés au sein de la sous-famille des Epidendroideae.

a. Monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes et triterpènes

Les **monoterpènes**, qui sont issus du couplage de deux unités « isopréniques », sont des composés en C_{10}. Ils sont présents le plus souvent sous forme libre, mais de plus en plus de structures hétérosidiques ont été mises en évidence. Ils peuvent être linéaires ou contenir des cycles. Ils ont été essentiellement retrouvés dans les parties florales de certaines orchidées parfumées, telles que certaines espèces de *Cattleya*, *Dendrobium* ou encore *Vanda*. Les monoterpènes identifiés sont ubiquitaires : menthol, linalol, pinène ou limonène [Lecoufle M. 2004 et Simmler C. 2010].

Les **sesquiterpènes** sont des composés issus de trois unités isoprèniques, donc en C_{15}. Ils sont souvent associés aux monoterpènes dans les plantes aromatiques. Ils peuvent également être acycliques ou contenir des cycles. Certains sesquiterpènes répertoriés dans les orchidées se présentent sous forme glycosylée. Le plus grand nombre a été identifié dans le genre *Dendrobium* avec des propriétés immuno-modulatrices, comme par exemple

le copacamphane, le picrotoxane, le cyclocopacamphane, les dendrosides D et E, isolés à partir de *D. nobile* [Zhang X. *et al.* 2008 ; Ye Q. *et al.* 2002 et Hossain M. M. 2011]. D'autres sesquiterpènes glycosylés ont été répertoriés dans *Dendrobium monoliforme*, mais aussi dans les tubercules de *Cremastra appendiculata* par exemple [Li S. *et al.* 2008 et Shu Y. *et al.* 2004] (**Figure I:17**). L'α-bisabolol a été identifié pour la première fois au sein des orchidées dans *Vanda coerulea* [Simmler C. 2010].



Dendroside A | Dendroside D | Dendronobiloside A | Dendromoniliside A

Figure I:17. Exemples de sesquiterpènes isolées du genre *Dendrobium*.

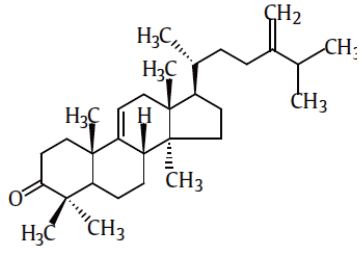
Les **diterpènes** en C_{20} sont beaucoup plus rares au sein des orchidées. Cependant, deux ont été identifiés dans *Ephemerentha loncophylla*, et ont été nommés lonchophylloïdes A et B [Ma G-X. *et al.* 1998]. Une forme hétérosidique est également présente dans les tubercules de *Cremastra appendiculata*, le *ent*-kaurane [Li S. *et al.* 2008].

Des structures **triterpéniques** en C_{30} ont été identifiés notamment dans le genre *Dendrobium*, mais aussi les genres *Pholidota*, *Epidendrum* ou *Agrostophyllum* [Hossain M. M. 2011 ; Bi Z. M. *et al.* 2005 ; Ferreira J. *et al.* 2000]. Selon Ferrira *et al.,* la pholidotine possède des propriétés anti-nociceptives.

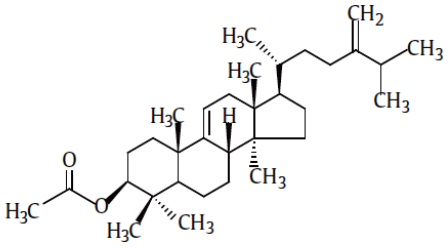
Quelques exemples des structures di- et triterpéniques isolés à partir des orchidées sont présentés sur la **Figure I:18**.

b. Phytostérols

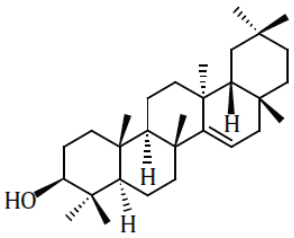
Les phytostérols dérivent structuralement du cycle perhydrocyclopenta [a] phénanthrène, caractéristique du cholestérol. Ils sont formés à partir du squalène par des intermédiaires de synthèse tels que le cycloarténol et le 24-méthylène-cycloarténol, présents dans de nombreux végétaux [Bruneton J. 2009]. Ainsi, des phytostérols ubiquistes,



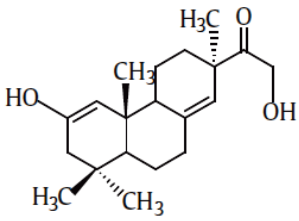
Agrostophyllinone



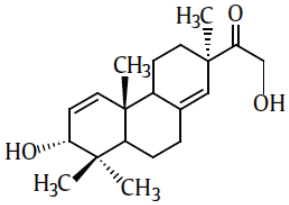
Agrostophyllinol



Taraxerol



Lonchophylloid A



Lonchophylloid B

Figure I:18. Exemples di-(bas) et triterpènes (haut) isolées des orchidées.

constitutifs des membranes cellulaires végétales, tels que le β-sitostérol et le stigmastérol sont également présents dans les Orchidaceae. Ils peuvent être glycosylés ou non.

Le β-sitostérol a été retrouvé dans les tiges de *Vanda coerulea* [Simmler C. 2010]. Des dérivés du type cycloarténol ou cycloarténal ont été identifiés au sein du genre *Maxilaria* [Flach A. *et al.* 2004] et trois hétérosides du cycloartane ont été isolés à partir de *Nervilia fordii* [Wei L-B. *et al.* 2012]. Enfin, des phytostérols originaux nommés dendrostérone, dendrostéroside et ochréasteroside ont été répertoriés dans *Dendrobium ochreatum* [Behr D. *et al.* 1976].

E. VI. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de métabolites secondaires possédant au moins un atome d'azote inclus dans un système hétérocyclique. Ils peuvent être présents à l'état de sels. Majoritairement issus du règne végétal, ils se retrouvent ponctuellement chez certains animaux. Leurs activités biologiques sont variées et reliées à leur grande diversité structurale. Ils sont ainsi classés en différents groupes en fonction du type d'hétérocycle azoté et de l'origine biosynthétique de l'azote. Les précurseurs biosynthétiques des alcaloïdes vrais sont les acides aminés. Un certain nombre d'auteurs distingue également des pseudo-alcaloïdes, dont l'atome d'azote ne dérive pas des acides aminés, et aussi des

proto-alcaloïdes, dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle. Même si cette classification paraît simple, la diversité structurale des alcaloïdes est telle qu'elle n'est pas toujours facile à appliquer [Bruneton J. 2009].

Les deux premiers alcaloïdes retrouvés dans les orchidées ont été la dendrobine et la nobiline, isolés à partir de *Dendrobium nobile* dans les années 30 par Suzuki. Depuis, leur nombre n'a cessé de croître. Björn Lüning a analysé le contenu des alcaloïdes de 525 espèces d'orchidées et a déterminé que les genres les plus concentrés contenant entre 0,01 et 0,1% de leur masse sèche étaient *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, mais aussi *Angraecum, Calanthe, Chysis* et *Elleanthus* [Lüning B. 1964]. C'est d'ailleurs son équipe de recherche qui a publié le plus grand nombre d'études dans une série « Studies on Orchidaceae alkaloids » paru dans Acta Chemica Scandinavica. Le plus grand nombre de ces substances azotées a été caractérisé sans doute dans le genre *Dendrobium*. Plus de 32 alcaloïdes ont été identifiés dans 42 espèces de ce genre [Hossain M. M. 2011]. Nous ne citerons ici que quelques exemples pour illustrer la diversité structurale de ces composés au sein de la sous-famille des Epidendroideae. Ce sont notamment les alcaloïdes pyrrolizidiniques, indoliques et sesquiterpéniques de type dendrobine qui ont été caractérisés. Leurs exemples ainsi que les espèces dans lesquelles ils ont été répertoriés sont résumés dans le **Tableau I:8** et quelques structures sont représentées sur la **Figure I:19**.

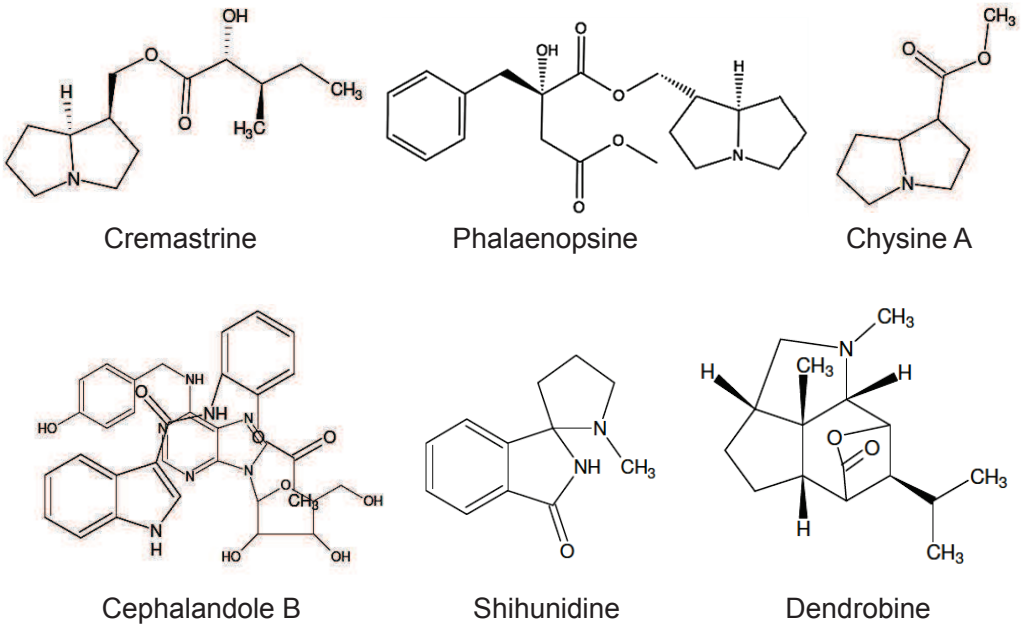


Figure I:19. Exemples d'alcaloïdes identifiés dans les orchidées.

Tableau I:8. Quelques exemples d'alcaloïdes isolés à partir des orchidées.

Type d'alcaloïde	Espèces	Nom du composé	Références
Alcaloïdes pyrrolizidiniques	*Dendrobium crepidatum*	Crepidine Crepidamine Dendrocrepine	[Elander M. *et al.* 1973]
	Phalaenopsis sp. *Phalaenopsis amabilis*	Phalaenopsine	[Frölich C. *et al.* 2006] [Lüning B. *et al.* 1966]
	Liparis nervosa	Nervosine I à VI Paludosine Auriculine	[Huang S. *et al.* 2013]
	Maxillaria grandifolia	Grandifoline	[Lindstrom B. *et al.* 1971]
	Dendrobium primulinum	Dendroprimine	[Blomqvist L. *et al.* 1972]
	Chysis bractescens	Chysine A et B	[Lüning *et al.* 1965]
Alcaloïdes indoliques	*Cephalanceropsis gracilis*	Cephalinone A, B, C et D Cephalandole A, B et C Indirubine Dioxindole-3-acetate Indole-3-carbaldéhyde Acide indole-3-carboxylique Isatane	[Wu P-L. *et al.* 2006] [Jeffrey M.J. *et al.* 2008]
	Dendrobium loddigesii	Shihunine Shihunidine	[Li M. F. *et al.* 1991]
Alcaloïdes de type dendrobine	*Dendrobium nobile* *Dendrobium moniliforme*	Dendrobine	[Kudo Y. *et al.* 1983] [Chen K.K. *et al.* 1935]
	Dendrobium Snowflake « Red Star »	Mubironine A, B et C	[Morita H. *et al.* 2000]

Ces produits naturels sont connus pour leurs activités pharmacologiques marquées, même à faible dose. Ainsi, certains ont été évalués sur des modèles animaux et les études ont permis de mettre en évidence diverses activités de la dendrobine. Des études neuropharmacologiques ont démontré sa capacité d'inhibition de la dépolarisation nerveuse induite par certains neurotransmetteurs, dont le GABA. Les essais ont été comparés à la strychnine et la picrotoxine sur un modèle animal et montrent des effets convulsivants similaires. La nobiline n'a pas montré les mêmes activités que la dendrobine [Kudo Y. *et al.* 1983]. De façon générale, les alcaloïdes de *Dendrobium* sont neuroprotecteurs lors de l'induction des troubles de la mémoire [Li Y. *et al.* 2010].

Chapitre I
Partie II : Introduction du travail présenté

A. Choix des espèces étudiées

A l'issue de différents critères de sélection, tels que la disponibilité, le coût et le respect de la biodiversité, 9 espèces d'orchidées appartenant à la sous-famille des Epidendroideae et en provenance d'Asie, ont fait l'objet d'un criblage phytochimique. Dans le but d'apporter de nouvelles connaissances, nous avons voulu approfondir les études concernant les deux matières premières déjà explorées par Charlotte Simmler. Ainsi, en plus de *V. coerulea* et *V. teres* de la sous-tribu des *Aeridinae*, nous avons considéré les espèces suivantes, présentées dans le **Tableau I:9**:

Tableau I:9. Les espèces d'orchidées sélectionnées pour un criblage phytochimique préliminaire.

Espèce	Tribu	Sous-tribu
Dendrobium chrysotoxum Lindl.	Incertae sedis*	Dendrobiinae
Dendrobium primulinum Lindl.		
Aerides rosea Lodd. ex Lindl. & Paxton	Vandeae	Aeridinae
Acampe papillosa Lindl.		
Acampe rigida (Buch.-Ham. ex Sm.) P. F. Hunt		
Vanda brunnea Rchb. f.		
Vanda denisoniana Benson & Rchb. f.		
Arundina graminifolia (D. Don) Hochr.	Arethuseae	Arethusinae
Thunia alba (Lindl.) Rchb. f.		Coelogyninae

*Appartenance à une tribu incertaine selon les dernières avancées scientifiques

(L'appartenance aux tribus et sous-tribus est basée sur des critères phylogénétiques) [NCBI taxonomy, consulté le 6 août 2013].

Dans un premier temps, nous avons réalisé des extraits dits 'standards', selon le protocole standardisé de LVMH recherche. Il consiste à extraire le végétal sec avec un mélange EtOH/eau 90/10 v/v pendant 30 minutes à reflux. Ce procédé, très universel, nous permet d'extraire un large spectre de composés de différentes polarités et appartenant à différentes familles chimiques, et obtenir ainsi un aperçu sur l'ensemble des métabolites que

les espèces contiennent. Nous avons reçu séparément différentes parties de chaque plante (racines, feuilles, tiges ou mélange des parties aériennes ou des parties souterraines) afin de choisir non seulement les espèces que nous allions étudier, mais également leurs organes respectifs. Ces extraits de chaque espèce et de chaque organe ont été comparés aux extraits standards de *V. teres* et *V. coerulea* par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et chromatographie sur couche mince (CCM), afin de repérer des ressemblances et des différences. Puis, nous avons déterminé d'autres critères de choix afin de retenir les espèces dont la phytochimie allait être explorée. Après la disponibilité immédiate et à plus long terme, le coût et le respect de la biodiversité, nous avons considéré également :

- les rendements d'extraction,
- l'absence de brevets,
- l'absence ou la présence de quelques données dans la littérature scientifique,
- leurs éventuels usages traditionnels,
- les chances d'identifier des molécules de structures originales.

Les meilleurs rendements d'extraction ont été obtenus pour les deux espèces d'*Acampe* (plus de 15%). Aucune espèce de la liste n'a fait l'objet d'un dépôt de brevet. Même si les profils chromatographiques des deux espèces de *Dendrobium* et celle d'*Arundina* ne montrent pas des points communs avec les deux *Vandas* précédemment explorées, ces espèces sont déjà beaucoup décrites dans la littérature (cf. données phytochimiques détaillées dans le chapitre Introduction générale) : il y a donc peu de chances d'identifier des molécules originales. *Dendrobium primulinum, Vanda brunnea et Thunia alba* n'ont pas été disponibles en quantité suffisante lors du démarrage de notre criblage phytochimique. De plus, des études préliminaires de la composition phytochimique de *Vanda brunnea* et *V. denisoniana* ont déjà été réalisées et décrites dans les travaux de thèse de Charlotte Simmler : le profil chromatographique d'un extrait de tiges de *V. brunnea* est comparable à celui des tiges de *V. coerulea*, par la présence de stilbénoïdes communs. Le profil phytochimique d'un extrait de racines est à la fois comparable aux extraits de tiges de *V. teres* et de *V. coerulea*. Les feuilles de *V. denisoniana* concentrent l'acide eucomique et des flavonoïdes. Les racines contiennent un dérivé hydroxybenzyle, probablement de type vandatéroside mais en plus faible teneur. [Simmler C. 2010]. Pour ces différentes raisons, *D. chrysotoxum, D. primulinum, T. alba, V. denisoniana* et *V. brunnea* n'ont pas été retenus pour la suite de nos travaux.

Les extraits des deux espèces d'*Acampe* présentent des profils très comparables entre eux ainsi qu'avec celui de *V. coerulea*. Les feuilles d'*Acampe rigida* contiennent

visiblement quelques composés supplémentaires, qui ont retenu notre attention, car ils semblent absents dans les autres espèces. De plus, cette plante présente une biomasse beaucoup plus importante qu'*A. papillosa*. Dans un souci de respect de la biodiversité, de coût de la matière première et de la disponibilité, nous avons donc privilégié *A. rigida* à *A. papillosa*.

L'extrait d'*Aerides rosea* présentait un profil chromatographique similaire à celui de *Vanda coerulea*, mais plus complexe à des concentrations plus élevées. Les chances d'isoler et d'identifier des dérivés originaux des stilbénoïdes communs avec ceux de *Vanda coerulea* ont donc été augmentées.

Après avoir croisé l'ensemble des critères de sélection fixés, nous avons donc retenu prioritairement deux espèces pour contribuer à leurs explorations phytochimiques:

- ***Aerides rosea*** (tiges) et
- ***Acampe rigida*** (tiges et feuilles)

B. Les objectifs de cette étude

Nous nous sommes fixés un certain nombre d'objectifs pour ces trois années de recherche. Ils peuvent être divisés en deux catégories, d'une part des objectifs généraux et d'autre part des objectifs spécifiques.

Les **objectifs généraux** concernent les deux nouvelles espèces, *Aerides rosea* et *Acampe rigida*. Notre but premier est d'apporter des connaissances fondamentales sur leur phytochimie, caractériser des constituants majeurs, pouvant être qualifiés de marqueurs phytochimiques de chaque espèce voire de la sous-tribu à laquelle elle est chacune rattachée. Ces objectifs à caractère académique doivent nous permettre de mieux comprendre à plus long terme les originalités métaboliques des orchidées et de cibler ainsi la recherche de ce type de composés spécifiques.

Les **objectifs spécifiques** concernent les deux espèces de *Vanda* étudiées auparavant au laboratoire : *V. coerulea* et *V. teres*. Notre étude consistait à quantifier leurs marqueurs dans différents échantillons soumis à différents facteurs environnementaux. Au vu des activités biologiques décrites par Charlotte Simmler, il s'agissait également d'optimiser à terme les stratégies de prélèvement de manière à bénéficier de matières

premières de qualité, riches en molécules bioactives, tout en apportant des informations supplémentaires potentiellement valorisables (ex : améliorer la traçabilité de lots industriels).

Nous nous sommes également penchés de plus près sur *Vanda teres* en cherchant à optimiser des méthodes de purification de grandes quantités de molécules à haute valeur ajoutée afin de pouvoir explorer de manière approfondie leurs potentiels biologiques.

Pour chacun de ces objectifs, nous avons eu le souci d'utiliser une stratégie différente ainsi que de faire appel à des techniques de phytochimie innovantes.

C. Les techniques utilisées dans cette étude

Dans cette section, il nous a paru important de présenter certaines techniques analytiques et préparatives utilisées pour atteindre nos objectifs, afin de mieux comprendre leurs principes et leur intérêt dans cette étude. En effet, nous avons employé des systèmes des plus modernes qui se sont développées dans les dernières décennies et qui sont devenus performantes et particulièrement adaptées dans le domaine de l'analyse, la purification et l'identification des substances naturelles. Nous nous sommes ainsi intéressés à l'innovation technologique et méthodologique qui est aujourd'hui essentielle aux progrès scientifiques. Nous allons donc présenter succinctement leur fonctionnement et leur intérêt pour notre travail, ainsi que pour certaines, les applications aux produits naturels décrites dans la littérature scientifique.

C. I. Extraction en phase solide

L'extraction en phase solide (ou SPE-*Solid Phase Extraction*) est une technique de séparation et fractionnement qui est utilisée pour préparer et/ou purifier des échantillons en vue de l'établissement d'un profil chromatographique par CCM ou CLHP ou toute autre technique de chromatographie.

Cette technique de séparation utilise l'affinité des composés pour un mélange liquide (aussi appelé phase mobile) ou pour une phase solide constituant la phase stationnaire. Elle peut être utilisée dans des objectifs différents [Hostettmann K. *et al*. 1997] :

a) retenir les composés d'intérêt sur la phase stationnaire pendant que les composés non désirés s'éluent,
b) à l'inverse, éluer les composés d'intérêt pendant que les non désirés restent adsorbés sur la phase stationnaire,

c) ou tout simplement préparer des fractions enrichies en fonction de leur affinité pour les deux phases.

L'échantillon est déposé au-dessus de la phase stationnaire tassée dans une cartouche SPE. Différents volumes des cartouches et poids des phases sont utilisés en sorte que la masse de l'échantillon ne dépasse pas 10% du poids de la phase stationnaire. Puis, l'échantillon dilué dans le mélange de la phase mobile de départ est élué plusieurs fois avec les solvants ou des mélanges de solvants appropriés, à l'aide du vide. L'éluat est ensuite récupéré dans les fractions d'intérêt. Cette technique est représentée de façon schématique sur la **Figure I:20**.

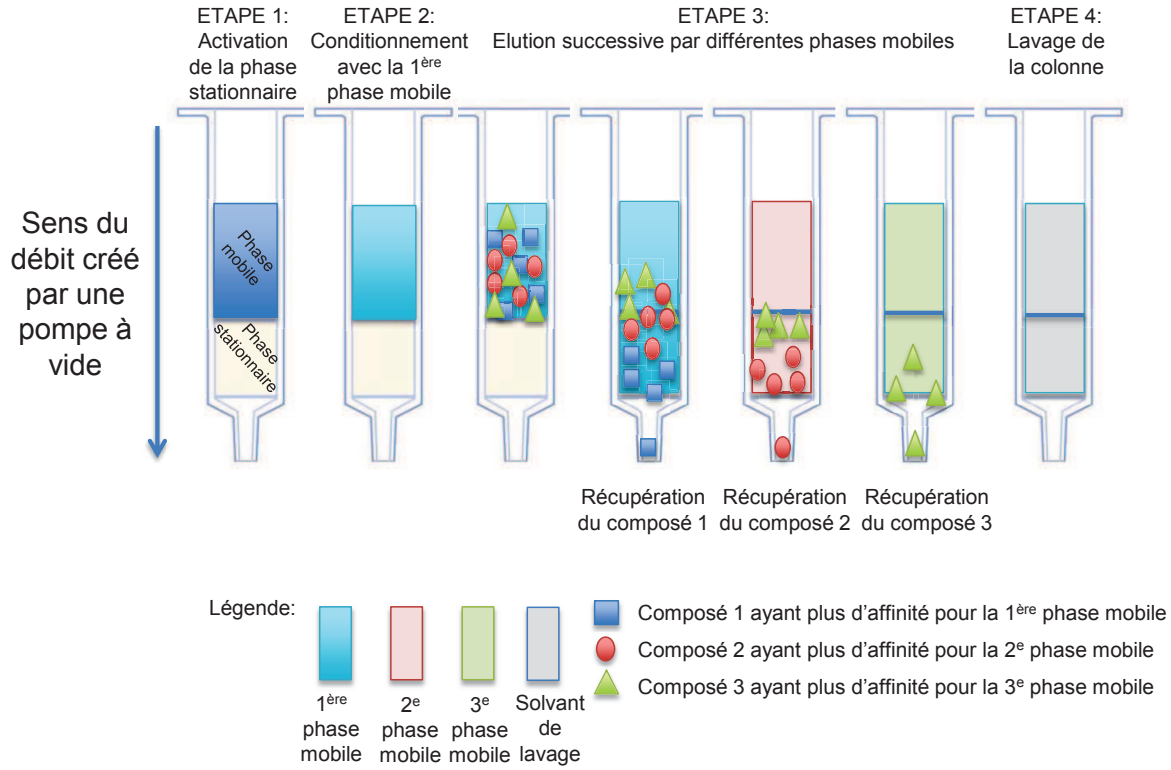


Figure I:20. Schéma représentant les étapes d'un fractionnement par SPE (schéma personnel)

La séparation d'un mélange est constituée de plusieurs étapes clé :

Etape 1 : Activation de la phase stationnaire et élimination des impuretés éventuelles provenant de la fabrication. Pour une phase inverse (C18), cette dernière est mouillée avec un solvant organique d'abord, puis avec de l'eau. Une phase normale (SiOH) est directement mouillée par le solvant le plus apolaire qui constitue la première phase mobile.

Etape 2 : Conditionnement de la phase stationnaire en passant 2 à 3 volumes de cartouche de la première composition de phase mobile.

Etape 3 : Dépôt de l'échantillon à séparer, dissous dans la première phase mobile, au-dessus de la phase stationnaire. Il est ensuite élué en changeant la composition de la phase mobile. Les composés sont séparés en fonction de leur affinité pour la phase mobile : ceux qui n'ont aucune ou peu d'affinité avec le solvant d'élution restent adsorbés sur la phase stationnaire, puis sont décrochés par une phase mobile adaptée.

Etape 4 : Lavage. Cette étape consiste à éliminer tout composé d'intérêt ou impureté restant adsorbés sur la colonne.

Une des premières applications de cette technique aux produits naturels date des années 80 du siècle dernier, où elle a été utilisée pour réaliser une purification préliminaire d'un extrait de mollusque *Philinopsis speciosa*. Le 2-pyridine substitué avec une chaîne C_{16}-alkedienone a été pré-purifié sur une cartouche en phase inverse (C18) avant d'être isolé par CLHP semi-préparative [Coval S. J. *et al.* 1985]. Dans les années 90, Redl K. *et al*. ont éliminé les chlorophylles présentes dans un extrait lipophile de *Bidens campylotheca* (Asteraceae), également en utilisant une SPE en phase inverse [Redl K *et al.* 1994]. Sur SPE en phase silice, du lycopène a été séparé des autres caroténoïdes présents dans un extrait à l'éther de pétrole préparé à partir d'une purée de tomate [Hakala S. H. *et al.* 1994].

La SPE est de plus en plus utilisée en routine dans divers laboratoires. Nous l'avons utilisé notamment pour pré-purifier différents échantillons afin de retenir les composés non désirés sur la phase stationnaire avant de les purifier par CLHP semi-préparative ou par chromatographie de partage centrifuge (CPC). Cette étape nous permet de protéger le matériel (notamment les colonnes chromatographiques pour éviter leur encrassement), tout en améliorant la solubilité de nos échantillons dans une plus grande proportion d'eau. Un système automatisé de cartouches SPE est également intégré dans le couplage des techniques chromatographiques aux techniques spectrales, comme le LC-MS-SPE-RMN que nous allons évoquer également par la suite.

C. II. Couplage HPLC-ESI-HRMS/MS

Cette méthode d'analyse connecte la chromatographie liquide à haute performance (CLHP ou HPLC) à un spectromètre de masse (SM ou MS) et est devenue une technique utilisée en premier lieu pour l'élucidation structurale ainsi que pour la quantification de produits naturels. La première étape de ce système couplé consiste à séparer des substances de l'échantillon sur une colonne chromatographique qui sont très souvent d'abord détectées par un détecteur classique, du type UV-DAD (ultra-violet et détecteur à

barrette de diode). Cette première analyse offre une première information sur la nature des composés possédant un chromophore. Certains spectres UV sont caractéristiques d'une famille chimique, mais ne suffisent pas pour une information structurale complète. La deuxième étape consiste donc à détecter ces substances par spectrométrie de masse, une technique physique d'analyse mesurant la masse du composé d'intérêt. Comparée à d'autres types de détection, la SM permet non seulement de fournir une information précise sur la structure chimique des composés, connues ou pas, mais offre également une excellente sensibilité et sélectivité. En combinant les données obtenues par une détection DAD, la HPLC-MS fournit *on-line* une information structurale pour chaque pic du chromatogramme à partir de quelques microgrammes d'échantillon et dans un temps d'acquisition très court [Wu H. *et al.* 2013 et Marston A. 2007].

Le principe de la spectrométrie de masse est apparu au début du siècle dernier. L'échantillon est transformé en phase gazeuse ionisée et les ions ainsi créés sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge (*m/z*). On obtient ainsi un spectre de masse qui représente le rapport *m/z* des ions détectés selon l'axe des abscisses et l'abondance relative de ces ions selon l'axe des ordonnées. Les principales étapes sont donc la transformation de l'échantillon en gaz, l'ionisation, le transfert des ions créés vers l'analyseur de masse, la séparation des ions par ce dernier et leur détection. Un vide poussé (10^{-4} à 10^{-8} Pa) est nécessaire pour empêcher la collision des ions avec des gaz résiduels. L'ionisation des molécules se fait généralement par impact d'électrons ou par une réaction chimique [Klouda P. 2003].

Le couplage de la CLHP à la SM a été réalisé dans les années 1980, bien après celui employant la chromatographie gazeuse (CPG ou GC). Il a d'abord fallu résoudre l'incompatibilité entre ces deux techniques en créant une interface permettant de volatiliser l'échantillon dans une phase mobile souvent modifiée par une addition de produits chimiques améliorant la performance de l'analyse chromatographique. Ces produits doivent être volatils, comme l'acide formique ou l'acide acétique couramment utilisés [Korfmacher W. A. 2005]. Il existe différents types d'ionisation qui servent d'interface entre les deux méthodes d'analyse. Ceux qui sont les plus couramment utilisés, sont l'électrospray (terme anglais pour désigner l'électro-nébulisation, abréviée ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) [Marston A. 2007]. Le premier est souvent utilisé pour des molécules plutôt polaires, tandis que le second est adapté pour des composés de polarité moyenne [Wu H. *et al.* 2013].

Dans cette étude, nous avons utilisé majoritairement la source ESI, disponible au laboratoire. Ce mode d'ionisation douce, qui forme majoritairement des ions moléculaires, comprend trois étapes clés : la nébulisation à pression atmosphérique d'une solution dans un champ électrique, conduisant à des gouttelettes chargées, suivie de l'évaporation du solvant et de l'introduction des ions formés dans l'analyseur de masse [Ho C. S. *et al.* 2003]. Les gouttelettes de solutés sont formées à l'extrémité d'un capillaire fin, porté à un potentiel électrique élevé puis nébulisées à l'aide d'un gaz inerte. L'intensité du champ électrique leur confère une densité de charges importante. A l'aide d'un courant d'azote chauffé, les gouttelettes s'évaporent progressivement, leur densité de charge devenant trop importante, les gouttelettes explosent en se divisant jusqu'à ne laisser que le soluté chargé ou multi-chargé. La fragmentation obtenue dans une analyse ESI-MS ou HPLC-MS/MS est dépendante, entre autres, du type de spectromètre de masse, du mode d'ionisation (positif ou négatif) ainsi que de l'énergie de collision. Il est donc difficile d'obtenir des « empreintes » caractéristiques de chaque composé, comme c'est possible en GC-MS/MS. Par conséquent, la base de données ESI-MS/MS existante du NIST05 (National Institute of Standards and Technology, USA) contient seulement 2 000 composés [Konishi Y. *et al.* 2007].

Afin d'analyser les ions, différents types d'analyseurs peuvent être employés. Dans notre cas, le système est équipé d'un analyseur de type quadrupôle. Pour obtenir une information structurale complémentaire et augmenter la sélectivité et la sensibilité pour une analyse quantitative par exemple, un ion d'une certaine masse peut être choisi pour être fragmenté dans une cellule de collision. La masse est analysée par un second analyseur, dans ce cas on parle de la spectrométrie de masse en tandem. Dans notre cas le second analyseur est un analyseur à temps de vol (ToF time-of-flight) et la combinaison des deux résulte donc en un système hybride Q-ToF et permettant d'obtenir un spectre SM/SM avec une efficacité comparable au triple quadrupôle. Un instrument équipé d'un ToF opère généralement avec des grandes énergies cinétiques des ions (5-20 keV), un paramètre important pour obtenir des spectres MS/MS dans un laps de temps plus court (10^{-5} secondes) [Glish G. L. *et al.* 2008]. Dans ces conditions, l'analyse nous permet de déterminer également la formule brute de chaque pic chromatographique : il s'agit de la spectrométrie de masse haute résolution.

Nous allons utiliser ici l'abréviation anglaise que l'on peut rencontrer le plus souvent dans la littérature scientifique et on peut ainsi désigner le système employé dans cette étude comme HPLC-ESI-QToF-MS/MS et la technique comme **HPLC-ESI-HRMS/MS**.

Grâce aux capacités de ce couplage, son utilisation est plus qu'incontournable dans le domaine de l'analyse des substances naturelles. L'analyse **qualitative** permet de

confirmer l'identité des composés connus et déjà répertoriés, et élucider également la structure de nouvelles substances. Le processus complet d'extraction, de purification et d'isolement est chronophage et laborieux au risque d'identifier des composés connus. La HPLC-MS permet de distinguer rapidement, par rapport à des composés déjà connus, les autres molécules d'intérêt à partir d'une information déduite de leur fragmentation. La combinaison d'analyses par HPLC-MS/MS haute résolution à l'aide du Q-ToF permet d'obtenir des fragments d'ions définis avec une haute précision de masse, ce qui est précieux dans une optique de déréplication.

Puisque les matières premières végétales subissent des variations de leur contenu en fonction de différents paramètres, comme la saison, le lieu de la récolte ou encore le stade végétatif, il est important de pouvoir **quantifier** les ingrédients actifs de certaines drogues. L'analyse doit être spécifique, sensible et précise et le développement de la méthode rapide, pour éviter d'avoir recours à beaucoup de matières premières végétales, parfois non disponibles en grandes quantités. La HPLC-ESI-HRMS/MS répond donc à tous ces critères, car la limite de détection pour une quantification se situe entre 0,01 et 100 ng/mL La fragmentation MS/MS permet notamment de repérer les composés à doser [Wu H. *et al.* 2013].

En raison de ses nombreux avantages, nous avons appliqué cette technique couplée, pour résoudre plusieurs de nos problématiques :

1. Pour créer une méthode de déréplication (terme expliqué dans le chapitre suivant) afin de déterminer de façon qualitative la présence ou l'absence de marqueurs précédemment isolés à partir de *Vanda coerulea* et *Vanda teres*.
2. Pour déterminer les formules brutes des composés isolés à partir d'autres espèces d'orchidées sélectionnées pour réaliser leur analyse phytochimique.
3. Pour quantifier des marqueurs de tiges de *V. coerulea* et *V. teres* et mettre en évidence leur variation en fonction de différents paramètres : provenance des échantillons et stade végétatif.

C. III. Couplage HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN

Les matières premières végétales constituent des ressources précieuses dont il faut préserver la biodiversité. Beaucoup d'espèces botaniques sont en voie d'extinction, notamment en raison de la dégradation de leur environnement (pollution, déforestation, pillage etc.). Hormis pour les espèces cultivées, il est parfois difficile de s'approvisionner de

grandes quantités (plusieurs dizaines de kg de matière sèche) de plantes dans un but d'investigations chimique et/ou biologique. Le développement de techniques couplées est donc devenu indispensable en Pharmacognosie, surtout lorsque les matières premières sont onéreuses et difficilement disponibles.

Nous avons constaté les nombreux avantages et l'intérêt du couplage HPLC-MS dans le domaine des produits naturels, surtout dans une stratégie de déréplication ou dans le but de réaliser des études quantitatives. Même si cette technique fournit déjà un nombre important d'informations structurales, l'élucidation complète est souvent nécessaire par la résonance magnétique nucléaire (RMN ou NMR), en particulier pour les composés non encore répertoriés dans les bases de données de produits naturels. Le processus complet de l'isolement de produits purs peut prendre plusieurs mois et nécessite des quantités de matière première non négligeables, soit entre un et cinq kilogrammes de masse sèche. En règle générale, il est nécessaire d'obtenir quelques milligrammes de molécule purifiée pour une analyse spectrale, comme la RMN. Si l'on s'intéresse à l'ensemble du métabolome d'un végétal (produits majoritaires biosynthétisés par la plante, accompagnés de ses métabolites secondaires mineurs), les techniques classiques en phytochimie s'avèrent vite dépassées. L'enjeu de coupler les techniques chromatographiques avec différents types de détection aux méthodes spectrales est donc énorme, en particulier pour élucider la structure des métabolites minoritaires susceptibles d'être porteurs d'une activité biologique intéressante.

Les premiers systèmes de couplage connectaient directement la CLHP à la RMN, parfois en y associant un spectromètre de masse pour obtenir également des informations sur la masse des composés d'intérêt. Il existe différents modes de transfert entre les deux techniques :

- « On-flow »
- « Stop flow »
- « Loop storage »
- Transfert via des cartouches SPE.

Les trois premiers modes sont des couplages directs. Le « On-flow » consiste à séparer les composés d'un mélange par CLHP, élués par des solvants deuterés en continu, sans arrêter le débit des pompes. Ainsi, le temps d'acquisition que chaque composé passe dans la cellule mesure en flux de la RMN est limité, ce qui affecte considérablement la qualité des spectres obtenus et restreint également la quantité détectable à plus de 10 µg pour des composés entre 300 et 500 de masse moléculaire [Jaroszewski J. W. 2005a]. L'avantage principal est qu'il n'y a pas besoin de détection UV à la sortie de CLHP. En

revanche, ce type d'analyse est cher en raison de l'utilisation des solvants deuterés pour la séparation chromatographique. De plus, seule une basse sensibilité est obtenue pour des analyses bidimensionnelles et l'investigation des déplacements chimiques du carbone (^{13}C) n'est pas possible. Une des premières applications à l'analyse de produits naturels date des années 1990. Un mélange de limonoïdes a été analysé sur une colonne de 250 x 4,6 mm en phase inverse avec un spectromètre RMN de 500 MHz et une sonde de 60 µL [Johnson S. *et al.* 1994]. D'autres études appliquées aux produits naturels ont été reportées dans la littérature scientifique, incluant par exemple les analyses de xanthones de *Swertia calycina* (Gentianacées), d'isoflavanones d'*Erythrina vogelii* (Fabacées), de lactones sesquiterpéniques de *Vernonia fastigiata* (Asteracées), de lignanes d'*Orphea enneandra* (Annonacées) ou encore d'alcaloïdes d'*Erythrotoxuylum vacciniifolium* (Erythroxylacées) [Wolfender J-L. *et al.* 1997; Queiroz E. F. *et al.* 2002; Vogler B. *et al.* 1998; Cavin A. *et al.* 1998 et Zanolari B. *et al.* 2003].

Le mode « stop-flow » quant à lui apporte des améliorations dans l'acquisition des spectres bidimensionnels, car après détection d'un pic chromatographique, les pompes sont arrêtées afin de laisser le temps d'acquisition nécessaire pour l'obtention d'un spectre RMN. Le reste du mélange reste ainsi dans la colonne chromatographique. L'avantage principal de ce système est la possibilité d'obtenir des spectres 2D avec un bon rapport signal sur bruit, mais le fait d'arrêter le débit du mélange éluant entraîne un phénomène de diffusion des composés restés dans la colonne. Certains pics s'élargissent et le volume de solvant nécessaire à leur totale élution dépasse le volume de la cellule de la sonde. Ils peuvent ainsi contaminer les composés élués avant et après [Jaroszewski J. W. 2005a]. Le coût d'analyse lié à l'utilisation de solvants deutérés, persiste. Les atouts de cette technique pour obtenir des spectres 2D ont été notamment étudiés par Birgmann G. *et al*. (1998a, b ; 1999a, b, c ; 2001 et 2002). Plusieurs applications pour identifier des taxanes et des lignanes dans les genres *Taxus* et *Torreya* (Taxacées) [Schneider B. *et al.* 1998 et Zhao Y. et al., 1999], des dérivés d'acide quinique dans *Fagara zanthoxyloides* (Rutacées) [Ouattara B. *et al.* 2004], des bétalaïnes dans *Hylocereus polyrhizus* (Cactacées) [Stintzing F. C. *et al.* 2004], des flavonoïdes dans l'extrait de *Trifolium pratense* (Fabacées) [De Rijke E. *et al.* 2004] ou encore des phthalides de *Ligusticum chuanxiong* (Apiacées) [Zschocke S. *et al.* 2005] ont été publiées.

Afin de remédier aux inconvénients provenant des modes « on/stop-flow » et notamment leurs impacts négatifs sur la séparation et la résolution des spectres, une interface permettant de stocker les pics individuels dans une boucle capillaire a été développée (« loop storage »). Chaque pic peut ensuite être transféré vers la RMN. Les

boucles sont lavées après chaque passage de molécules, ce qui évite des contaminations croisées. Cependant, en attendant l'élution vers la cellule de la sonde RMN, un composé peut être stocké longtemps au risque de se dégrader. Cette technique n'est donc pas adaptée aux produits naturels instables. Malgré une bonne sensibilité et une résolution correcte, ce type de couplage reste toujours très cher à cause du recours aux solvants deutérés. Peu d'applications aux produits naturels ont été répertoriées, car le risque de dégradation des substances naturelles dans la boucle capillaire est trop grand. Il a cependant été utilisé pour analyser des échantillons alimentaires liquides [Gill A. M. *et al.* 2003; Duarte I. F. *et al.* 2003] ou les extraits de pomme [Lommen A. *et al.* 2000] ou encore des lactones sesquiterpéniques de Zaluzania grayana (famille des Compositées) [Spring O. *et al.* 1995].

La technologie la plus récente dans les systèmes couplés permettant de remédier à tous les inconvénients précédemment cités, consiste à placer une interface contenant des cartouches d'extraction en phase solide miniatures sur lesquelles chaque pic chromatographique, élué avec des solvants protonés, est piégé. Pour chaque composé, le solvant d'élution est éliminé par séchage à l'azote, puis ces composés sont élués avec des solvants deutérés et amenés directement vers la sonde RMN. Un collecteur de fractions peut être placé à la sortie du spectromètre RMN pour récupérer quelques microgrammes de chaque composé analysé. On obtient ainsi une bonne qualité des spectres mono- et bidimensionnels avec des bons rapports signal sur bruit et sans risque de dégradation des produits retenus sur les cartouches SPE. De plus, chaque produit peut être concentré sur la cartouche en utilisant un "multi-piégeage", ce qui permet d'obtenir des spectres avec une excellente résolution. Le coût de l'analyse est diminué grâce à l'utilisation minimale de solvants déprotonés. La première étude publiée utilisant ce système décrit l'identification de quelques flavonoïdes, de l'acide rosmarinique et du carvacrol dans un extrait d'origan [Exarchou V. *et al.* 2003]. Depuis, les applications de ce type de couplage aux produits naturels ne cessent de se multiplier, même si elles sont encore beaucoup moins nombreuses que celles utilisant les techniques précédentes. L'efficacité de ce système a ainsi été démontrée pour un grand nombre de classes chimiques de produits naturels incluant les polyphénols (flavonoïdes et lignanes par ex), les iridoïdes, les terpénoïdes ainsi que les alcaloïdes [Jaroszewski J. W. *et al.* 2005b ; Miliauskas G. *et al.* 2005 ; Seger C. *et al.* 2005 ; Clarkson C. *et al.* 2005 ; Lambert M. *et al.* 2005 ; Wang C. Y. *et al.* 2005 ; Christophoridou S. *et al.* 2005].

Aucun de ces différents systèmes de couplage n'a jamais été appliqué aux orchidées. C'est le dernier mode utilisant les cartouches SPE qui a été utilisé dans cette étude. Il nous a

servi à caractériser en particulier des molécules minoritaires dans nos extraits, que nous n'aurions pas pu isoler par des techniques semi-préparatives en quantité suffisante pour réaliser toutes les analyses spectroscopiques nécessaires à leur identification.

Le couplage utilisé dans cette étude comprend une chromatographe HPLC (Agilent 1200 HPLC system) avec un détecteur DAD, un spectromètre de masse (Bruker Esquire HCT Ultra MS instrument), un système SPE (Spark Holland Prospekt 2), un détecteur UV mono-longueur d'onde (Agilent technologies), un spectromètre RMN 500 MHz (Bruker Avance III) avec deux sondes disponibles, une capillaire d'un volume actif de 10 µL (capNMR de Protasis) et une autre de 30 µL (LC-SEI de Bruker), et enfin un collecteur de fractions (ISCO Foxy R1 Teledyne). Ce système est schématiquement représenté sur la **Figure I:21**.

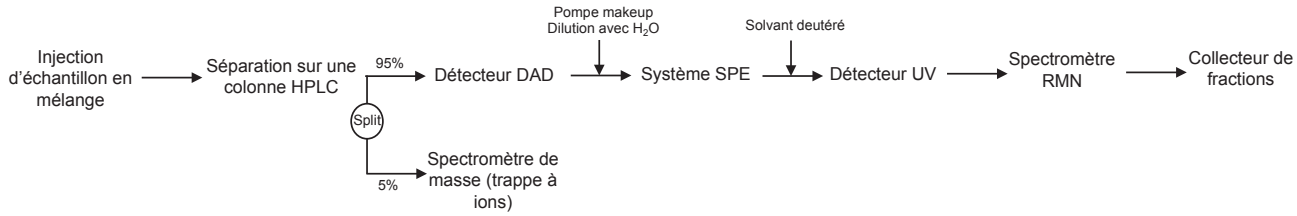


Figure I:21. Schéma représentant le système couplé LC-DAD-MS-SPE-UV/RMN utilisé dans cette étude (schéma personnel).

Afin de mener les différentes analyses, chaque étape du système doit être optimisée, commençant par la séparation chromatographique. Après la sélection d'une colonne adaptée, un gradient d'élution est choisi afin de faire un compromis entre sa durée et une séparation optimale pour les composés d'intérêt. La CLHP est couplée à un détecteur à barrettes de diode qui balaie les longueurs d'onde dans la lumière UV-visible (200-780 nm). A la sortie de la colonne, l'éluat est séparé par un système de "split". Seulement 5% de l'échantillon sont envoyés vers le spectromètre de masse afin d'obtenir en plus des données UV, des données MS avec les spectres de masse de chaque composé de l'échantillon injecté. L'analyseur de masse est de type trappe à ions et permet de déterminer seulement la masse de chaque composé élué mais non sa formule brute. Celle-ci est déterminée par une analyse du mélange par HPLC-ESI-HRMS/MS sur le système présenté auparavant. 95% de l'échantillon sont élués vers le système SPE. La taille et le type des cartouches sont déterminés en fonction de la polarité des composés d'intérêt. Les deux signaux, profils UV et MS, peuvent être utilisés pour sélectionner les composés à piéger. L'éluat est dilué en continu avec de l'eau à la sortie de la colonne CLHP par une pompe additionnelle "make-up". Cette étape sert à augmenter leur pouvoir de rétention afin que les composés restent

accrochés sur la phase stationnaire de la cartouche SPE et puissent être concentrés au fur et à mesure d'un "multi-piégeage". Cette étape est surveillée par un deuxième détecteur UV qui permet de vérifier la rétention de chaque analyte sur la cartouche et qu'un relargage prématuré n'a pas eu lieu. Chaque composé est ensuite élué individuellement vers la sonde RMN. Après une acquisition des spectres mono- et bidimensionnels, les molécules d'intérêt sont collectées dans des tubes de 1,5 mL grâce à un collecteur de fraction. Tout le système est piloté par une seule unité informatique centrale.

Le détail de chaque analyse sera reporté dans les chapitres respectifs concernant les espèces d'orchidées sélectionnées.

C. IV. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)

La CPC est une technique chromatographique à la fois analytique et préparative. Tout comme la CLHP, elle est basée sur la séparation de composés présents en mélange en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire ou la phase mobile. La différence est que la phase stationnaire n'est pas solide, mais que les deux phases sont liquides. Cette technique fonctionne donc sur le principe d'un partage liquide/liquide, en utilisant des mélanges biphasiques constitués de plusieurs solvants non miscibles.

Le système d'une CPC est construit de la même manière qu'une CLHP: des pompes, un injecteur, un détecteur et un collecteur de fractions. Le cœur d'un chromatographe liquide est la colonne dans laquelle a lieu la séparation. La différence entre ces deux techniques chromatographiques est la nature de la phase stationnaire. En CPC, les deux phases étant liquides et non miscibles, l'une est choisie comme phase mobile dans le but d'éluer l'échantillon, l'autre fait office de phase stationnaire et est maintenue contre les parois de la colonne par une force centrifuge. La phase mobile entraîne les composés en sortie de colonne alors que la phase stationnaire les retient à l'intérieur. Les deux phases peuvent être inversées à tout moment, lorsque le système est équipé d'une vanne à quatre voies. Il est ainsi possible de changer le sens de l'élution et de travailler soit en mode ascendant (dans ce cas, la phase mobile est la phase supérieure du système biphasique) ou en mode descendant (dans ce cas, c'est l'inverse : la phase mobile constitue la phase inférieure).

Il existe deux modes de fonctionnement des appareils qui diffèrent par le type de mouvement auquel est soumise la colonne:

- Le premier, développé par Yoichiro Ito, repose sur un équilibre **hydrodynamique**. Le mouvement est engendré par la rotation de la colonne autour de son axe lequel tourne simultanément autour d'un axe central, comme le mouvement planétaire. Deux forces s'exercent sur cette colonne, une force gravitationnelle constante et une force rotationnelle, variant selon le point considéré de la colonne. Le champ de gravité appliqué crée ainsi une force de type vis d'Archimède qui entraîne les objets présents dans la colonne d'une extrémité à l'autre. Les systèmes qui fonctionnent dans ce mode à haute vitesse sont appelés **HSCCC** (high speed countercurrent chromatography) [Hinfray J. *et al.* 1998].

- Le deuxième système, développé par Kanichi Nunogaki, met en œuvre un équilibre **hydrostatique**. Dans ce cas, la colonne peut être considérée comme un rotor avec un design spécial à l'intérieur qui tourne autour d'un axe central. Dans les appareils récents, la colonne est en fait constituée d'un empilement de disques contenant des milliers de cellules reliées entre elles par des capillaires. La rotation de la colonne est maintenue par une force centrifuge constante qui permet la rétention de la phase stationnaire grâce à la géométrie spécifique des cellules (**Figure I:22**).

  C'est ce deuxième système que nous avons utilisé dans notre étude.

L'effet chromatographique au sein d'une colonne CPC peut être facilement expliqué sur un exemple d'un système biphasique. Par exemple, mettons un volume d'eau et de n-butanol dans une ampoule à décanter, secouons et attendons l'équilibre. La phase supérieure est majoritairement composée de n-butanol alors que la phase inférieure renferme majoritairement de l'eau. Si un composé A est dissout à une concentration [A] dans le système biphasique composé d'un même volume des deux phases (1 mL chacune), après agitation de ces deux phases puis décantation, on constate que ce composé A se répartit dans les deux phases. A l'équilibre, à une température donnée, le rapport des concentrations (respectivement [A] dans la phase inférieure et [A] dans la phase supérieure, avec [A] = [A]inf + [A]sup) permet de calculer un coefficient de partage : Kd = [A]stat / [A]mob.

Si ce Kd est proche de 0, cela signifie que le composé A est complètement dissout dans la phase mobile et qu'il ne sera donc pas retenu par le système biphasique. Si le Kd est trop élevé, la molécule sera entièrement retenue par la phase stationnaire. Une séparation optimale de plusieurs composés en mélange, est obtenue avec un Kd compris entre 0,5 et 5. Le système de solvants adéquat est donc déterminé en fonction des Kd de toutes les molécules à séparer (**Figure I:23**) [Armen instrument].

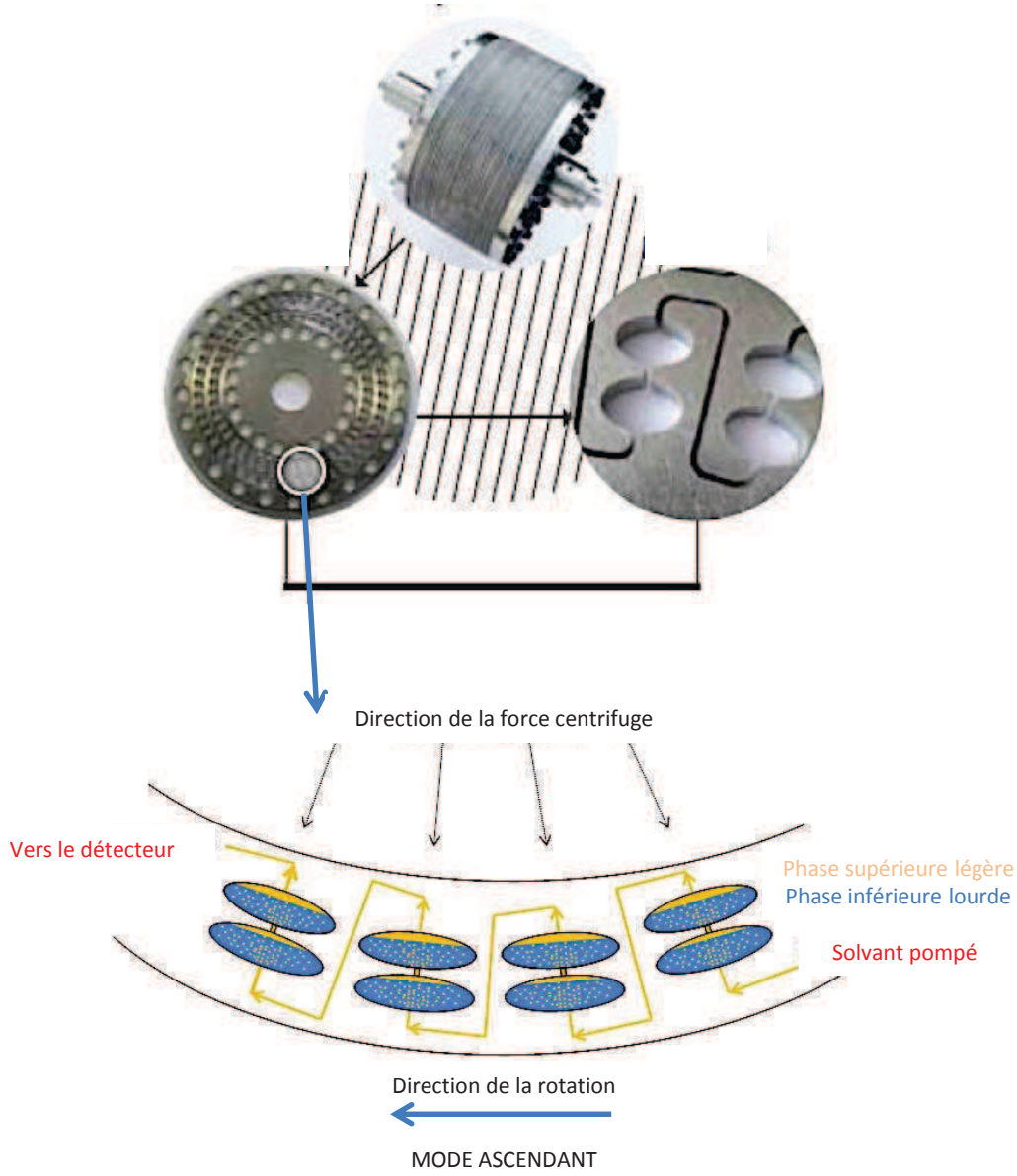


Figure I:22. Détail d'une colonne CPC (schéma reproduit avec la permission d'Armen instrument).

La CPC peut être une bonne alternative à des systèmes de chromatographie liquide classiques. Elle peut être ainsi utilisée pour pré-fractionner un extrait complexe, mais également comme une dernière étape de purification pour obtenir des composés purs. Les champs d'applications de cette technique sont vastes et les avantages nombreux, notamment dans le domaine des substances naturelles :

- Pas de nécessité de changer de colonne en fonction de la phase stationnaire

- Caractère économique en terme de solvants qui peuvent être de qualité technique et non analytique
- Débit d'élution élevé donc rapidité d'analyse
- Haute performance : la pureté des composés isolés peut être supérieure à 99%, avec des bons rendements
- Pas de perte d'échantillon
- Pas de dénaturation, pas d'adsorption irréversible sur une phase stationnaire solide
- Séparation / purification de tout type de composés (ioniques, chiraux, polaires, apolaires ou de polarités extrêmes)
- Développement analytique transposable aisément à l'échelle préparative
- Haute capacité de charge, avec possibilité d'injection d'une dizaine de grammes de composés

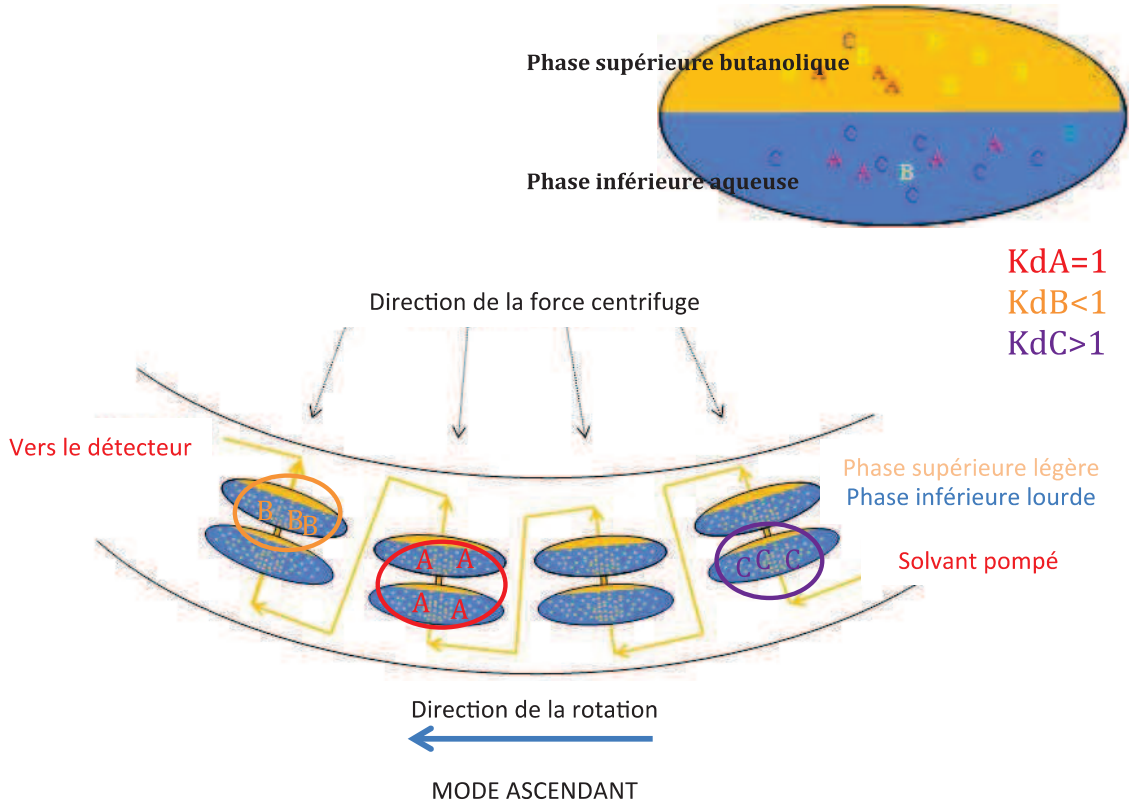


Figure I:23. Principe du partage dans une colonne CPC (schéma reproduit avec la permission d'Armen instrument).

Le point délicat de cette technique réside dans la sélection des solvants qui serviront de phase stationnaire ou de phase mobile. Il existe néanmoins différentes stratégies pour éviter les tâtonnements fastidieux ainsi que de nombreux exemples de mélanges biphasiques qui sont cités dans la littérature scientifique. En effet, depuis son invention, on

constate une augmentation exponentielle de publications mentionnant des applications de la CPC. La majorité d'entre elles concernent la purification de produits naturels. Ainsi, plus de 1 700 articles ont été publiés depuis 1980 ce qui a permis de développer des méthodes fiables et facilement applicables en routine et d'améliorer les capacités de séparation de cette technique chromatographique [Berthod A. *et al.* 2009].

Malgré les nombreuses applications à différentes classes chimiques de produits naturels, peu d'entre elles concernent les orchidées. Il s'agit de genre (*Dendrobium*) ou d'espèces (*Gastrodia elata, Aneoctochilus roxburgii)* les plus travaillés au niveau phytochimique [Li H. B.. *et al.* 2004 ; Huang L. *et al.* 2011 ; Li S. C. *et al.* 2011 ; Qing L. H. *et al.* 2009].



Figure I:24. Système SCPC250 couplé avec un Spot Prep II d'Armen instrument (photo prise au laboratoire)

Les analyses effectuées dans cette étude ont pu être réalisées grâce à un partenariat développé avec Armen instrument, l'un des fabriquant leaders des systèmes CPC. Toutes nos expérimentations ont ainsi été effectuées sur un système **SCPC250** (colonne CPC de 250 mL) couplé avec un **Spot Prep II** équipé de pompes quaternaires, d'un détecteur UV-DAD (200-600 nm) et d'un collecteur de fractions (**Figure I:24**).

Le développement des méthodes de nos analyses sera détaillé dans les chapitres concernés.

Chapitre II
Contribution à l'étude phytochimique d'orchidées tropicales

A. Contexte et objectifs

Un de nos objectifs principaux étant d'apporter des connaissances fondamentales sur la phytochimie des orchidées tropicales de la sous-famille des Epidendroïdées, neuf espèces ont été préalablement sélectionnées pour réaliser un criblage phytochimique. Trois matières premières ont été retenues après avoir croisé l'ensemble des critères de sélection fixés (cf page 44):

- ***Aerides rosea*** (tiges) et
- ***Acampe rigida*** (tiges et feuilles)

L'identification de leurs métabolites majeurs pourra apporter des connaissances fondamentales sur la composition chimique de ces deux espèces (vierges de toutes données scientifiques publiées) et discuter en fonction des données de la littérature de la spécificité ou de leur diversité chimique au sein d'une espèce voire d'une sous-tribu ou tribu à laquelle elles appartiennent.

B. Criblage phytochimique préliminaire

Dans un premier temps, nous avons réalisé des extraits dits 'standards' qui consistent à extraire la matière première végétale pulvérisée avec un mélange hydro-alcoolique EtOH/eau 90/10 v/v pendant 30 minutes à reflux. Les profils chromatographiques de ces extraits ont été comparés entre eux par CCM et CLHP afin de repérer des points communs et des différences avec des extraits de *Vanda coerulea* et *Vanda teres*, en utilisant les conditions chromatographiques décrites par Charlotte Simmler [Simmler C. 2010], puis d'émettre des hypothèses sur les familles chimiques qu'elles contiennent.

Ce criblage nous a également permis de déterminer et de comparer les rendements d'extractions présentés dans le **Tableau II.1**. Les meilleurs rendements massiques ont été obtenus pour les extraits d'*Acampe rigida*, notamment celui des feuilles. Cependant, ce rendement important peut être dû à l'extraction des chlorophylles ou autres pigments caractéristiques des feuilles, qui constituent des métabolites primaires peu intéressants. Les rendements d'extraction 'standard' de *V. coerulea* et d'*Aerides rigida* sont comparables.

Tableau II:1. Rendements d'extraction des cinq matières premières étudiées.

Espèce	Organe	Rendements massique des extraits 'standards' (% m/m)
Vanda coerulea	Tiges	7,82
Vanda teres	Tiges	11,5
Aerides rosea	Tiges	6,38
Acampe rigida	Tiges	14,27
Acampe rigida	Feuilles	17,97

Par CCM, nous avons comparé essentiellement les rapports frontaux et les colorations des métabolites après révélation à la vanilline sulfurique et chauffage à 110 °C pendant 5 minutes. Ce type de révélation est non spécifique et nous a permis seulement d'observer des similarités des profils entre un extrait de tiges de *Vanda coerulea* et un extrait de tiges d'*Aerides rosea* ou d'*Acampe rigida* (**Figure II.1**). On peut observer une zone commune révélant des composés de polarité moyenne (Rf = 0,3 - 0,5), à savoir les cinq stilbénoïdes précédemment identifiés dans *Vanda coerulea*: la flavidine, la coelonine, la méthoxycoelonine, l'imbricatine et le gigantol. Ces métabolites semblent aussi concentrés dans l'extrait d'*A. rosea*, que dans celui de *V. coerulea*, et sont probablement présents dans une moindre mesure dans *A. rigida*. Des similarités dans la zone des composés apolaires (Rf > 0,5) sont également constatées. En effet, le béta-sitostérol, identifié dans *V. coerulea* [Simmler C. 2010], semble être présent dans les trois extraits. En revanche, l'alpha-bisabolol y est absent. L'extrait de feuilles d'*A. rigida* ne révèle pas de similarités remarquables avec les autres matières premières. De plus, aucun point commun n'a été observé en comparant les profils des 3 extraits avec celui de *V. teres* (non présenté dans ce rapport).

Cette analyse nous a permis d'émettre l'hypothèse que les tiges d'*A. rigida* et d'*A. rosea* contiennent des stilbénoïdes communs à *V. coerulea,* mais également d'autres dérivés phénanthréniques ainsi que des terpènes et phytostérols. L'analyse plus spécifique ciblant à révéler la présence d'autres polyphénols (système de solvants AcOEt-ac. formique-ac. acétique-eau 100-11-11-26 v/v/v/v, révélation au réactif de NEU, puis PEG à 366 nm), de type flavonoïdes, acides phénoliques ou coumarines, s'est avéré non concluante et ne sera donc pas présentée dans ce rapport.

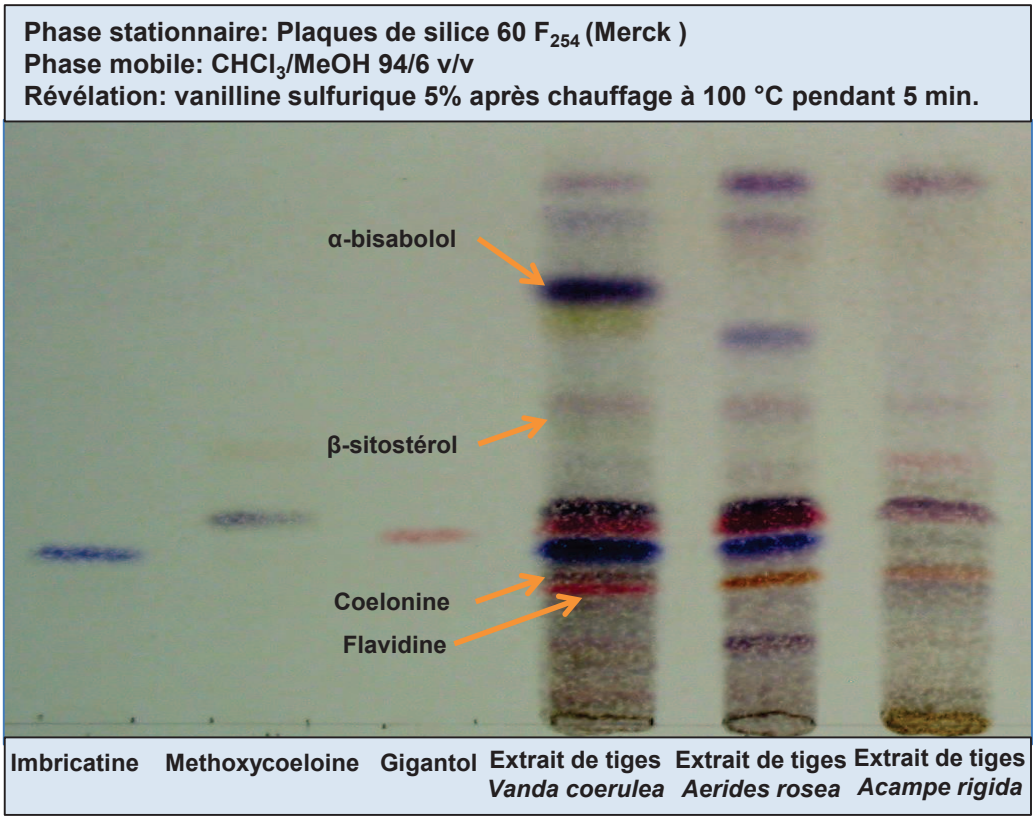


Figure II:1. Comparaison de profils chromatographiques sur CCM des extraits de tiges de *Vanda coerulea*, d'*Aerides rosea* et d'*Acampe rigida*.

L'analyse par CLHP nous a permis également d'observer des pics communs dans la zone d'élution des cinq stilbénoïdes identifiés dans *V. coerulea*. Ils apparaissent deux fois plus concentrés dans l'extrait d'*Aerides rosea*, mais quasi indétectables dans les deux organes d'*A. rigida*. Encore une fois, aucun point commun avec l'extrait de *V. teres* n'a été remarqué (voir la comparaison des chromatogrammes issus du couplage HPLC-ESI-HRMS/MS page 69). L'analyse des spectres UV des autres composés repérés dans les différents extraits ne nous a pas permis d'émettre des hypothèses précises sur la nature des familles chimiques auxquelles ils appartiennent.

Le criblage phytochimique que nous avons réalisé a ciblé des métabolites secondaires. La présence et la caractérisation des oses, des acides aminés ou d'autres métabolites primaires n'ont pas été recherchées. L'objectif principal était de comparer les différents extraits par rapport à notre extrait de référence, préparé à partir des tiges de *V. coerulea.*

C. Déréplication par HPLC-ESI-HRMS/MS

Dans les extraits végétaux complexes, la stratégie de déréplication permet d'accélérer l'isolement de nouvelles structures en repérant celles déjà connues. Généralement, la découverte de nouvelles substances naturelles avec un potentiel bioactif consiste à combiner plusieurs méthodes, commençant par l'étude bibliographique et les connaissances des médecines traditionnelles, puis passant par le criblage phytochimique combiné avec des essais bio guidés ou encore des comparaisons des profils chromatographiques par différentes méthodes qui ne cessent d'évoluer. Toute stratégie dépend de l'objectif fixé au départ et des moyens techniques disponibles mis en œuvre. Souvent, la démarche adaptée dépend aussi de la quantité des matières premières disponibles au départ [Yuliana N.D. *et al.* 2013 et Michel T. *et al.* 2013]. La méthode la plus souvent employée est la chromatographie liquide (CLHP ou également CCM) qui peut être couplée à une ou plusieurs techniques spectrales, telles que la détection UV (détecteur à barrette de diode-DAD), la spectrométrie de masse (haute résolution ou pas), ou encore la résonance magnétique nucléaire (RMN). La chromatographie en phase gazeuse (CPG ou GC-gas chromatography) est généralement couplée à la spectrométrie de masse. La SM (ou MS-mass spectrometry) peut aussi être utilisée seule, par infusion directe par exemple. En fonction du type d'extrait végétal, le couplage CLHP-SM (ou HPLC-MS) et CPG-SM (GC-MS) sont les plus souvent utilisés [Badjakov I. *et al.* 2008]. La CPG est employée pour des métabolites volatils et thermostables, ce qui exclut malheureusement un grand nombre de produits naturels, comme les composés phénoliques. Cependant, la dérivatisation permet la détection également de quelques métabolites primaires [Yuliana N.D. *et al.* 2013]. La CLHP constitue une méthode la mieux adaptée pour balayer un large spectre de composés contenus dans un extrait végétal. La gamme de polarité des solvants peut être le seul facteur limitant. La RMN permet d'obtenir les informations structurales les plus détaillées sur les métabolites présents dans l'extrait, à partir des spectres bidimensionnels. Cependant, elle est confrontée au même problème que la CLHP, c'est-à-dire le choix des solvants. La solubilisation des échantillons peut s'avérer compliquée dans certains cas. Le couplage direct entre CLHP-RMN peut être une bonne approche, mais la co-élution des pics et la superposition des signaux peut poser problème. Cependant, cette méthode a été appliquée avec succès dans l'étude d'une algue *Cystophora torulosa* et a conduit à l'identification de neuf métabolites secondaires sans la nécessité de les isoler (identification 'on-line') [Urban S. *et al.* 2013]. L'association de la CCM et de la SM est une technique efficace et rapide, mais seulement lorsqu'il s'agit des fractions pré-purifiées. Un extrait végétal contient en effet plus d'une centaine de métabolites et leur séparation sur une plaque CCM, qui requiert un système de solvants adapté, dont la recherche peut s'avérer fastidieuse, reste parfois

limitée. La superposition des spots qui sont désorbés de la plaque et injectés directement dans le spectromètre de masse entraîne également l'impossibilité de l'interprétation de leurs spectres respectifs. Beaucoup de ces techniques travaillent également avec le support des bases de données existantes, mais très couteuses.

Le criblage phytochimique préliminaire par CCM et CLHP-DAD nous a permis d'émettre des hypothèses que les tiges d'*A. rigida* et d'*A. rosea* contiennent des métabolites en commun avec *V. coerulea*. Un couplage CCM-SM est disponible au laboratoire. Cependant, l'analyseur de masse connecté à l'interface, permettant de désorber les différents spots, est de type quadrupôle et ne permet pas de calculer la formule brute des composés. Ainsi, seuls le rapport frontal et la couleur de révélation nous indiquent les similarités et les différences entre les extraits comparés. De plus, nous avons comparé des extraits 'standards' très complexes, ce qui rend la séparation sur une seule plaque de CCM plus compliquée. La comparaison des extraits par CLHP-DAD nous a permis de repérer des composés avec des temps de rétention proches ou identiques. Même si le spectre UV de chaque composé donne une indication relativement fiable sur la présence des dérivés phénanthréniques dans l'extrait, cette information n'est toujours pas suffisante pour conclure avec certitude, qu'il s'agit de métabolites communs entre les différents extraits. Cette conclusion pourrait être confirmée par la technique de co-injection, mais elle nécessiterait l'utilisation de grandes quantités de témoins purifiés. Nous avons ciblé des composés polaires à moyennement polaires, avec un noyau phénolique, ce qui exclue l'utilisation de la CPG. De plus, notre objectif était de confirmer la présence ou l'absence de ces métabolites sans la nécessité d'utiliser des bases de données universelles existantes, contenant même des molécules synthétiques.

Afin de confirmer nos hypothèses et éviter l'isolement fastidieux et chronophage des composés précédemment identifiés dans les deux espèces de *Vanda*, nous avons décidé de développer une méthode de déréplication en utilisant la technique la plus adaptée à notre cas, le couplage CLHP-SM. Le terme que nous allons employer pour désigner la technique couplée que nous avons utilisée dans cette étude, est le terme anglais HPLC-ESI-HRMS/MS (source d'ionisation: electrospray), le plus couramment utilisé dans la littérature. Cette technique a notamment été utilisée par Neto F. C. *et al.* pour identifier des dérivés phénoliques dans *Qualea grandiflora* et *Q. cordata* (Vochysiacées) [Neto F. C. *et al.* 2013]. Son principe a été expliqué dans le chapitre "Introduction" (cf pages 47-50).

Le principe de notre démarche consiste à établir d'abord une base de données en interne en injectant séparément chaque témoin purifié: la coelonine, la flavidine, l'imbricatine,

la méthoxycoelonine, le gigantol, les vandatérosides I à III et l'acide eucomique. Cette technique, extrêmement sensible, ne nécessite d'injecter qu'un microlitre de chaque composé en solution à une concentration très faible, de l'ordre de 10^{-4} M. Sur une même colonne chromatographique et dans des conditions d'élution identiques, on obtient ainsi des données expérimentales suivantes:

- le temps de rétention (par HPLC),
- le spectre de masse et la formule brute (par ESI-HRMS),
- puis avec une énergie de collision définie pour chaque composé, le spectre MS^2.

Ces paramètres sont ensuite intégrés dans la méthode créée. En réalité, lorsque l'extrait 'standard' est injecté, il est séparé par l'HPLC. D'une injection à l'autre, les temps de rétention (TR) peuvent subir un petit décalage. Pour cette raison, nous avons intégré une marge de différence de TR ± 1,5 minutes pour chaque métabolite. La méthode de déréplication "ciblée" balaie l'ensemble des composés présents dans l'extrait et recherche des pics avec la même masse (ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ pour les stilbénoïdes et l'acide eucomique et $[M+NH_4]^+$ pour les vandatérosides) et la même formule brute que le témoin concerné dans cette zone d'élution donnée. Ensuite, elle compare également les spectres MS^2 en recherchant les fragments d'ions caractéristiques de l'ion $[M+H]^+$ et créés par l'énergie de collision définie. Lorsque la méthode détecte un composé ayant le spectre de masse identique, la même formule brute, le même spectre MS/MS dans une zone d'élution de TR ± 1,5 min du témoin dans la base de données établie, on obtient une réponse sous forme d'un pic dont le rapport du signal sur bruit (S/N ratio) est supérieur à 10. Cette réponse signifie la présence de ce même composé dans l'extrait analysé. L'avantage de cette méthode de déréplication repose également sur l'ensemble des données qui sont expérimentales et acquises au laboratoire, et non théoriques comme ça aurait été le cas si nous avions recours à une base de données publique et onéreuse. Le **Tableau II:2**

Tableau II:2. Liste des paramètres intégrés dans la méthode de déréplication.

Composé	Masse ciblée $[M+H]^+$	z	Δ TR (min)	Energie de collision (eV)	Fragments MS/MS ciblés
Acide eucomique	241,07	1	0,85±1,5	5,000	205,04; 161,06; 133,07; 107,05
Flavidine	241,08	1	3,75±1,5	15,000	239,06; 224,08; 195,08
Coelonine	243,10	1	4,13±1,5	12,000	228,08; 211,08; 183,08
Imbricatine	271,10	1	4,196±1,5	12,000	239,07
Methoxycoelonine	273,10	1	4,603±1,5	11,000	241,09; 213,09
Gigantol	275,10	1	6,308±1,5	9,000	151,07; 137,06; 91,05
Vandatéroside I	526,19 **$[M+NH_4]^+$**	1	1,16±1,5	8,000	107,05
Vandatéroside II	794,29 **$[M+NH_4]^+$**	1	1,74±1,5	12,000	107,05
Vandatéroside III	1086,38 **$[M+NH_4]^+$**	1	4,97±1,5	15,000	293,10; 107,05

représente la liste des paramètres intégrés dans notre méthode de déréplication. Cette approche est schématiquement représentée sur la **Figure II:2.** Le détail expérimental de cette méthode est donné en page 116.

En comparant les chromatogrammes issus de la séparation par HPLC du système couplé (**Figure II:3**), nous pouvons observer des similarités entre les extraits de tiges de *Vanda coerulea*, *Aerides rosea* et *Acampe rigida*, ce qui confirme nos observations sur CCM. Le profil de l'extrait de feuilles d'*A. rigida* ressemble à celui des tiges de *Vanda teres*, ce qui n'a pas été remarqué sur CCM. Nous pouvons en effet observer des composés avec le même temps de rétention. Cependant, en comparant seulement les temps de rétention et les spectres UV des différents pics, nous ne pouvions pas conclure avec certitude qu'il s'agit des mêmes métabolites dans les extraits. En comparant les spectres MS et MS/MS, notre méthode de déréplication qui a été développée nous a permis de détecter la présence ou l'absence des neuf métabolites précédemment identifiés dans les deux espèces de *Vanda*.

Tableau II:3. Les métabolites isolés de *V. coerulea* et *V. teres* détectés par la méthode de déréplication par HPLC-ESI-HRMS/MS dans les extraits standards des espèces d'orchidées étudiées.

Composé	*Aerides rosea* tiges	*Acampe rigida* tiges	*Acampe rigida* feuilles
Acide eucomique	-	-	-
Flavidine	-	Présence	-
Coelonine	Présence	Présence	-
Imbricatine	Présence	Présence	-
Methoxycoelonine	Présence	-	-
Gigantol	Présence	Présence	-
Vandatéroside I	-	-	-
Vandatéroside II	-	-	-
Vandatéroside III	-	-	-

Les résultats de l'analyse des extraits 'standards' sont résumés dans le **Tableau II:3**.

Cette méthode de déréplication a permis de confirmer la présence des métabolites communs dans les tiges de *V. coerulea*, *A. rosea* et *A. rigida.* Seule la flavidine est absente dans *A. rosea* et la méthoxycoelonine dans les tiges d'*A. rigida*. L'acide ecomique est absent dans tous les extraits. Malgré les ressemblances des profils chromatographiques entre l'extrait de tiges de *V. teres* et les feuilles d'*A. rigida,* la présence d'aucun vandatéroside n'a été confirmée.

Ainsi, le développement d'une méthode de déréplication performante et fiable nous a évité l'isolement fastidieux des composés connus et nous a permis de nous focaliser sur l'identification d'autres métabolites. Leur caractérisation sera décrite dans la suite de ce manuscrit.

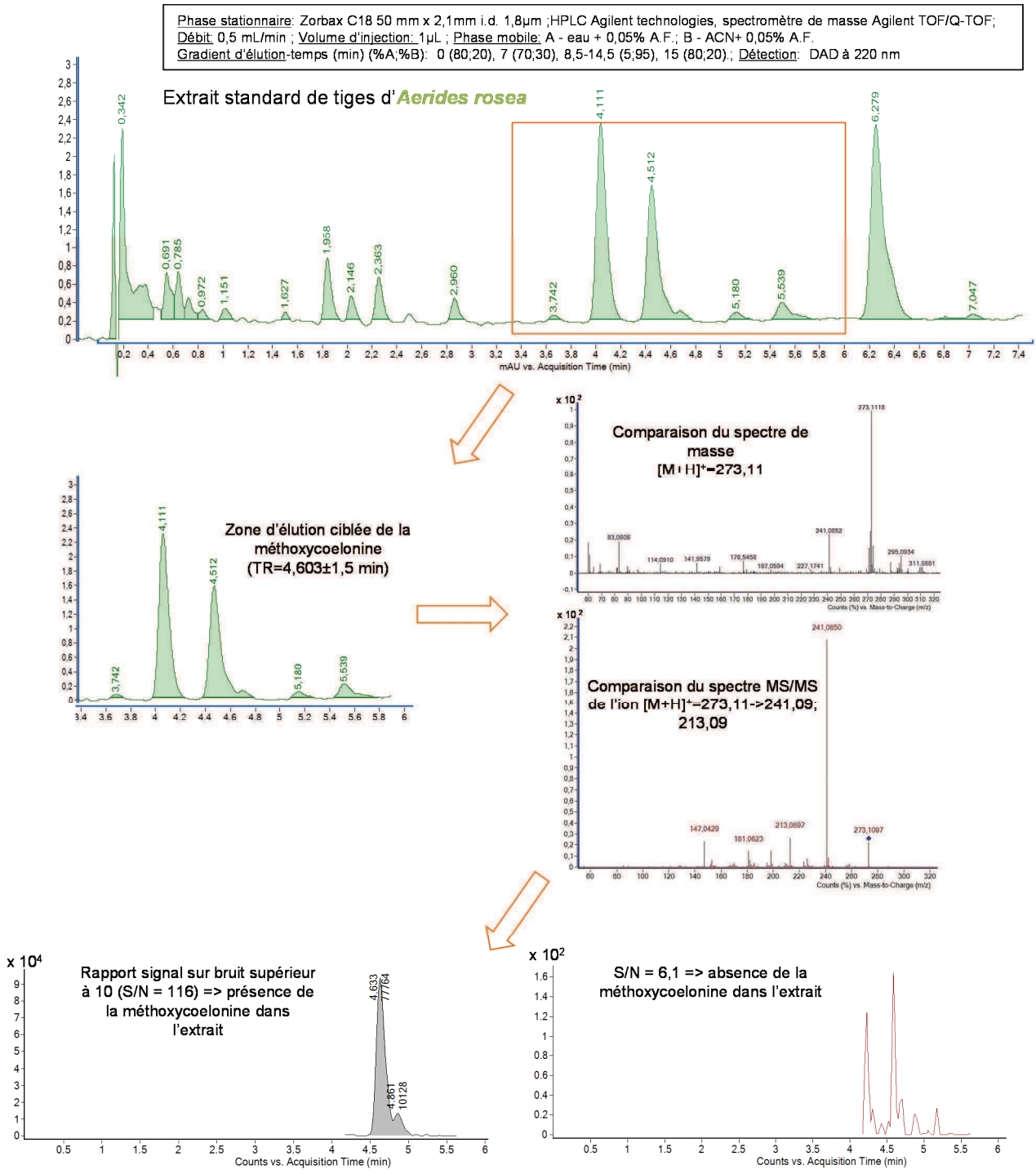


Figure II:2. Schéma de la méthode de déréplication développée en illustrant l'exemple de la méthoxycoelonine.

Phase stationnaire: Zorbax C18 50 mm x 2,1mm i.d. 1,8µm ;HPLC Agilent technologies, spectromètre de masse Agilent TOF/Q-TOF; Débit: 0,5 mL/min ; Volume d'injection: 1µL ; Concentration des échantillons: 5 mg/mL ; Phase mobile: A - eau + 0,05% A.F.; B - ACN+ 0,05% A.F. Gradient d'élution-temps (min) (%A;%B): 0 (80;20), 7 (70;30), 8,5-14,5 (5;95), 15 (80;20).; Détection: DAD à 220 nm

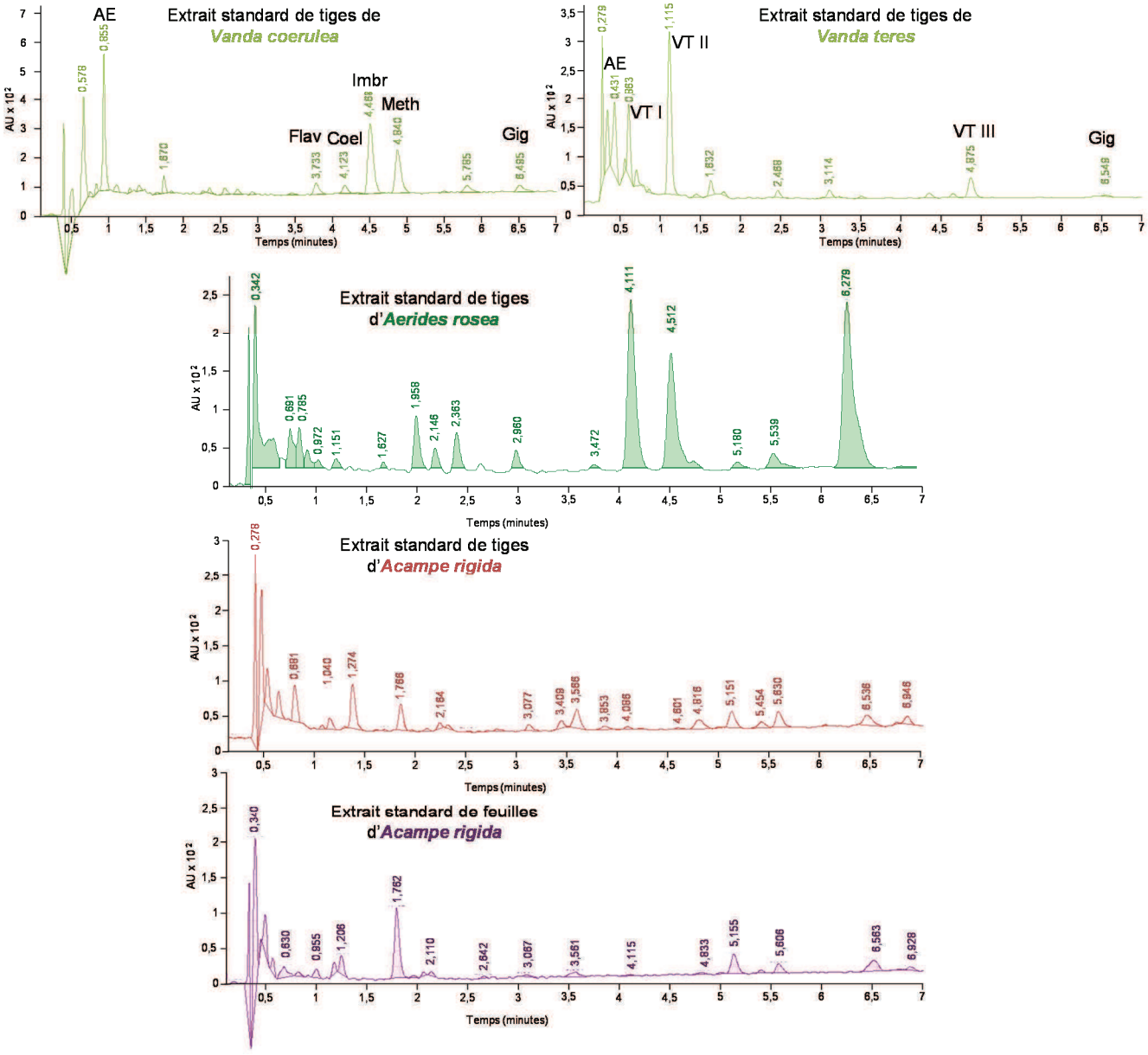


Figure II:3. Comparaison des profils chromatographiques des extraits standards issus du couplage HPLC-ESI-HRMS/MS. AE=acide eucomique; VT I=vandatéroside I; VT II=vandatéroside II; VT III=vandatéroside III; Flav=flavidine; Coel=coelonine; Imbr=Imbricatine; Meth=methoxycoelonine; Gig=gigantol.

Chapitre II
Partie I: Identification des constituants d'*Aerides rosea* Lodd. ex. Lindl. & Paxton

A. Introduction

Après avoir mis en évidence 'on-line' quatre stilbénoïdes communs entre *Vanda coerulea* et *Aerides rosea* (cf. **Tableau II:3**, page 67), nous avons pu continuer notre quête des structures originales. Dans ce chapitre, nous allons détailler la poursuite de nos travaux pour contribuer à l'étude phytochimique d'*Aerides rosea*. Dans l'ambition d'approfondir nos connaissances sur les constituants chimiques des orchidées, la démarche scientifique et la stratégie adoptée seront discutées. La majorité des travaux décrits dans cette partie ont fait l'objet d'une publication soumise à ***Analytical chemistry***. Ce manuscrit est inclus à la fin de cette partie (page 116) et résume notamment l'ensemble des matériels et méthodes utilisés. En ce qui concerne la section expérimentale, nous allons parfois y faire référence, afin d'alléger la lecture de ce document.

A. I. Caractéristiques et distribution géographique

Aerides rosea est une espèce majoritairement épiphyte, mais aussi litophyte originaire d'Inde [www.theorchidologist.com, accès en septembre 2013]. Trouvée dans le Sud de la Chine et le Sud-Est asiatique (notamment au Vietnam, en Thaïlande, au Bhutan et les régions indiennes de Sikki et Assam), son biotope naturel se situe dans les forêts tropicales à feuilles persistantes ou sur des rochers et des falaises ouverts entre 300 et 1700 mètres d'altitude. [Nanakorn W. *et al.* 2008; www.orchids.wikia.com/wiki/Aerides_rosea]. En culture, le support est remplacé par des paniers en bois. Cette orchidée doit être arrosée et fertilisée régulièrement et maintenue humide. Les pulvérisations d'eau fréquentes, voire quotidiennes, sont recommandées durant les mois chauds d'été. Sa période de floraison a lieu entre les mois d'avril et juillet [www.orchidspecies.com, accès en septembre 2013].

A. II. Classification et description botanique

Aerides rosea est une espèce à croissance monopodiale, pouvant mesurer entre 30-60 cm. Ses tiges sont ligneuses et portent des feuilles persistantes de forme rectangulaire, de 3-5 cm de large et 15-20 cm de long. L'inflorescence est pendante et dense, longue de 20-30 cm. Les pétales et sépales sont blanches avec des tâches rosâtres (**Figure II:4**). Le labelle, muni d'un éperon petit et court, est blanc avec des marques pourpres. Les fleurs sont odorantes. [Nanakorn W. *et al.* 2008].

La classification d'*Aerides rosea* est décrite ci-dessous selon la classification APG III (2009) [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy ; http://www.tropicos.org].



Figure II:4. *Aerides rosea* Lodd. ex Lindl. & Paxton. 1: source Paxton's Flower Garden, vol. 2, planche 60 (1853); 2 : photographie personnelle.

Règne : Plantae (Plantes)
Sous-règne : Tracheobionta (Plantes vasculaires)
Super-division : Spermatophyta (Plantes à graines)
Division : Magnoliophyta (Plantes à fleurs)
Classe : Monocotylédones
Ordre : Asparagales
Famille : Orchidaceae
Sous- famille : Epidendroideae
Tribu : Vandeae
Sous tribu : Aeridinae
Genre : *Aerides* Lour. (1790)
Espèce : *Aerides rosea* Lodd. ex. Lindl. & Paxton (1853)

Synonymes: Aerides trigona Klotzsch (1855), *Aerides williamsii* R.Warner (1862) ou *Aerides fieldingii* Lodd. ex E.Morren (1876)

A. rosea a d'autres synonymes, cependant les trois cités ci-dessus sont les plus fréquemment employés dans les bases de données botaniques.

A. III. Le genre *Aerides*

Le genre Aerides a été décrit pour la première fois par le botaniste portugais João de Loureiro en 1790 dans Flora Cochinchinensis 2: 525 avec la description de sa première espèce, *Aerides odorata* [http://www.botanicus.org/page/654218, accès en septembre 2013]. Selon la liste mondiale des plantes, le genre *Aerides* compte aujourd'hui 178 espèces, dont seulement 27 noms botaniques sont acceptés comme officiels [The Plant List of all plant species, http://www.theplantlist.org/browse/A/Orchidaceae/Aerides/]. 151 noms scientifiques sont donc considérés comme des synonymes pour des mêmes espèces. Quelques exemples sont illustrés dans le **Tableau II:4**. Certaines espèces ont été classées dans le genre *Aerides*, or leur nom est le synonyme d'un autre nom accepté d'un genre différent. C'est le cas par exemple d'*Aerides flabellata*, qui est le synonyme de *Vanda flabellata*. En effet, ces deux genres sont d'un point de vue évolutif très proches, comme le démontrent des récentes études phylogénétiques [Kocyan A. *et al*. 2008 et Zhang G-Q. *et al.* 2013].

A. IV. Usages traditionnels

Deux espèces du genre *Aerides* ont été répertoriées comme plantes médicinales traditionnelles, surtout en Inde. *Aerides multiflora* Roxb. (syn. *Aerides affinis* Wall. ex J. Lindl.) est inscrite dans une matière médicale indienne pour ses propriétés anti-bactériennes contre *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella aureus* [Hossain MM 2011; Sing A. *et al.* 2009 et Ghanaksh A. *et al.* 1999]. Les feuilles et les racines d'*Aerides odorata* sont utilisées sous forme de pâte mélangée avec celle de l'écorce d'*Azadiracta indica* (Méliacées) pour réduire des douleurs et gonflements articulaires. Le jus des feuilles est préconisé, par voie orale, en cas de tuberculose [Hossain MM 2011].

A. V. Données phytochimiques

Malgré les indications concernant l'usage traditionnel des espèces du genre *Aerides*, une seule étude a fait l'objet d'une étude phytochimique. L'aeridine, un phénanthropyrane, a été identifié dans *Aerides crispum* [Anuradha V. *et al.* 1998]. La relation taxonomique proche entre les genres *Vanda* ou *Aerides*, contenant notamment des phénanthrènes ou des dérivés hydroxybenzyl malates, pouvait donner des indications sur une composition chimique similaire. L'identification de l'aeridine dans une espèce voisine augmente ainsi la probabilité de retrouver plutôt des dérivés phénanthréniques également dans *Aerides rosea*. En effet, quatre stilbénoïdes communs à *Vanda coerulea*, la coelonine, la méthoxycoelonine, l'imbricatine et le gigantol, ont été détectés dans l'extrait hydro-alcoolique de tiges par notre méthode de déréplication.

Tableau II:4. Les exemples d'espèces du genre *Aerides* et quelques exemples des synonymes avec le même nom du genre. Liste des noms et exemples de synonymes acceptés par WCSP [http://apps.kew.org/wcsp/home.do, consulté en septembre 2013]. Source des photos: Encyclopedia of life www.eol.org.

Nom scientifique accepté	Exemples de synonymes	Espèces en images
Aerides crispa Lindl.	*Aerides brockesii* Heynh. *Aerides brookei* Bateman ex. Lindl. *Aerides crispum* R. Br. *Aerides Lindleyana* Wight *Aerides warneri* Hook.f.	
Aerides falcata Lindl. & Paxton	*Aerides larpentae* Rchb.f. *Aerides leoniae* (Rchb.f.) Rchb.f. *Aerides mendelii* E. Morren *Aerides siamensis* Klinge	
Aerides houlletiana Rchb.f.	*Aerides picotiana* Rchb.f. *Aerides platychila* Rolfe	
Aerides odorata Lour.	*Aerides ballantiniana* Rchb.f. *Aerides cornuta* Roxb. *Aerides jucunda* Rchb.f. *Aerides rohaniana* Rchb.f. *Aerides suavissima* Lindl.	
Vanda flabellata (Rolfe ex. Downie)	*Aerides flabellata* Rolfe ex. Downie	

A. VI. Stratégie adoptée

Après les résultats préliminaires de la déréplication, nous avons cherché à enrichir les dérivés phénanthréniques par un solvant adapté. Puis, l'échantillon a subi différentes étapes de fractionnement, notamment par Sephadex LH-20 ou SPE. Onze fractions ont été obtenues et en fonction de leur quantité, nous avons employé des stratégies différentes dans le but d'identifier leurs principaux constituants. La première stratégie a consisté en l'utilisation des techniques phytochimiques classiques, comme la CLHP semi-préparative et les méthodes spectrales comme la HRMS et la RMN. Deux fractions minoritaires contenant des molécules inconnues à identifier ont été analysées par le couplage HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN dans l'objectif de les identifier 'on-line' à partir de seulement quelques microgrammes de chaque métabolite, sans la nécessité de les isoler au préalable. Les différentes étapes de la contribution à l'étude phytochimique des tiges d'*Aerides rosea* sont décrites et discutées dans ce chapitre.

B. Matériel et méthodes

B. I. Matière végétale

Les tiges d'*Aerides rosea* Lodd. ex Lindl. & Paxton ont été fournies par intermédiaire de TianZi Biodiversity Research & Development Center (Mekong Hill Garden, Jinghong, Xishuagbanna, Yunnan, China), en respectant la convention CITES. Le matériel végétal a été récolté en octobre 2010 à Chiang Mai, Thaïlande (Joe's orchids farm, coordonnées GPS N18° 46', E98° 58'). Le prélèvement a été effectué sur des spécimens cultivés, âgés de plus de 5 ans, au stade de la floraison. Les feuilles ont été séparées des tiges et des racines et directement séchées au soleil direct à 35°C pendant une semaine dans des conditions naturelles d'humidité et de climat tropical.

Un échantillon d'herbier (n° 038824) a été déposé à l'Herbier de la Faculté des sciences de l'Université de Chiang Mai, en Thaïlande.

Les tiges séchées ont été transmises par LVMH recherche sous le numéro de lot 2268. Les tiges d'*Aerides rosea* sont nommées tout au long de l'étude sous le code **AR 2268** (**Figure II.5**).



Figure II.5. Les tiges séchées d'*Aerides rosea*, lot 2268.

B. II. Broyage

La matière végétale sèche (MVS) a été broyée à l'aide d'un appareillage Retsch (ZM 200). Le broyage s'est fait en deux temps, d'abord grossier à travers un couteau de diamètre moyen (trous ronds de diamètre moyen de 5 mm), puis plus fin (trous trapézoïdaux de

diamètre de 2 mm) pour obtenir une poudre de granulométrie compatible avec une extraction optimale.

B. III. Extraction de la matière végétale sèche

La matière première pulvérisée a été extraite par passages successifs de solvants de polarité croissante. D'abord le cyclohexane (C_6H_{12}), suivi de l'acétate d'éthyle (AcOEt), et enfin le méthanol (MeOH). Le rapport masse de plante broyée (g) /volume de solvant (mL) est de 1/15.

La MVS est mise au contact avec le cyclohéxane et macérée pendant une heure, puis le mélange est soniqué dans un bain à ultrasons (Fisher Scientifique FB 15060) pendant 10 minutes afin d'optimiser la pénétration du solvant dans les cellules végétales grâce à l'altération des parois celullaires. L'extrait est filtré sous vide (Büchner). Le filtrat et le marc sont séparés, puis le dernier est récupéré pour refaire la manipulation une deuxième fois.

Après la deuxième extraction au cyclohexane, le marc est ré-extrait avec de l'AcOEt en suivant la même procédure deux fois. Enfin, le même protocole est reproduit avec le méthanol.

B.IV. Analyse des échantillons par CLHP

Afin de suivre l'extraction ainsi que le fractionnement, tous les échantillons ont été analysés par CLHP à l'aide d'un chromatographe LC920 (Varian) équipé des pompes quaternaires, d'un passeur d'échantillons, un four à colonne et d'un détecteur UV à barrettes de diode (DAD).

Les échantillons sont séparés sur une colonne Nucleodur C18ec de 250 x 4,6 mm i.d. avec la taille des particules de 5 µm (Macherey Nagel) à l'aide d'un gradient d'élution constitué d'un mélange d'eau (solvant A) et de MeOH (solvant B), tous deux acidifiés à 0,1% d'acide formique, dans les conditions suivantes (temps : %B) : 0-8 min : 45% ; 10-15 min : 55% ; 18-25 min : 60% ; 35 min : 90% ; 40-45 min : 100%.

Les analyses sont effectuées à 30°C avec un débit des pompes réglé à 1 mL/min. Les chromatogrammes sont observés à 260 nm. Le volume d'injection est de 10 µL d'échantillons concentrés à 5 mg/mL.

En vue de l'identification des métabolites *on-line* par le couplage HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN, le gradient a été réadapté sur une autre colonne chromatographique compatible avec le système couplé. Les conditions ainsi que le gradient d'élution sont détaillés dans la publication à la fin de ce chapitre (page 116).

B. V. Analyse des échantillons par CCM

Afin de suivre les différentes étapes du fractionnement, les échantillons ont été analysés par CCM sur des plaques de gel de silice 60 F_{254} (Merck Millipore) avec un support en aluminium.

- Conditions :

  Phase mobile : chloroforme / méthanol (94/6) (v/v)

  Observation à 366 nm et 254 nm avant révélation.

  Révélation à la vanilline sulfurique (5% de H_2SO_4 97% chez Carlo Erba), observation sous lumière visible après chauffage à 110°C pendant 5 minutes.

B. VI. Préfractionnement de l'extrait AcOEt par SPE

L'extrait AcOEt d'AR 2268 est préfractionné par SPE en utilisant des cartouches Chromabond C18 ec (Macherey Nagel) afin d'enrichir l'extrait en composés d'intérêt dans un mélange d'eau/méthanol (15/85 v/v) et d'éliminer les composés gênants les plus apolaires directement dans 100% de MeOH. Le volume des cartouches a été choisi de façon à ce que la masse d'extrait ne dépasse pas 10% du poids de la phase stationnaire. Nous avons obtenu deux fractions, la première (eau/méthanol 15/85 v/v) a été choisie en vue de l'isolement des composés d'intérêt.

B. VII. Fractionnement de l'extrait AcOEt par chromatographie d'exclusion

Le fractionnement de l'extrait enrichi (AcOEt et SPE H_2O/MeOH 15/85 v/v) a été réalisé par chromatographie d'exclusion stérique à l'aide d'un gel Sephadex LH-20 (LH-20 100-Sigma Aldrich). Ce gel possède des propriétés aussi bien hydrophiles que lipophiles, permettant une utilisation de solvants aqueux et organiques, tels que le méthanol. Les molécules ont ainsi été séparées à la fois selon leur taille et leur solubilité dans la phase mobile employée.

La fraction SPE 15/85 de l'extrait AcOEt (1,444 g) de tiges d'AR2268 a été mise en solution dans du MeOH, puis déposé sur une colonne de gel Sephadex LH-20 (H: 41 cm, d: 2,7 cm). Le fractionnement a été réalisé par élution isocratique avec un débit constant d'environ 1 mL/min. Il a permis d'obtenir 75 fractions de 5 mL. Celles qui présentaient un profil similaire en chromatographie sur couche mince (support: SiO_2 F_{254}, élution: $CHCl_3$/MeOH 94/6 v/v, révélation : vanilline sulfurique 5%) ont été rassemblées, réduisant ainsi le nombre de fractions à 12.

L'acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique a été isolé à partir de la fraction 3 par CLHP semi-préparative. La batatasine III a été isolée à partir de la fraction 4 également par cette technique, cependant une purification supplémentaire a été nécessaire à l'aide de la CCM préparative. Afin d'identifier le contenu des fractions 7, 9 et 10, minoritaires, elles ont été analysées par le couplage HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN.

B. VIII. Isolement de la batatasine III et de l'acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique par CLHP semi-préparative

La purification de ces deux métabolites a été effectuée par CLHP semi-préparative menée sur le chromatographe Gilson 151 UV-VIS, muni d'une pompe 322 et d'un détecteur Gilson 151 UV-VIS. La méthode d'élution consiste en un gradient eau/0,05% acide formique et méthanol/0,05% acide formique. Les conditions sont résumées dans le **Tableau II:5**.

B. IX. Purification de la batatasine III par CCM semi-préparative

Afin de parfaire l'isolement de la batatasine III, une seconde étape de purification par CCM semi-préparative a été réalisée. Nous avons utilisé des plaques préparatives PLC Silica gel 60 F_{254} (20 x 20 cm, épaisseur 1000 µ) avec une zone de concentration de 4 x 20 cm (Merck). 28,2 mg de la solution contenant la batatasine III pré-purifiée ont été déposés (dans MeOH) 2 cm à partir du bas de la zone de concentration sur 18 cm (longueur de dépôt) à l'aide d'un déposeur automatique Linomat (Camag). La plaque a été éluée à l'aide d'un mélange $CHCl_3$/MeOH 93/7 v/v sur une longueur d'élution de 16 cm. Le composé a été détecté à 254 nm sous forme de bande foncée.

La bande de silice correspondant à la batatasine III a été grattée, puis la récupération a été réalisée grâce à un mélange $CHCl_3$/MeOH 95/15 v/v et une sonication de 10 minutes. Après filtration sur papier filtre, la molécule purifiée a été récupérée dans le filtrat.

Tableau II:5. Conditions de CLHP semi-préparative pour l'isolement de l'acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique et de la batatasine III à partir de l'extrait AcOEt d'AR2268.

Appareil	Chromatographe **GILSON –** pompes 322
Logiciel	TRILUTION LC
Phase stationnaire	Nucleodur C18 ec 250 mm x 21,0 mm x 5 µm (Macherey-Nagel)
Détection	à 230 nm
Volume d'injection	Plusieurs injections entre 500 et 1000 µL
Concentration des échantillons	25 mg/mL Filtrés sur 0,45 µm (Roth)
Phase mobile	A : eau + 0,05 % acide formique B : méthanol + 0,05 % acide formique
Gradient d'élution	**Acide dihydroconiféryl dihydro *p*-coumarique**: (temps : %B) : 0-10 min : 45% ; 12-15 min : 55% ; 24-34 min : 60% ; 35-40 : 100%. **Batatasine III**: (temps : %B) : 0 min : 50% ; 7-12 min : 60% ; 22 min : 70% ; 25-30 min : 100%.
Débit	20 mL/ min

B. X. Identification de la batatasine III et de l'acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique par HRMS et RMN

Les fractions Sephadex ont été analysées par la méthode de déréplication à partir de laquelle nous avons obtenu indirectement les formules brutes des composés (cf partie expérimentale de la publication soumise, page 116).

Les structures de ces molécules ont été confirmées par une analyse de résonance magnétique nucléaire (RMN) monodimensionnelle (^{1}H et ^{13}C RMN) et bidimensionnelle (NOESY). L'acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique (8 mg) purifié a été préparé dans 400 µL de méthanol deuteré (Méthanol-d_4, CD_3OD ; 99,80%D, Euriso-top) et introduit dans des tubes RMN de 5 mm de diamètre (Euriso-top). Les analyses ont été menées sur un

spectromètre Bruker Avance III 400 MHz. Les spectres ont ensuite été analysés avec le logiciel NMR Notebook. La batatasine III (0,5 mg) a été dissoute dans 20 µL d'acétone deutéré (acétone-d_6) et injectée manuellement dans la cellule mesure en flux d'une sonde capillaire capNMR (Protasis). Le volume total de cette sonde est de 10 µL, avec un volume actif seulement de 5 µL. Les analyses ont ensuite été menées sur un spectromètre Bruker Avance III 500 MHz. Les spectres ont été analysés sur le logiciel NMR Notebook (NMRtec) et interprétés à l'aide du logiciel CMC-se (Bruker).

B. XI. Identification on-line des métabolites minoritaires des fractions Sephadex 7, 9 et 10 par HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN

Pour cette expérience, les fractions 9 et 10 ont été réunies en raison de leur profil similaire. Nous avons ainsi obtenu une quantité plus importante d'échantillon et les composés d'intérêt ont pu être analysés simultanément après une séparation chromatographique unique. Le détail du matériel et méthodes utilisés est expliqué dans la partie expérimentale de la publication (page 124). La fraction 7 est appelée F1 et les fractions 9 et 10 réunies sont appelées F2.

C. Résultats et discussion

C. I. Enrichissement des métabolites d'intérêt et rendements d'extractions

Les extraits végétaux renferment généralement un mélange de plusieurs centaines, voire d'un millier de composés, présents à différentes concentrations. Après avoir identifié des dérivés phénanthréniques dans *Aerides rosea* par la méthode de déréplication, nous avons émis l'hypothèse que les composés majoritaires sont également issus de cette famille chimique. Dans un premier temps, nous avons donc cherché à obtenir un extrait enrichi en métabolites d'intérêt, c'est-à-dire les stilbénoïdes. Un protocole d'extraction a été optimisé afin de concentrer les composés dans un extrait adapté en réalisant des extractions successives avec des solvants de polarité croissante. Les dérivés phénanthréniques étant d'une polarité moyenne, nous avons d'abord éliminé tous les composés apolaires (stérols, tritérpènes ou chlorophylles), dans un extrait cyclohexanique. Cette première étape a permis d'abord de fragiliser les cellules végétales en laissant pénétrer le premier solvant d'extraction, puis de simplifier l'extrait enrichi que nous avons obtenu avec l'acétate d'éthyle. L'extrait méthanolique avait pratiquement la même composition que celui à l'AcOEt, mais à plus faibles concentrations. Le MeOH étant plus polaire que l'AcOEt, nous pouvons

remarquer des composés très polaires sur CCM restant au niveau de la zone de dépôt, non visibles dans l'UV à l'analyse CLHP-DAD, comme les sucres par exemple (**Figure II:6**).

Trois extraits ont ainsi été récupérés à partir de 100 g de feuilles d'*A. rosea*, un extrait « C_6H_{12} » avec un rendement de 0,78%, un extrait « AcOEt » avec un rendement de 3,22% et un extrait « MeOH » avec un rendement de 4,88%. Les composés d'intérêt se retrouvent dans l'extrait AcOEt, qui reste encore très complexe. Afin de simplifier cet extrait, il a subi différentes étapes de fractionnement.



Figure II:6. Comparaison des profils chromatographiques (CCM) des extraits successifs d'*Aerides rosea*.

C. II. Fractionnement de l'extrait AcOEt par SPE et Sephadex LH-20

Même si le cyclohexane a extrait la plupart des composés apolaires, sans intérêt dans notre étude, leurs traces ont été encore observées dans l'extrait AcOEt. Nous les avons éliminés par SPE en phase inverse (C18). Les métabolites d'intérêt ont été élués dans un mélange d'eau et du MeOH (15/85 v/v). Les composés apolaires ont été éliminés dans le MeOH 100%. Au total, nous avons élué 1,842 g d'extrait AcOEt afin d'obtenir 1,444 g de la fraction H_2O/MeOH 15/85 v/v (rendement 78,39%) et 208,8 mg de la fraction MeOH 100% (rendement 11,34%). Cette étape de fractionnement représente donc 10,27% de pertes de l'échantillon, probablement resté adsorbé sur la phase stationnaire de la cartouche SPE. Ces 1,444 g de la première fraction ont ensuite été déposés sur une colonne d'un gel de Sephadex LH-20. Les fractions ayant un profil chromatographique similaire sur CCM ont été

réunies. Nous avons ainsi obtenu douze fractions, numérotées de 1 à 12 (**Figure II:7**). Le rendement massique était de 73,47%, ce qui signifie 26,23% de pertes de composés qui n'ont pas été élués (**Tableau II:6**). L'analyse sur CCM montre la complexité de l'extrait de tiges d'*Aerides rosea*. Des traces de terpénoïdes ont été observées dans les premières fractions. Les stilbénoïdes ont été détectées à partir de la troisième fraction. Nous nous sommes d'abord intéressés aux fractions majoritaires présentant un profil simplifié afin d'isoler leurs constituants à l'aide d'une CLHP semi-préparative. En effet, 231,1 mg de la fraction 3 et 94,2 mg de la fraction 4 ont été obtenus, ce qui représente une quantité suffisante pour poursuivre la purification des composés par des techniques phytochimiques classiques (**Figure II:8**).

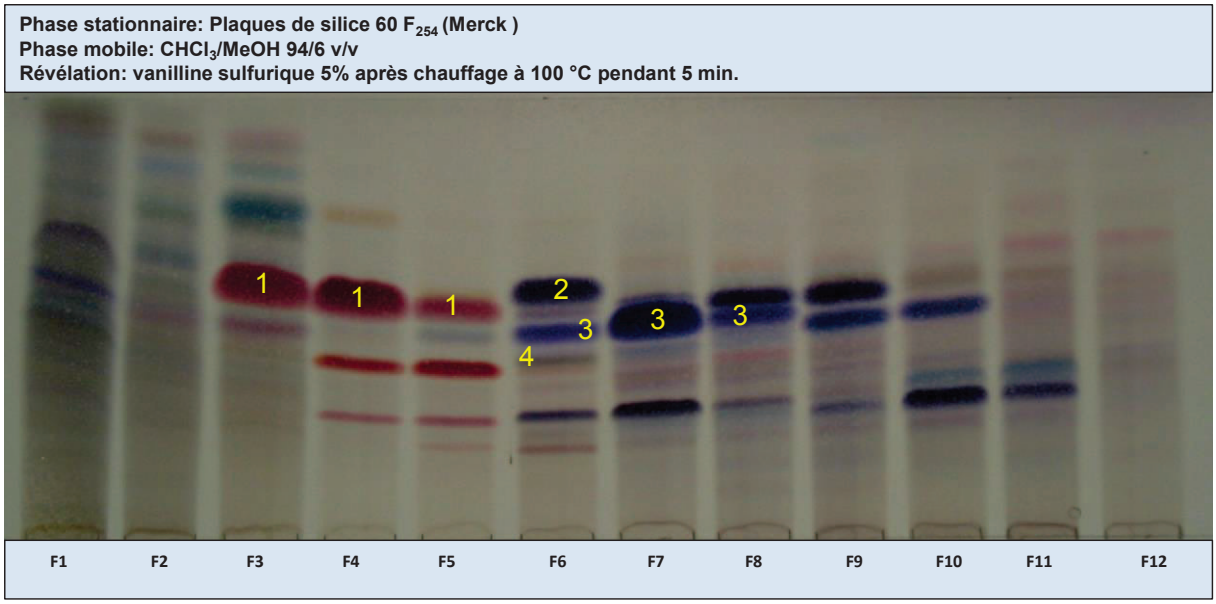


Figure II:7. Analyse sur CCM du fractionnement de l'extrait AcOEt d'AR2268 après SPE par chromatographie d'exclusion (Sephadex LH-20). (1)=gigantol; (2)=méthoxycoelonine; (3)=imbricatine; (4)=coelonine.

Tableau II:6. Rendement massique du fractionnement de l'extrait AcOEt d'AR2268 après SPE par chromatographie d'exclusion (Sephadex LH-20).

Fraction	Masse obtenue (mg)	Rendement (%)
1	146,2	10,12
2	169,1	11,71
3	231,1	16,00
4	94,2	6,52
5	55,4	3,84
6	186,3	12,90
7	100,2	6,94
8	17,5	1,21
9	12,6	0,87
10	21,4	1,48
11	11,1	0,77
12	15,8	1,09
TOTAL	1060,9	73,47%

C. III. Analyse des fractions Sephadex par la méthode de déréplication HPLC-HRMS/MS

Afin de repérer les quatre stilbénoïdes préalablement détectés par la méthode de déréplication, nous avons analysé les douze fractions par la même méthode. Le gigantol est majoritairement présent dans les fractions 3 et 4 (**Figure II:8**), puis également en quantité moins importante dans la fraction 5. Nous avons ainsi pu éviter son isolement et nous focaliser sur les autres composés présents. La fraction 6 contenait les trois autres métabolites réunis: la méthoxycoelonine, la coelonine et l'imbricatine. Cette dernière était encore présente dans les deux autres fractions, 7 et 8 (**Figure II:7**). L'identification de l'imbricatine dans la fraction 7 a ainsi permis d'éviter son piégeage (sans réel intérêt) sur des cartouches SPE lors de l'analyse par le couplage HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN.

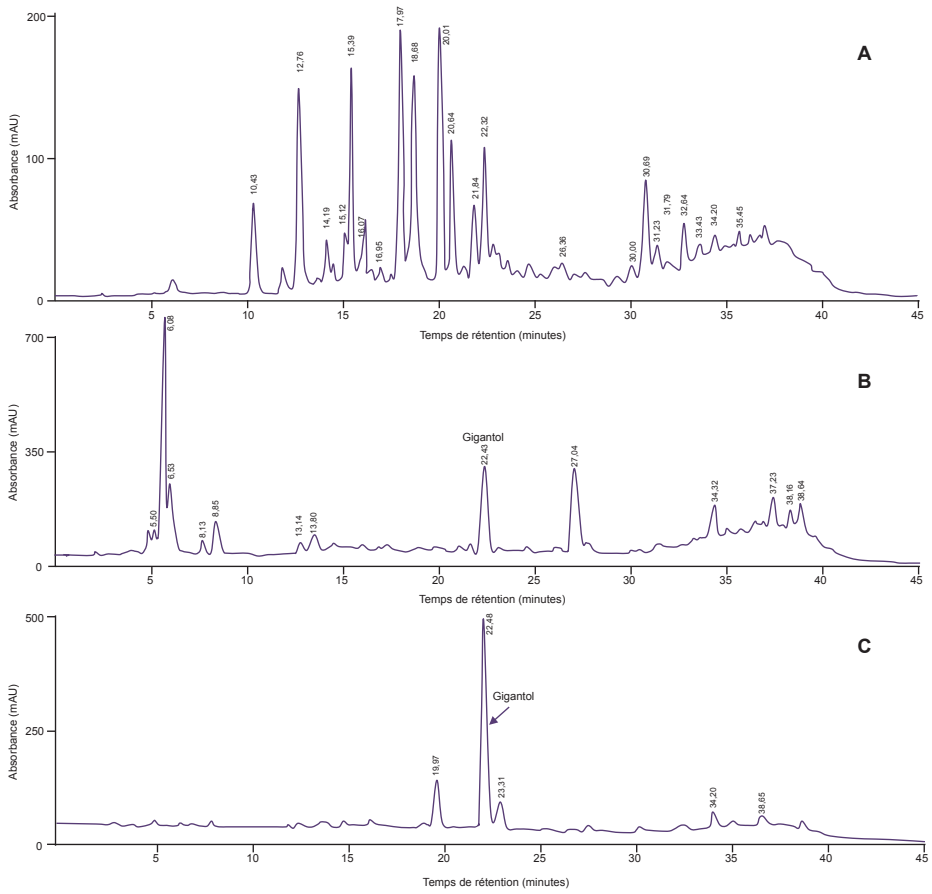


Figure II:8. Analyse CLHP de l'extrait AcOEt d'AR2268 après SPE (A), fraction 3 (B) et 4 (C) issues du fractionnement par chromatographie d'exclusion (Sephadex LH-20). Phase stationnaire: Nucleodur C18 250 x 4,6 mm i.d. 5 µm. Phase mobile eau+0,1% A.F. (A) et MeOH+0,1% A.F. (B). Gradient d'élution (temps : %B) : 0-8 min : 45% ; 10-15 min : 55% ; 18-25 min : 60% ; 35 min : 90% ; 40-45 min : 100%. Détection à 260 nm, débit 1 mL/min.

C. IV. Purification et caractérisation structurale de l'acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique

a. CLHP semi-préparative

Ayant identifié le gigantol dans la fraction 3, une partie de cet échantillon (56 mg) a été injectée deux fois en CLHP semi-préparative afin d'isoler le composé élué à 27,04 min en CLHP analytique (cf **Figure II:8**). Cette étape de purification a permis d'en obtenir environ 8 mg. Ce rendement obtenu ne reflète pas sa teneur massique dans l'extrait AcOEt de départ, car nous n'avons utilisé à chaque étape qu'une partie de chaque fraction seulement, dans le but d'une étude qualitative et non quantitative.

b. Spectre UV

Les spectres UV ont été obtenus à partir du chromatogramme CLHP de chaque molécule purifiée. Ils ont donc été mesurés dans un mélange d'eau et de méthanol acidifiés à 0,1% d'acide formique, dans les proportions correspondant à la composition du gradient au temps d'élution du composé (**Figure II:9**). Le composé isolé présente deux maxima d'absorbance: $\lambda_{max}^{MeOH/H2O}$ 225, 280 nm, caractéristiques d'un acide coumarique [Owen R. W. *et al.* 2003].

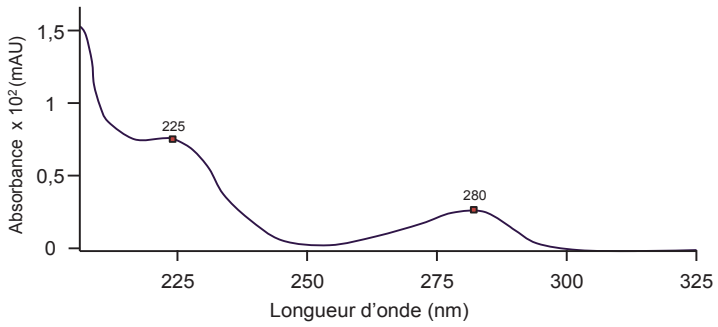


Figure II:9. Spectre UV du métabolite d'intérêt de la fraction 3.

c. Analyse HRMS

La formule brute a été obtenue indirectement en analysant la fraction 3 par la méthode de déréplication par HPLC-ESI-HRMS/MS. Le composé donnait la masse exacte de l'ion moléculaire $[M+H]^+$ avec *m/z* = 331,1541 ($C_{19}H_{22}O_5$, err. -0,42 ppm). Le spectre de masse donnait également un fragment $[M+H]^+$ avec *m/z* =165,0908 calculé comme $C_{10}H_{12}O_2$ (err. 1,56 ppm) et correspondant à une unité dihydroconiféryl.

d. Données RMN

Parallèlement à l'analyse HPLC-ESI-HRMS/MS, la structure de ce métabolite a été élucidée sans équivoque par l'analyse RMN 1D (^{1}H, ^{13}C) et 2D (NOESY, HMBC et HSQC). Les données spectrales obtenues ont été interprétées à l'aide d'un logiciel de traitement NMR Notebook (NMRtec) et les signaux ont été attribués à l'aide d'un logiciel de résolution intuitive de structures CMC-se (Bruker). Ce logiciel croise l'ensemble des données fournies des analyses mono- et bidimensionnelles et attribue les signaux et les déplacements chimiques à chaque proton et chaque carbone. En comparant les résultats aux données dans la littérature, nous avons identifié ce composé comme l'**acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique** [Tezuka Y. *et al.* 1993]. Les déplacements chimiques ont été rassemblés au sein du **Tableau II:7** selon la numérotation proposée sur la **Figure II:10**.

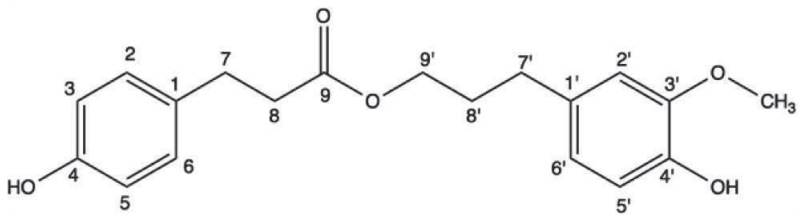


Figure II:10. L'acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique et sa numérotation.

Tableau II:7. Données RMN ^{1}H et ^{13}C (400 MHz) dans méthanol-d_4 (CD_3OD) de l'acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique isolé à partir des tiges d'*Aerides rosea.*

	Acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique	
Position	**δH mult (*J* Hz) (ppm)**	**δC (ppm)**
1	-	132,88
2	7,03 d (8,5)	130,46
3	6,68 d (8,5)	116,42
4	-	157,03
5	6,68 d (8,5)	116,42
6	7,03 d (8,5)	130,46
7	2,81 t (7,5)	31,42
8	2,58 t (7,5)	37,42
9	-	175,18
1'	-	134,37
2'	6,72 d (8,0)	113,37
3'	-	149,09
4'	-	145,88
5'	6,70 d (8,0)	116,35
6'	6,57 dd (8,0 ; 2,0)	122,05
7'	2,53 t (6,5)	32,86
8'	1,85 q (6,5)	31,82
9'	4,03 t (6,5)	65,09
3'-O-CH_3	3,81 s	56,59

Le spectre du proton montre deux groupements methylène couplés entre eux à δ 2,58 et 2,81 ppm (2H chacun, *J* = 7,5 Hz, H_2-8 et H_2-7 respectivement), de même que trois autres groupements CH_2 attribués à H_2-8' (δ 1,85 ppm, quintuplet, 2H, *J* = 6,5 Hz), H_2-7' (δ 2,53 ppm, t, 2H, *J* = 6,5 Hz) et H_2-9' (δ 4,03 ppm, t, 2H, *J* = 6,5 Hz). A champ faible, on observe des signaux entre δ 6,57 et 7,03 ppm attribués aux protons aromatiques de deux cycles benzènes distincts. Le premier étant *para* substitué (en positions 1 et 4), on peut décrire précisément un système AB avec un doublet à δ 6,68 ppm et l'autre à 7,03 ppm correspondant respectivement aux protons H-3 et H-5 (2H, *J* = 8,5 Hz) et H-2 et H-6 (2H, *J* = 8,5 Hz). Le deuxième cycle benzène est tri-substitué en position 1', 3' et 4'. On observe ainsi un doublet de doublets à δ 6,57 ppm (1H, *J* = 8,0 ; 2,0 Hz, H-6') qui montre un couplage du type *méta* avec H-2' (δ 6,72 ppm, 1H, d, *J* = 8,0 Hz) et un autre couplage du type *ortho* avec H-5' (δ 6,70 ppm, 1H, *J* = 8,0 Hz) (**Figure II:11**). Le spectre nous révèle l'existence d'un groupement méthoxyle aromatique à δ 3,81 ppm (s, 3H). Nous avons déterminé sa position en mettant en évidence une corrélation nOe avec son proton aromatique voisin à δ 6,72 ppm correspondant à H-2' substituant ainsi le cycle benzène en position 3' (**Figure II:12**).

Le spectre carbone nous montre 4 carbones quaternaires rattachés à un oxygène entre δ_C 145,88 et 175,18 ppm attribués aux carbones C-4', C-3', C-4 et C-9. Puis deux autres carbones quaternaires à δ_C 132,88 et 134,37 ppm correspondant aux C-1 et C-1', respectivement. A plus haut champ, les carbones des groupements méhylène rattachés chacun à deux protons (C-7, C-8, C-7', C-8' et C-9') se situent entre δ_C 31,42 et 65,09 ppm. Le signal du C-9', quant à lui, se retrouve plus déblindé que les autres, étant donné la proximité de la liaison ester. On peut également remarquer un signal caractéristique du carbone d'un groupement méthoxyle à δ_C 56,59 ppm (**Figure II:13**). Les spectres HMBC et HSQC nous ont servi pour confirmer l'attribution des signaux par le logiciel CMC-se et ne seront pas présentés dans cette étude.

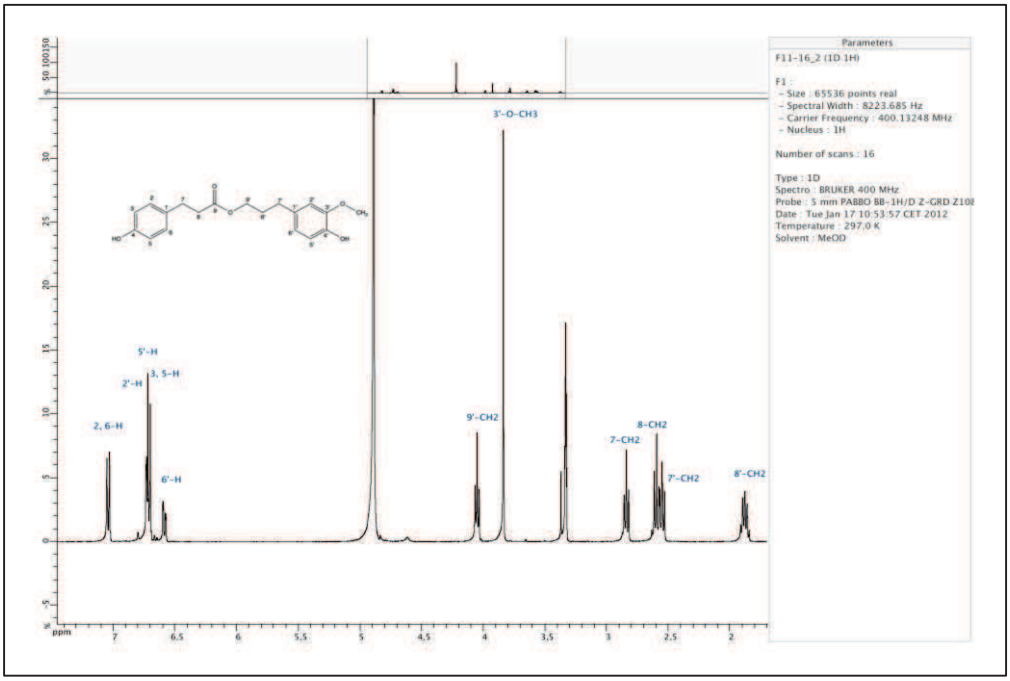


Figure II:11. Spectre RMN monodimensionnel ^{1}H de l'acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique (400 MHz, CD_3OD).

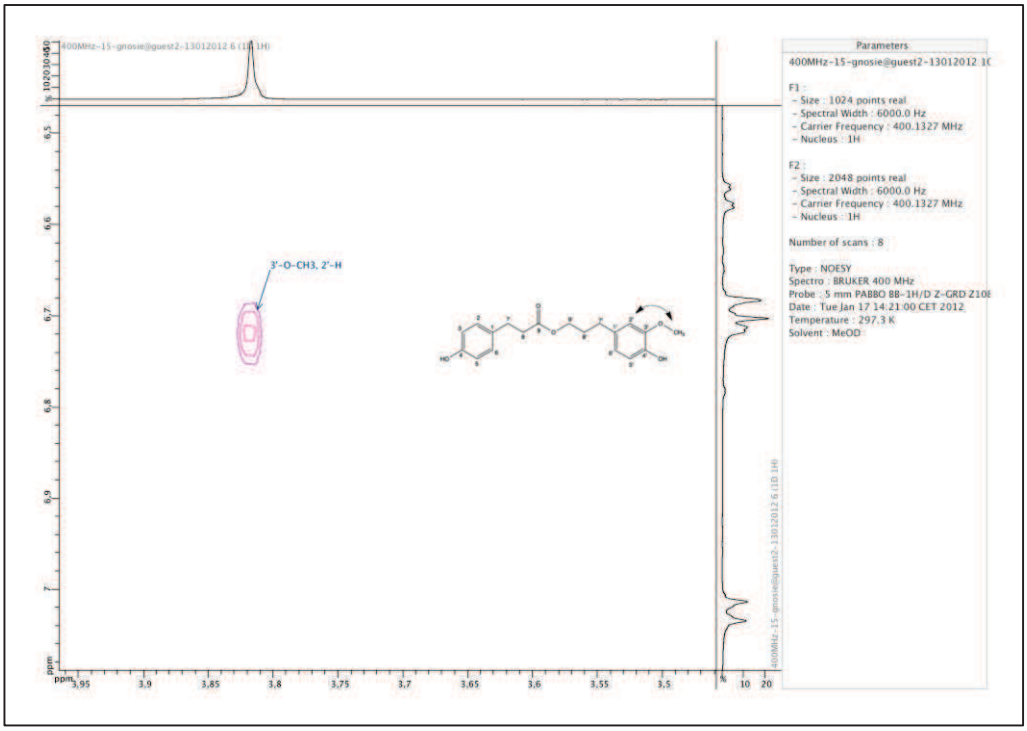


Figure II:12. Spectre RMN bidimensionnel $^{1}H/^{1}H$ NOESY de l'acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique (400 MHz, CD_3OD).

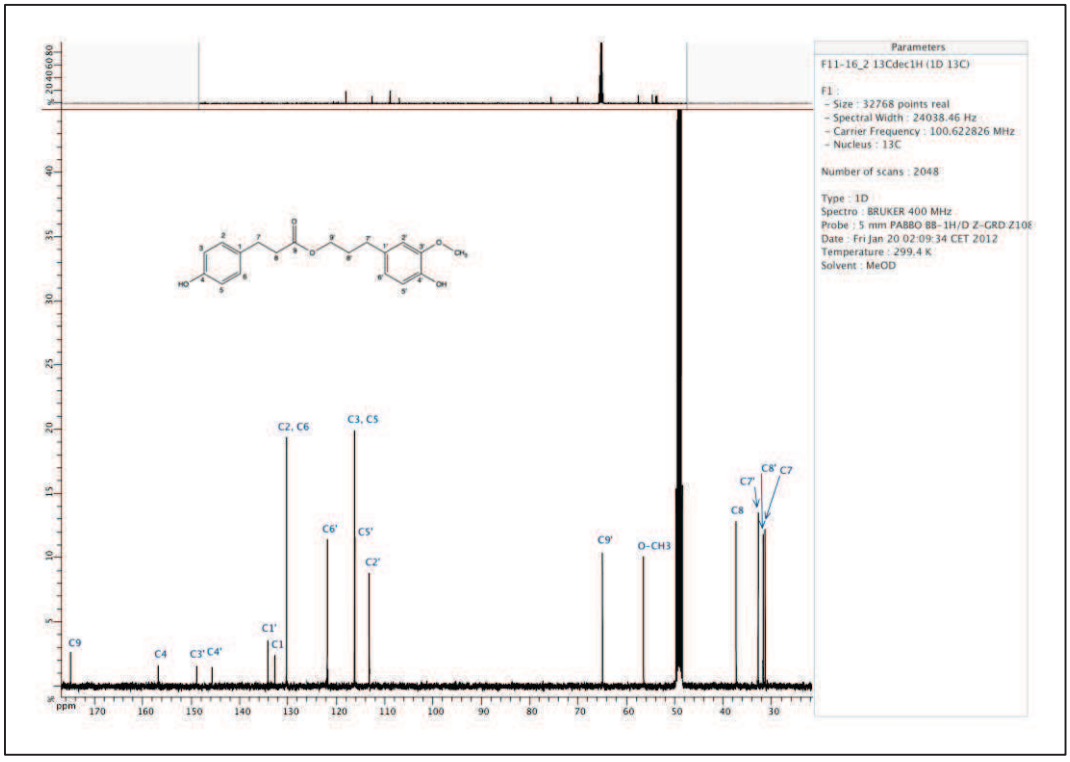


Figure II:13. Spectre RMN monodimensionnel ^{13}C de l'acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique (400 MHz, CD_3OD).

L'acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique a été identifié pour la première fois dans l'orchidée, *Ephemerantha fimbriata* [Tezuka Y. *et al.* 1993]. Son rôle au sein de la plante ainsi que ses activités biologiques ne sont pas connues à ce jour. Ce composé est composé de deux unités distinctes: l'acide dihydro-*p*-coumarique qui estérifie l'alcool dihydroconiférilique. Ces deux composés phénoliques existent plus souvent sous leur forme dehydro- dans de nombreuses plantes. Les alcools cinnamyliques proviennent de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et sont notamment des précurseurs des lignines [Boerjan W. *et al.* 2003]. Les acides phénoliques sont quant à eux de très bons anti-oxydants [Bruneton J. 2009].

C. V. Purification et caractérisation structurale de la batatasine III

a. CLHP et CCM semi-préparatives

La fraction 4 contenait également du gigantol préalablement identifié par HPLC-ESI-HR-MS/MS. Une partie de cet échantillon (90 mg) a donc été injectée quatre fois en CLHP semi-préparative afin d'isoler le composé élué à 23,31 min en CLHP analytique et proche du pic du gigantol (cf **Figure II:8**). Cette étape de purification a permis d'obtenir environ 28 mg

du mélange d'un composé inconnu et du gigantol. Une étape supplémentaire de purification par CCM semi-préparative a donc été nécessaire. Nous avons obtenu seulement 0,5 mg de ce composé purifié, ce qui nous a conduit à adapter notre méthodologie pour obtenir des spectres RMN à l'aide d'une sonde capillaire capNMR (Protasis).

b. Spectre UV

Le spectre UV du composé isolé a été extrait directement de son chromatogramme CLHP de chaque molécule purifiée. Il a donc été mesuré dans un mélange d'eau et de méthanol acidifiés à 0,1% d'acide formique, dans les proportions correspondant à la composition du gradient au temps d'élution dudit composé (**Figure II:14**). Il présente deux maxima d'absorbance: $\lambda_{max}^{MeOH/H2O}$ 202, 280 nm, caractéristiques d'un noyau bibenzyle [Simmler C. 2010].

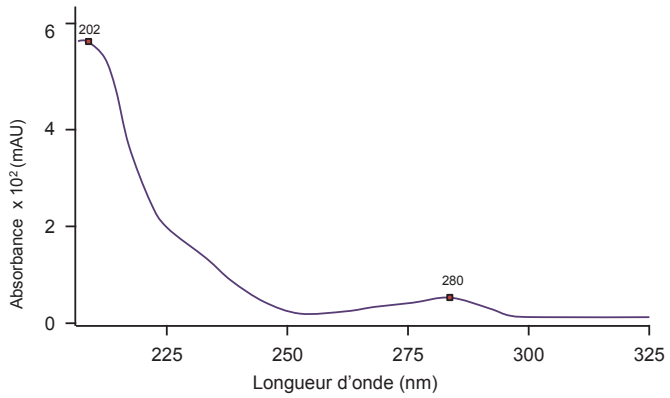


Figure II:14. Spectre UV du composé d'intérêt de la fraction 4.

c. Analyse HRMS

La formule brute a été obtenue indirectement en analysant la fraction 4 par la méthode de déréplication par HPLC-ESI-HRMS/MS. La formule brute $C_{15}H_{16}O_3$ (err. 0,76 ppm) indique la masse exacte de l'ion moléculaire $[M+H]^+$ avec *m/z* = 245,1170. Le spectre de masse donne également un fragment $[M+Na]^+$ avec *m/z* =267,0992 calculé comme $C_{15}H_{16}NaO_3$ (err. 0,03 ppm) et correspondant à un adduit sodium.

d. Données RMN

Parallèlement à l'analyse HPLC-ESI-HRMS/MS, la structure de ce métabolite a été élucidée sans équivoque par l'analyse RMN 1D (^{1}H) et 2D (g-NOESY, g-HSQC et g-HMBC).

Le métabolite a été identifié comme étant la **batatasine III** ou 3,3'-dihydroxy-5-méthoxybibenzyl, selon la numérotation et dénomination IUPAC des bibenzyles). S'agissant d'une molécule connue, l'ensemble des données spectrales obtenues a pu être comparé avec celles de la littérature [Chen Y *et al.* 2008b, Majumder P. L. *et al.* 1991 et Sachdev K. *et al.* 1986]. Rappelons que les déplacements chimiques et la multiplicité des signaux du spectre du proton peuvent être sujets à des variations en fonction du solvant dans lequel la mesure est effectuée. Nous avons analysé notre échantillon dans l'acétone-d_6, dans lequel aucune donnée publiée n'est disponible. La quantité et la concentration de l'échantillon peuvent également jouer un rôle important, notamment dans la résolution et le rapport signal sur bruit du spectre carbone. Celui-ci ne nous a pas permis de déterminer les déplacements chimiques des carbones directement. Par conséquent, nous les avons obtenus indirectement à partir des spectres bidimensionnels g-HSQC et g-HMBC, afin de confirmer le squelette carboné. Les spectres RMN mono- et bidimensionnels obtenus ont été interprétés à l'aide d'un logiciel de traitement NMR Notebook (NMRtec). Les déplacements chimiques ont été rassemblés dans le **Tableau II:8** en respectant la numérotation des dérivés phénanthréniques rappelée en B de la **Figure II:15**.

Tableau II:8. Données RMN ^{1}H et ^{13}C (500 MHz) dans acétone-d_6 (CD_3COCD_3) de la batatasine III isolée à partir des tiges d'*Aerides rosea.*

	Batatasine III		
Position	**δH mult (*J* Hz) (ppm)**	**δC HSQC (ppm)**	**HMBC**
1	6,31 t (2,3)	106,2	
2	-	161,5	2-O-CH_3
3	6,24 t (2,3)	100,1	
4	-	154,1	H: 4a
4a	6,33 t (2,3)	109,3	
4b	6,70 ddd (7,8; 2,1; 0,8)	120,7	
5	7,08 t (7,8)	130,1	
6	6,65 ddd (7,8; 2,1; 0,8)	113,8	
7	-	154,0	H: 8
8	6,72 t (2,1)	116,3	
8a	-	144,1	H: 5, 9
9	2,80 br s	38,7	
10	2,80 br s	38,7	
10a	-	144,1	H: 10
2-O-CH_3	3,71 s	55,5	

Le spectre du proton montre des signaux de sept protons aromatiques entre δ 6,24 et 7,08 ppm. Nous pouvons observer trois triplets attribués aux protons H-1 (δ 6,31, 1H, *J* = 2,3

Hz), H-3 (δ 6,24, 1H, *J* = 2,3 Hz) et H-4a (δ 6,33, 1H, *J* = 2,3 Hz) appartenant à un cycle *méta* di-substitué. La présence d'un doublet de doublets de doublets a été attribué à H-6 (δ 6,65, 1H, *J* = 7,8; 2,1; 0,8 Hz) qui couple avec deux protons de façon non équivalente, H-4b et H-8, en position méta et un proton H-5 en position ortho. Le proton H-8 couple avec H-6 et H-4b avec une constante de couplage *méta* pour donner un triplet à δ 6,72 (1H, *J* = 2,1 Hz). Le doublet de doublets de doublets (ddd) à δ 6,70 ppm a été attribué à H-4b (1H, *J* = 7,8; 0,8 Hz) couplant avec H-8 et H-6 en position *méta* de façon non équivalente et avec H-5 (δ 7,08, t, 1H, *J* = 7,8 Hz) en position *ortho*. Le spectre révèle l'existence de deux groupements méthylène qui se traduit par un signal à δ 2,8 ppm (4H, br s, H_2-9 et H_2-10) (**Figure II:16**). L'expérimentation g-NOESY confirme l'attribution des signaux aux protons H-4b et H-6 de façon non ambiguë, car on peut observer une corrélation entre le signal des protons H_2-9 et H_2-10 (δ 2,80) avec celui du proton H-4b (δ 6,70 ppm). Il souligne également un couplage des protons méthoxyl (δ 3,72, 3H, s) avec les protons H-1 (δ 6,31 ppm) et H-3 (δ 6,24 ppm) (**Figure II:17**). Selon le spectre g-HMBC, le signal des protons du groupement méthoxyl couple avec C-2 (δ_C 161,54) confirmant que ce groupement substitue le cycle aromatique en position 2 (**Figure II:18**).

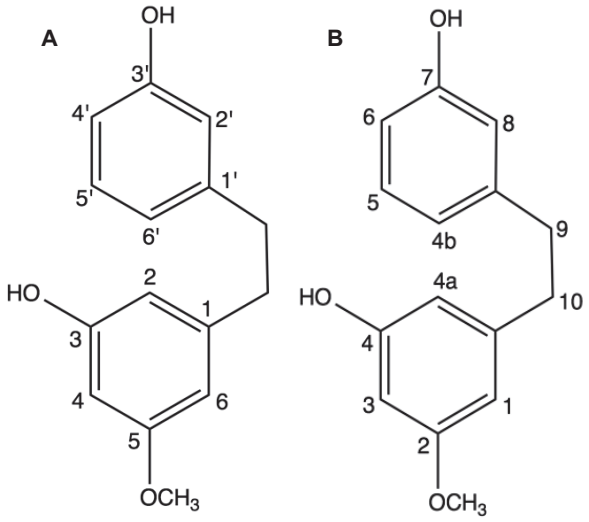


Figure II:15. Structure de la batatasine III selon la numérotation des dérivés bibenzyls (A) et des dérivés phénanthréniques (B).

Les déplacements chimiques des carbones rattachés directement à un proton ont été obtenus à partir du spectre g-HSQC. Il nous montre 2 carbones des groupements méthylène rattachés chacun à deux protons (C-9 et C-10) à δ_C 38,7 ppm. On peut ensuite observer des signaux des carbones du squelette tri-substitué correspondant aux carbones C-4a, C-3 et C-1 (δ_C 109,3 ; δ_C 100,1 et δ_C 106,2 ppm, respectivement). Les signaux des autres carbones

aromatiques C-4b, C-5, C-6 et C-8 se trouvent entre δ_C 113,8 et 130,1 ppm. On peut également remarquer un signal caractéristique du carbone d'un groupement méthoxyle à δ_C 55,5 ppm (**Figure II:19**). Le spectre g-HMBC nous a permis de déterminer les déplacements chimiques des carbones quaternaires donnés par la corrélation avec les protons voisins. On peut ainsi observer le carbone C-2 (δ_C 161,5 ppm) couple avec les protons du groupement méthoxyl (δ 3,72), le C-4 portant un groupement hydroxyl (δ_C 154,1 ppm) avec H-4a (δ 6,33 ppm), le C-7 (δ_C 154,0 ppm) avec H-8 (δ 6,72 ppm), le C-8a (δ_C 115,55 ppm) avec les protons H-5 (δ 7,08 ppm) et H_2-9 (δ 2,80 ppm), et enfin le C-10a (δ_C 105,82 ppm) avec les protons H_2-10 (δ 2,80 ppm) (**Figure II:18**).

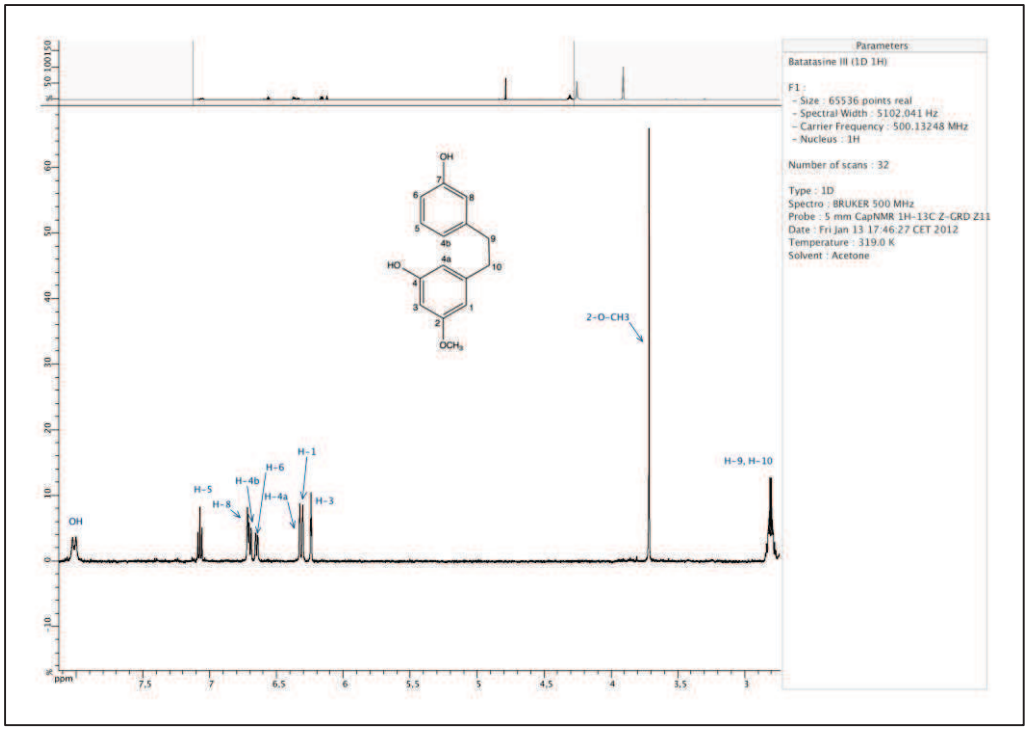


Figure II:16. Spectre RMN monodimensionnel ^{1}H de la batatasine III (500 MHz, CD_3ODCD_3).

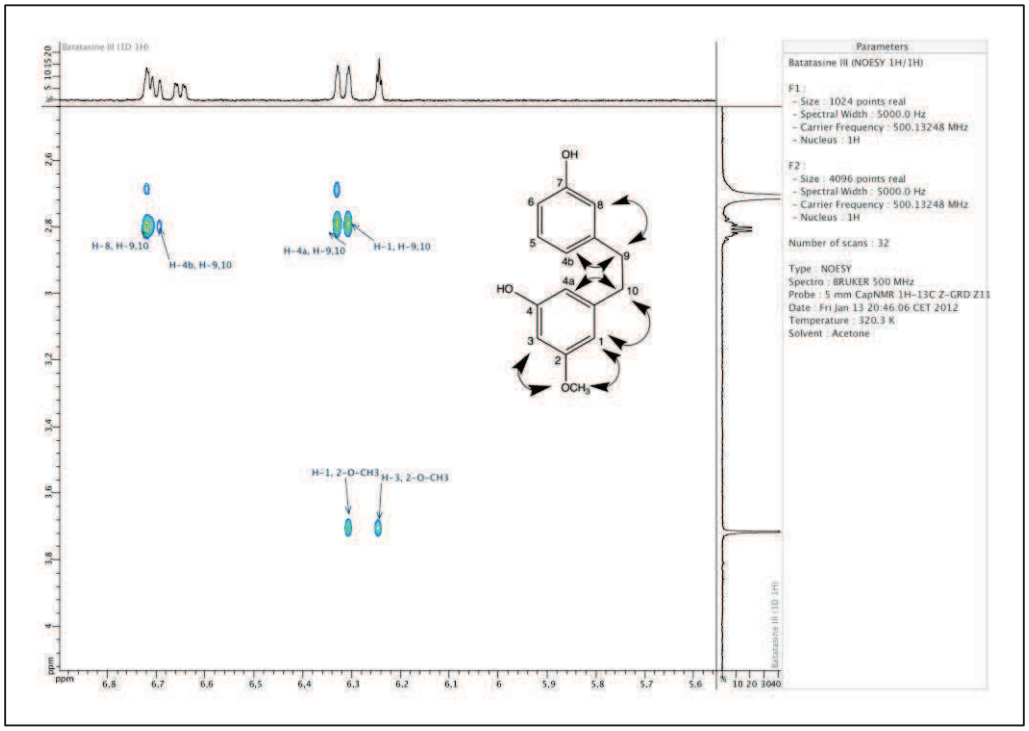


Figure II:17. Spectre RMN bidimensionnel $^{1}H/^{1}H$ NOESY de la batatasine III (500 MHz, CD_3ODCD_3).

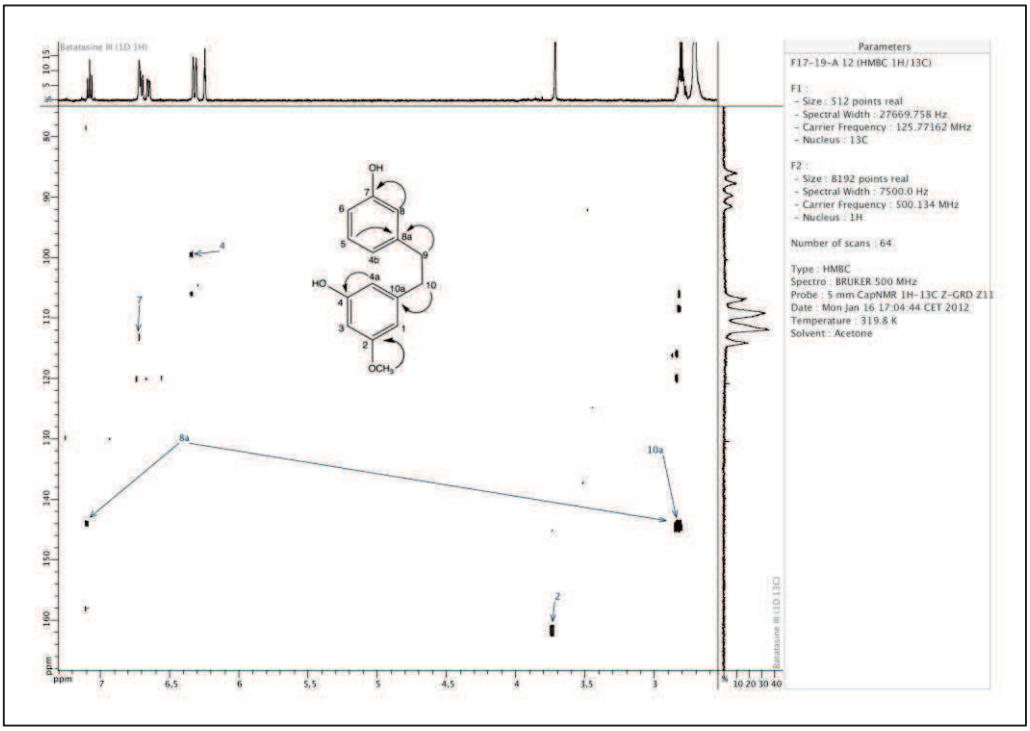


Figure II:18. Spectre RMN bidimensionnel $^{1}H/^{13}C$ HMBC de la batatasine III (500 MHz, CD_3ODCD_3).

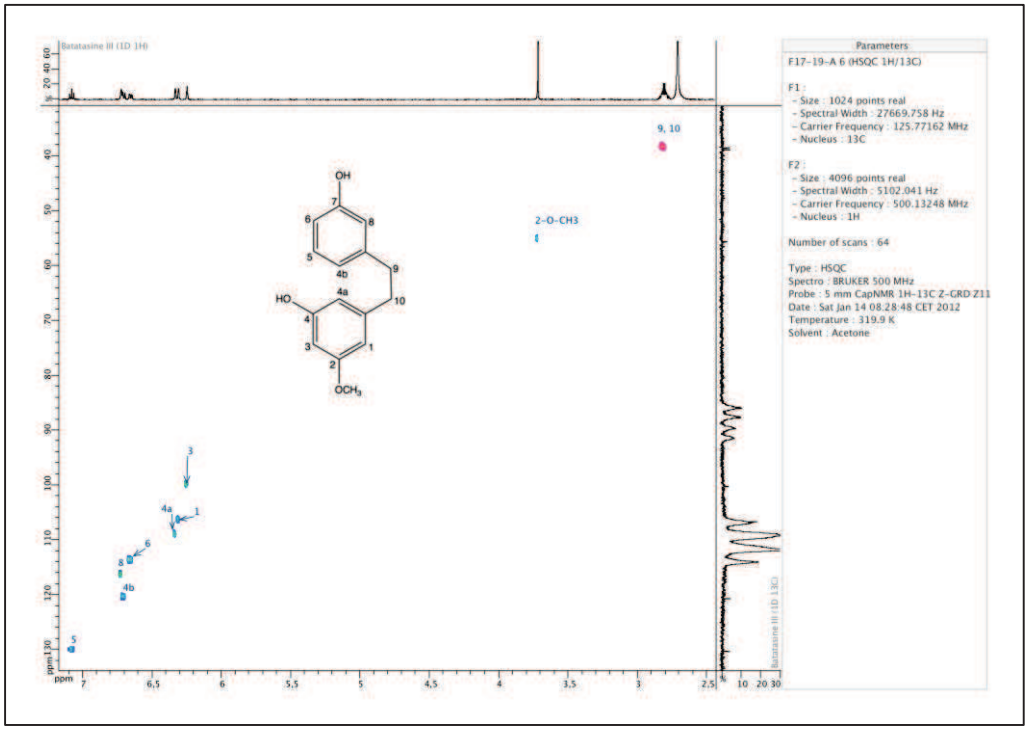


Figure II:19. Spectre RMN bidimensionnel $^{1}H/^{13}C$ HSQC de la batatasine III (500 MHz, CD_3ODCD_3).

Discussion:

La batatasine III est un dérivé bibenzyle relativement fréquent au sein des Orchidacées. Il a en effet déjà été identifié dans diverses espèces comme:

- *Cirrhopetalum andersonii* [Majumder P. L. *et al.* 1991],
- *Arundina bambusifolia* [Majumder P. L. *et al.* 1993a]
- *Coelogyne ovalis* [Sachdev K. *et al.* 1986]
- *Bulbophyllum reptans* et *B. odoratissimum* [Majumder P. L. *et al.* 1999 et Chen Y. *et al.* 2008b].

Différentes espèces du genre *Dendrobium* en contiennent également:

- *D. draconis* [Sritularak B. *et al.* 2011]
- *D. gratiosissimum* [Zhang C-F. *et al.* 2008]
- *D. cariniferum* [Chen Y. *et al.* 2008]
- ou encore *D. aphyllum* [Chen Y. *et al.* 2008a].

Plus récemment, ce composé a également été répertorié dans le genre *Otochilus* [Wang L. *et al.* 2012 et Shi X. *et al.* 2010].

Dans la littérature, la batatasine III est décrite comme possédant des propriétés:

- anti-oxydante [Sritularak B. *et al.* 2011],
- phytotoxique et potentiellement herbicide [Hernandez-Romero Y. *et al.* 2005],
- anti-bactérienne et anti-fongique [Matsuura H. *et al.* 1995]
- inhibitrice de la photosynthèse en affectant l'assimilation du CO_2 dans les feuilles *Spinacia oleracea* (épinards) [Wallstedt A. *et al.* 2002].

Nous pouvons constater que ce métabolite est donc largement répertorié dans la littérature. En effectuant nos recherches bibliographiques, nous nous sommes aperçus qu'une erreur structurale s'est glissée dans certaines publications. Dans l'article de review sur les usages traditionnels des orchidées de Gutiérrez R. M. (2009) paru dans *Journal of medicinal plants research* (2009), cité plusieurs fois dans cette étude, la batatasine III est répertoriée comme étant un constituant d'*Epidendrum rigidum*. Cependant, sa structure a été mal reproduite à partir de la référence citée par Gutiérrez [Hernandez-Romero Y. *et al.* 2005]. Cette même erreur a été reproduite par Hossain M. M. dans son article paru dans *Fitoterapia* (2011).

C. VI. Analyse des fractions Sephadex 7, 9 et 10

Afin d'approfondir l'investigation des tiges d'*Aerides rosea,* nous avons voulu identifier le contenu des autres fractions 6 à 10. Comme nous avons décrit précédemment, la méthoxycoelonine, la coelonine et l'imbricatine ont été éluées de la colonne de gel de Sephadex ensemble puis réunies dans la même fraction 6 (F6). Notre intérêt s'est donc tourné vers les fractions suivantes. La F7 a été retenue car elle renferme majoritairement l'imbricatine, accompagnée de trois autres composés minoritaires que nous avons décidé d'identifier. L'imbricatine est aussi présente dans la F8, combinée à un autre métabolite inconnu, mais plus concentré dans la fraction suivante, F9. Nous nous sommes donc intéressés à celle-ci qui contenait des métabolites communs avec F10. Par conséquent, F9 et F10 ont été réunies pour la suite de nos analyses afin d'obtenir une quantité plus élevée de ces métabolites. La possibilité d'employer des techniques de purification classiques, comme la CLHP et la CCM semi-préparative a été écartée, car ces étapes engendrent des pertes d'échantillon (pertes estimées à environ 25%), notamment en raison de phénomènes d'adsorption sur la phase stationnaire. Ce qui diminue considérablement les chances d'isoler quelques milligrammes de chaque métabolite purifié nécessaires pour des analyses RMN classiques. Nous avons donc fait appel à une technique de pointe récemment acquise à la Faculté, le couplage HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN. Son principe a été expliqué dans le chapitre introduction (cf pages 50-55). Cette approche permet d'identifier "on-line" le contenu

d'un mélange, sans la nécessité d'isoler chaque métabolite individuellement. Après l'identification de cinq stilbénoïdes dans les tiges *d'Aerides rosea*, il était très probable d'en retrouver d'autres dans ces deux fractions sélectionnées. La démarche qui nous a amené à identifier cinq dérivés phénanthréniques, dont deux nouvellement décrits, sera donc expliquée étape par étape dans cette partie.

a. Choix de la colonne CLHP et optimisation des conditions d'élution

Une des premières étapes de cette étude était le choix de la colonne chromatographique compatible avec le système couplé. Nous avons exclu l'utilisation de la colonne Nucleodur C18ec de 250 x 4,6 mm i.d. x 5 µm (Macherey Nagel) employée pour les analyses précédentes. Cette colonne, trop longue, n'est en effet pas adaptée pour un couplage avec la spectrométrie de masse. Travaillant sur des fractions simplifiées, une longueur de 250 mm n'était pas forcément nécessaire. Nous avons cherché à raccourcir la durée de l'analyse pour consommer le moins de solvants possible en maintenant une bonne séparation. De plus, cette colonne Nucleodur ne permet pas d'obtenir des pics assez fins lorsqu'on augmentait le volume d'injection. C'était un des facteurs importants pour notre analyse, car une haute capacité de charge réduit ensuite le nombre d'injections répétées pour concentrer et piéger chaque métabolite sur les cartouches SPE. Pour cette raison, nous avons écarté une colonne Kinetex C18 100 x 2,1 mm x 2,6 µm (Phenomenex), qui serait parfaitement compatible avec la SM, mais dont la porosité génère trop de pression du système lors d'une charge trop importante. Nous avons ainsi recherché un compromis entre tous les paramètres et la colonne correspondant à tous les critères (durée de l'analyse, capacité de charge, finesse des pics, résolution, consommation des solvants, reproductibilité des séparations) a été la colonne Sunfire C18 150 x 4,6 mm x 3,5 µm (Waters).

Afin de comparer les fractions entre elles et avec l'extrait AcOEt et afin de transposer ces conditions sur le système couplé, nous avons donc modifié les conditions chromatographiques pour éluer les deux fractions F7 (nommée F1 dans la publication soumise) et F9-10 (nommée F2) sur cette colonne et nous avons déterminé les composés d'intérêt à identifier. Ils ont été annotés **1** à **5** (**Figure II:20**).

Le gradient d'élution a ensuite été transposé et optimisé individuellement pour chaque fraction sur le chromatographe du couplage HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN (cf page 116).

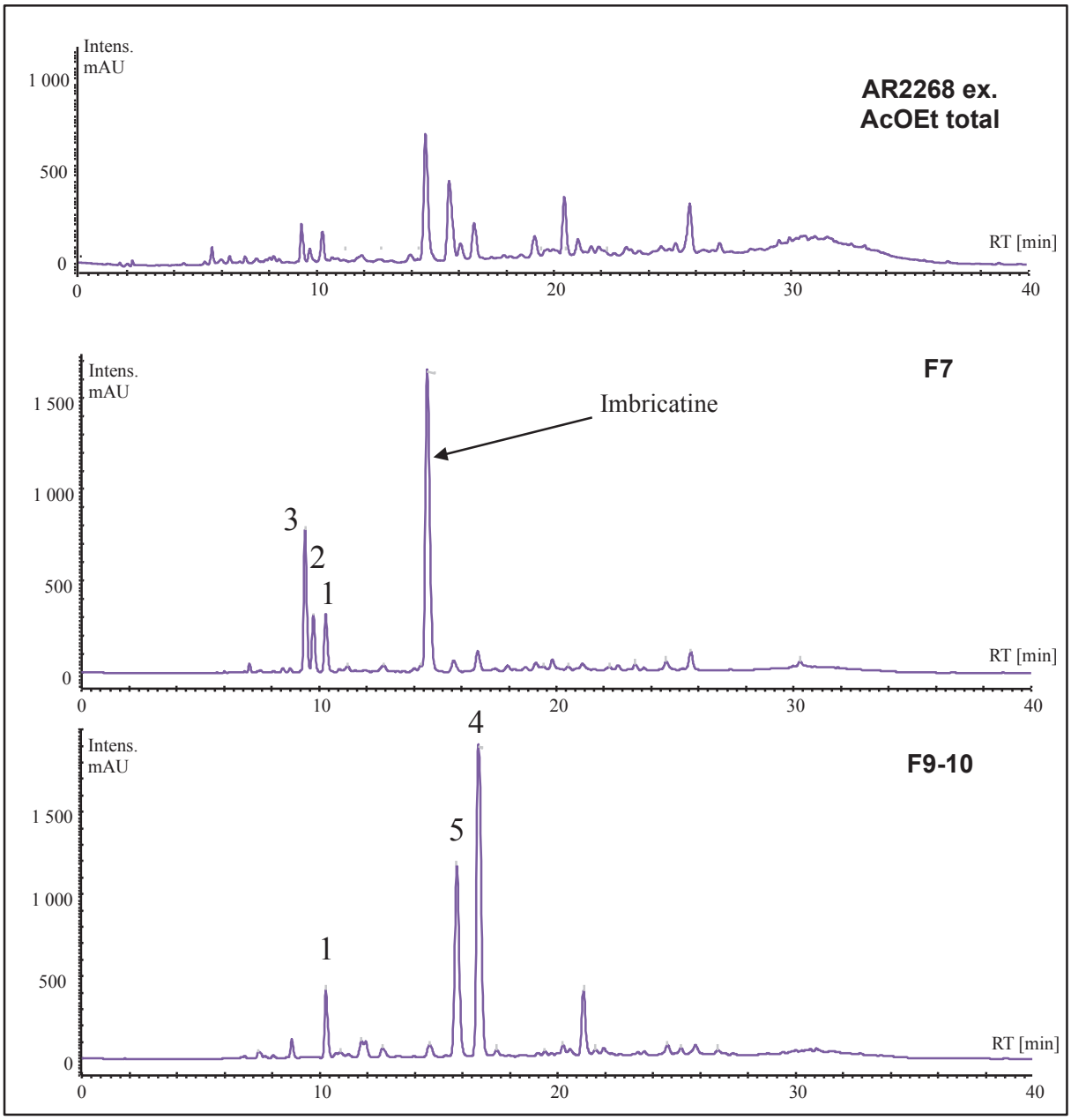


Figure II:20. Analyse CLHP de l'extrait AcOEt d'AR2268 après SPE sur la colonne Sunfire 150 x 4,6 mm x 3,5 µm (haut), fraction 7 (milieu) et fraction 9-10 (bas) issues du fractionnement par chromatographie d'exclusion (Sephadex LH-20). Phase mobile eau+0,1% A.F. (A) et ACN+0,1% A.F. (B). Gradient d'élution (temps : %B): 0 min, 20% B; 3 min, 30% B; 11 min, 35% B; 25 min, 50% B; 37-40 min, 100% B. Détection à 260 nm, débit 1 mL/min et température de la colonne 30°C. Concentration des échantillons: 5 mg/mL.

a. Analyse MS et HRMS/MS

Comme déjà expliqué dans le chapitre Introduction, afin de limiter la saturation du spectromètre de masse, seulement 5% de l'échantillon sont analysés pour obtenir la masse

de chaque pic issu de la séparation chromatographique grâce à un système de "split" (cf **Figure I:21**, page 58). L'analyseur de masse sur ce couplage est de type trappe à ions et ne permet pas de déterminer la formule brute des métabolites. Cependant, cette analyse fournit la masse de chaque produit et permet donc de contrôler son piégeage sur des cartouches SPE, sans que deux pics soient confondus. La formule brute est obtenue indirectement en analysant chaque fraction par la méthode de déréplication par HPLC-ESI-HRMS/MS.

c. Piégeage des composés d'intérêt et leur élution vers la capNMR

Pour piéger chaque composé sur les cartouches SPE, nous pouvons utiliser deux types de signaux: celui provenant du détecteur DAD et l'autre provenant de l'analyse par le spectromètre de masse. Nous pouvons ainsi paramétrer le piégeage en fonction du temps de rétention en CLHP ou de la masse du composé. Nous injectons généralement les échantillons à 5 mg/mL dissous dans du MeOH. Pour maintenir la résolution et la bonne séparation chromatographique, le volume maximal d'injection a été de 20 µL. Au-delà, le volume de MeOH injecté en tête de colonne peut perturber le gradient d'élution et l'échantillon risque de ne pas être retenu et par conséquent ne pas être séparé. Ce volume entraîne environ 100 µg d'échantillon. La quantité de chaque métabolite est ensuite estimée en calculant la moyenne entre les proportions (en %) de chaque pic par rapport au total du chromatogramme CLHP et SM. Pour obtenir des quantités suffisantes de chaque analyte, une multi-injection est souvent nécessaire. Chaque composé est piégé plusieurs fois sur une même cartouche SPE. Le choix de la phase stationnaire est donc important, car elle doit être capable de retenir le composé après chaque injection afin de concentrer une quantité suffisante et obtenir le meilleur rapport signal sur bruit lors de l'acquisition d'un spectre RMN. Une pompe additionnelle "make-up" est placée en sortie de colonne CLHP et rajoute continuellement de l'eau avec un débit 3 fois supérieur par rapport au débit d'élution chromatographique. Cette dilution de l'échantillon avant son arrivée sur les cartouches SPE permet de limiter ainsi son relargage prématuré et d'augmenter sa concentration. Cette étape est contrôlée par un détecteur UV supplémentaire à la sortie des cartouches SPE. L'absence du signal confirme une bonne rétention de l'analyte.

La structure des composés contenus dans un mélange de produits naturels est souvent inconnue au départ. On peut donc difficilement choisir le type de la phase stationnaire et sa compatibilité avec l'échantillon analysé en fonction des paramètres CLHP. Leur comportement sur une phase donnée est donc difficile à prédire en se basant seulement sur le temps de rétention. La polarité de la phase stationnaire n'est pas le seul facteur à prendre en considération. Il existe également différentes tailles des cartouches

(différents diamètres et hauteurs). Le choix dépend de la sonde RMN utilisée et son volume actif de mesure [Sandvoss M. *et al.* 2005]. Plus la cartouche sera grande, plus il faudra de solvant pour décrocher les analytes de la SPE. L'intérêt du multi-piégeage est alors réduit, car malgré la concentration du composé sur la cartouche, il va être dilué dans un volume de solvant supérieur au volume actif de la sonde. Dans notre cas, nous avons utilisé une sonde capillaire capNMR (Protasis) dont le volume actif est seulement de 5 µL, ce qui nous a amené à utiliser des cartouches de 10 x 1 mm. D'autres paramètres entrent également en jeu, comme le débit d'élution ou le choix du solvant deutéré, leur influence a été évaluée par exemple par l'équipe de Clarkson C [Clarkson C. *et al.* 2007].

Deux types de phases stationnaires ont été testés afin d'évaluer leur capacité de concentration et de rétention des composés d'intérêt. Entre une phase inverse C18 classique et une phase HLB (hydrophilic-lipophilic-balanced, conçue à partir de N-vinylpyrrolidone hydrophile et divinylebenzène lipophile), de meilleurs résultats ont été obtenus avec la deuxième. Suspectant la présence d'autres dérivés phénanthréniques dans l'extrait des tiges *d'Aerides* rosea, il s'agit de composés de polarité moyenne. Il a été démontré que la phase C18 était plus efficace pour des composés moins polaires [Clarkson C. *et al.* 2007]. Ainsi, trois injections de 20 µL ont été suffisantes pour concentrer chaque composé sur une cartouche HLB 10 x 1 mm contre huit sur C18, avec laquelle nous n'avons pas obtenu des résultats satisfaisants.

Après un piégeage réussi des composés **1** à **5**, chacun a été élué avec 122 µL de méthanol deutéré vers la sonde capNMR d'un volume total de 10 µL et un volume actif de 5 µL et analysé sur un spectromètre 500 MHz afin d'obtenir des spectres mono- et bidimensionnels et élucider la structure de chaque métabolite.

C. VII. Caractérisation structurale des composés 1 à 5 contenus dans les fractions 7 et 9-10

Les dérivés phénanthréniques identifiés dans ces deux fractions ont pu être analysés par différentes techniques spectrométriques qui composent le couplage HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN afin d'assurer leur caractérisation structurale. La présentation des résultats est basée sur le principe de comparaison des données spectroscopiques des différents stilbénoïdes isolés et identifiés. L'objectif est de pouvoir présenter les résultats de caractérisation structurale sans employer de codification particulière susceptible d'alourdir la lecture de prochains paragraphes. Ainsi, leur structure, la numérotation des atomes de carbone proposée ainsi que leur nom chimique sont présentés sur la **Figure II.21**. Nous

avons identifié deux composés nouveaux , des dérivés phénanthréniques que nous avons baptisés ***aérosanthrène*** (1) et ***aérosine*** (2). Pour simplifier la lecture de ce document, nous allons employer ces deux noms triviaux.

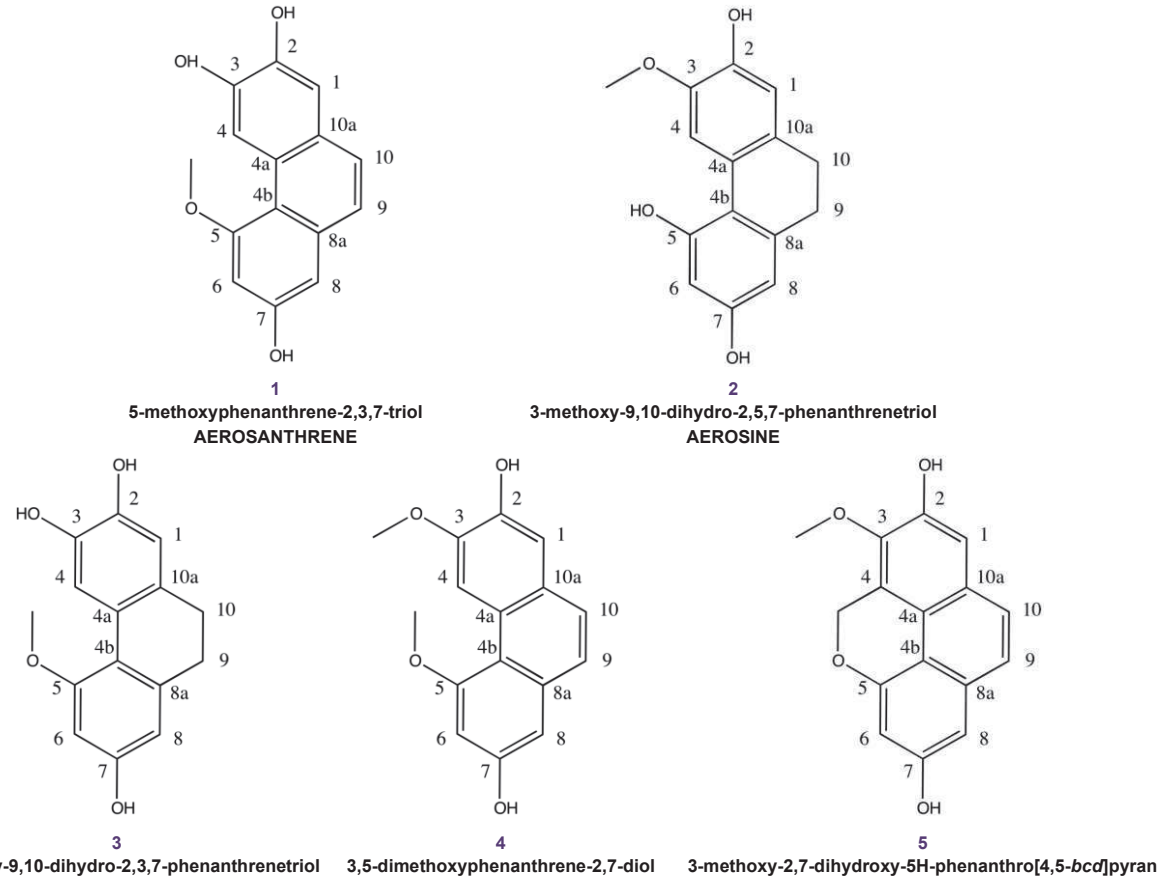


Figure II:21. Corrélation entre numérotation / structure et dénomination des 5 dérivés phénanthréniques identifiés dans les tiges d'*Aerides rosea.*

a. Spectres UV

Les 9,10-dihydrophénanthrènes possèdent trois longueurs d'onde maximales d'absorption. Ils ont un aspect général en "bosse de chameau", comme observé pour l'aérosine (2) et le 5-méthoxy-9,10-dihydro-2,3,7-phénanthrènetriol (3). Les phénanthrènes, avec le cycle central insaturé, n'ont qu'un seul maximum aux alentours de 260 nm. L'allure de leurs spectres UV est superposable, comme observé pour l'aérosanthrène (1) et le 3,5-diméthoxyphénanthrène-2,7-diol (4). Les spectres UV des 9,10-dihydro phénanthropyranes ont généralement la même allure que les spectres des 9,10-dihydrophénanthrènes. Cependant, dans notre cas (composé 5), le cycle central étant saturé, il renforce le deuxième maximum aux alentours de 270 nm (**Figure II:22**).

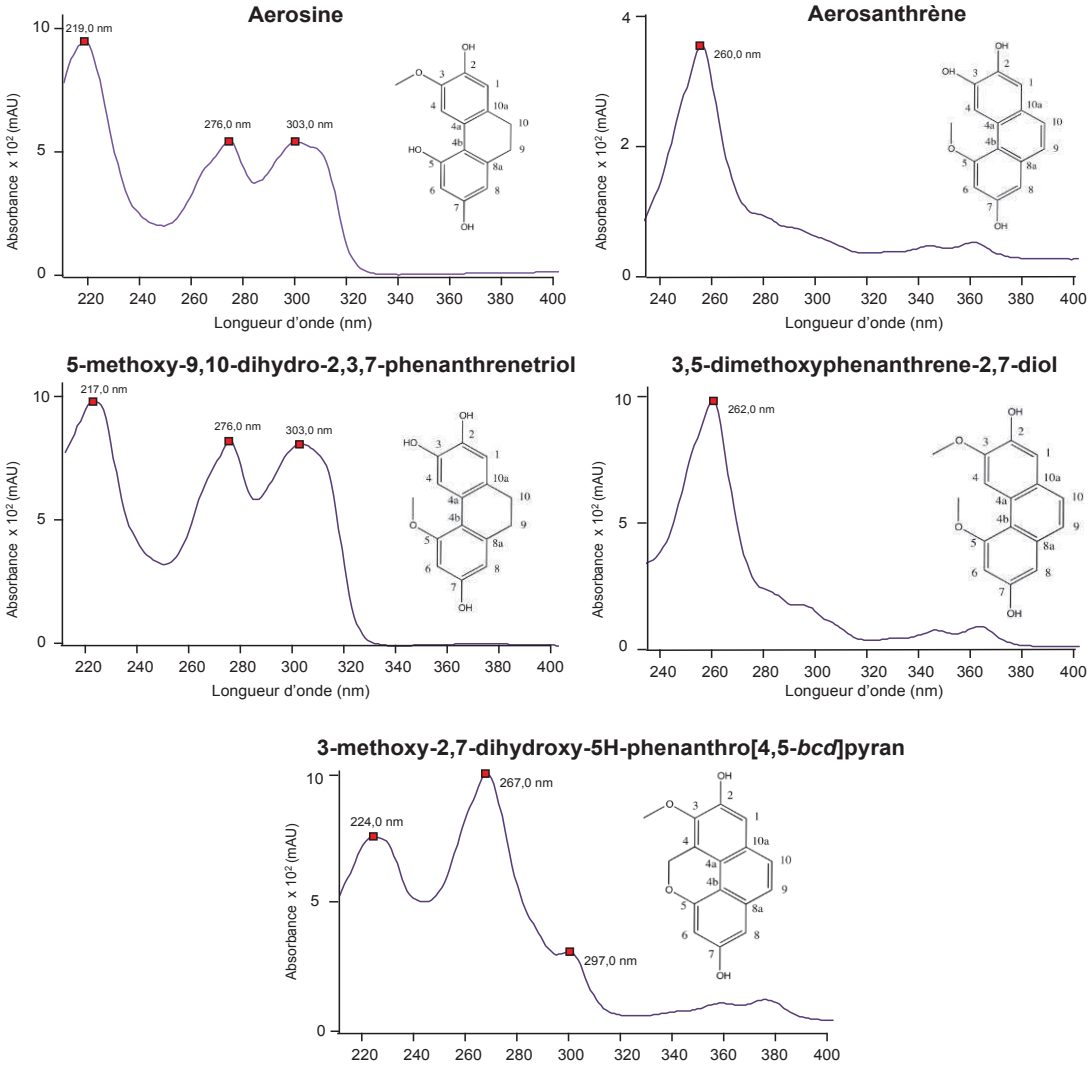


Figure II:22. Spectres UV des 5 dérivés phénanthréniques identifiés dans les tiges d'*Aerides rosea*.

b. Données MS

L'analyse HPLC-ESI-HRMS/MS, indépendante du couplage HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN, nous a permis d'obtenir la formule brute de chaque métabolite, ce qui a renforcé notre hypothèse qu'il s'agissait de dérivés phénanthréniques proches.

L'**aérosine** et le **5-méthoxy-9,10-dihydro-2,3,7-phénanthrènetriol** (**3**) ont la même formule brute, $\mathbf{C_{15}H_{14}O_4}$ avec $[M+H]^+$ *m/z* = 259.0970 (err. -1.99 ppm) et 259.0972 (err. -2.76 ppm), respectivement, suggérant deux dérivés du 9,10-dihydrophénanthrène substitués avec trois groupements hydroxyl et un méthoxyl.

La formule brute de l'**aérosanthrène** se différencie des deux précédentes par deux atomes d'hydrogène en moins (**$C_{15}H_{12}O_4$**; $[M+H]^+$ at *m/z* = 257.0806, err. 0.92 ppm), pouvant correspondre à l'insaturation totale du squelette carboné d'un dérivé phénanthrénique.

La formule brute du **3,5-diméthoxyphénanthrène-2,7-diol** (**4**) (**$C_{16}H_{14}O_4$**, $[M+H]^+$ *m/z* = 271.0955, err. 3.64 ppm) suggère la présence d'une structure similaire à l'**aérosanthrène** avec un groupement méthoxyl à la place d'un hydroxyl. Le **3-méthoxy-2,7-dihydroxy-5H-phénanthro[4,5-*bcd*]pyran** (**5**) a un l'ion pseudomoléculaire à *m/z* = 269.0792 et sa formule brute a été calculée pour **$C_{16}H_{12}O_4$** (err. 6.08 ppm).

c. Spectres RMN

La comparaison des données spectrales obtenues à partir des spectres 1D (^{1}H) et 2D (NOESY) aux données spectrales précédemment publiées a permis de confirmer l'identité:

- du **5-méthoxy-9,10-dihydro-2,3,7-phénanthrènetriol** (**3**) [Leong Y-W. *et al.* 1999],
- du **3,5-diméthoxyphénanthrène-2,7-diol** (**4**) [Leong Y-W. *et al.* 1997]
- et du **3-méthoxy-2,7-dihydroxy-5H-phénanthro[4,5-*bcd*]pyrané** (**5**) [Manako Y. *et al.* 2001].

L'ensemble des données de déplacements chimiques de ces trois composés a été rassemblé dans un même tableau (**Tableau II:9**).

Leurs spectres du proton respectifs montrent des composés structurellement très proches. On peut observer trois signaux caractéristiques des protons aromatiques attribués à H-1, H-6 et H-8 entre δ 6,38 et 7,16 ppm. On peut remarquer un singulet sur les spectres du **5-méthoxy-9,10-dihydro-2,3,7-phénanthrènetriol** (**3**) et du **3,5-diméthoxyphenanthrène-2,7-diol** (**4**). Il a été attribué au proton H-4 (δ 7,73 pour (**3**) et δ 9,07 ppm pour (**4**)). Son signal disparaît sur le spectre du **3-méhoxy-2,7-dihydroxy-5H-phénanthro[4,5-*bcd*]pyrane** (**5**) au profit d'un singulet comptant pour 2H d'un groupement oxyméthylène (-O-CH_2-) à δ 5,58 ppm indiquant ainsi que le composé **5** est un dérivé monométhoxy-dihydroxy-phénanthropyrane. A haut champ, la saturation du cycle central du **5-méthoxy-9,10-dihydro-2,3,7-phénanthrènetriol** (**3**) se traduit par deux signaux à (δ 2,55 ppm et 2,61 ppm) et révèlent ainsi l'existence de deux groupements méthylène H_2-9 et H_2-10. Sur les spectres du **3,5-diméthoxyphénanthrène-2,7-diol** (**4**) et du **3-méthoxy-2,7-dihydroxy-5H-phénanthro[4,5-*bcd*]pyrane** (**5**), les protons H-9 et H-10 deviennent

aromatiques et apparaissent sous forme de deux doublets dans la zone entre δ 7,37 et 7,48 ppm (*J* = 8,8 Hz (**4**) et 9,0 Hz (**5**)) (**Figure II:23**).

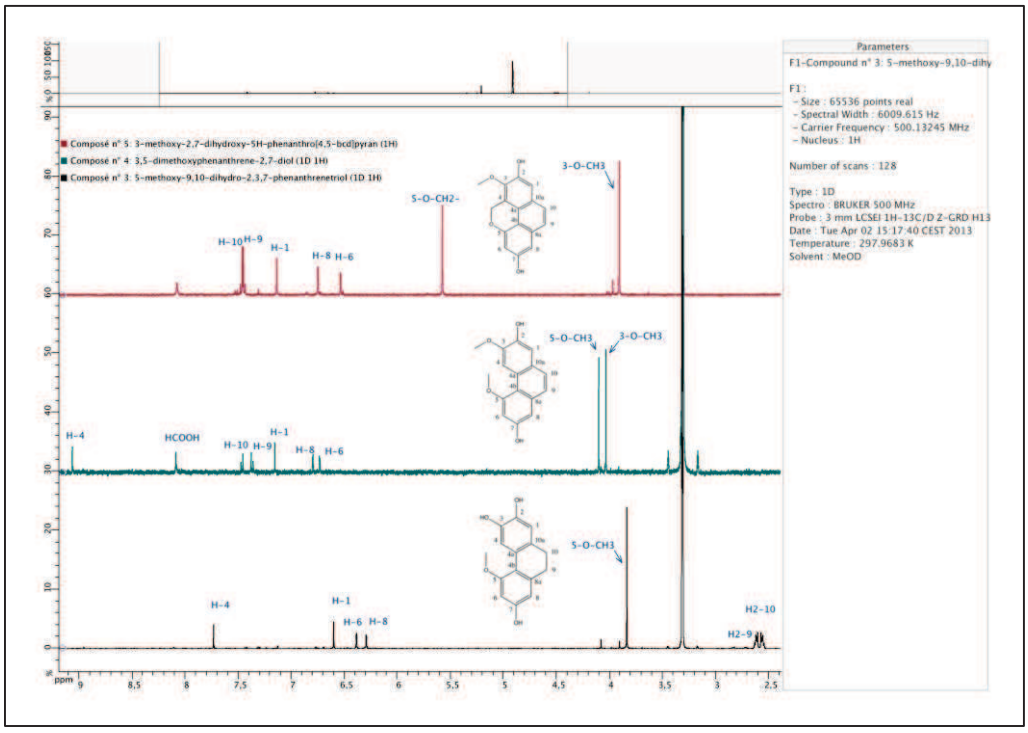


Figure II:23. Spectres RMN monodimensionnels ^{1}H des dérivés phénanthréniques 3 (bas), 4 (milieu) et 5 (haut) identifiés dans les tiges d'*Aerides rosea* (500 MHz, CD_3OD).

Tableau II:9. Données RMN ^{1}H (500 MHz) dans méthanol-d_4 (CD_3OD) des dérivés phénanthréniques identifiés dans les tiges d'*Aerides rosea*: 5-méthoxy-9,10-dihydro-2,3,7-phénanthrènetriol (3), 3,5-diméthoxyphénanthrène-2,7-diol (4) et 3-méthoxy-2,7-dihydroxy-5H-phénanthro[4,5-bcd]pyrane (5).

	δ H (ppm) mult, (J (Hz))		
Position	**3**	**4**	**5**
1	6.60 s	7.16 s	7.15 s
4	7.73 s	9.07 s	-
6	6.38 d, (2.4)	6.74 d, (2.4)	6.54 d (2.1)
8	6.29 d, (2.4)	6.80 d, (2.4)	6.76 d, (2.1)
9	2.61 br s	7.37 d, (8.8)	7.45 d, (9.0)
10	2.55 br s	7.47 d, (8.8)	7.48 d, (9.0)
3-O-CH3	-	4.04 s	3.91 s
5-O-CH3	3.83 s	4.10 s	-
5-O-CH2-	-	-	5.58 s

Nous remarquons également des signaux correspondant aux groupements méthoxyl entre δ 3,83 et 4,10 ppm. (3H, s). Deux singulets à δ 4,04 et 4,10 ppm confirment notre hypothèse de départ de l'analyse HRMS supposant la présence de deux groupements

méthoxyl sur le squelette phénanthrénique. Leurs positions respectives ont été déterminées à l'aide de l'expérimentation bidimensionnelle nOe. Par exemple, le signal à δ 3,83 ppm couple avec celui de H-4 (δ 7,73 ppm) et H-6 (δ 6,38 ppm) pour le **5-méthoxy-9,10-dihydro-2,3,7-phénanthrènetriol** (**3**). Son groupement méthoxyl substitue le cycle aromatique en position 5 (**Figure II:24**). Les autres groupements méthoxyl des composés 4 et 5 ont été attribués de la même façon (**Figure II:25** et **II:26**). Cette expérience nous a permis également de distinguer les signaux des protons H-9 et H-10.

Le spectre du proton d'**aérosanthrène** (**1**) est similaire à celui du **3,5-diméthoxyphénanthrène-2,7-diol** (**4**). L'**aérosine** (**2**) présente un spectre comparable à celui du **5-méthoxy-9,10-dihydro-2,3,7-phénanthrènetriol** (**3**) (**Figure II:27**). Ce qui a confirmé notre hypothèse de l'analyse HRMS d'une même structure de base d'un phénanthrène pour l'aérosanthrène et d'un 9,10-dihydrophénanthrène pour l'aérosine, se différenciant par la position de leurs substituants que nous avons résolu en examinant les spectres g-NOESY (**Figure II:28** et **II:29**). Leur analyse suggère la présence de dérivés nouvellement identifiés. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons donc réalisé des expériences bidimensionnelles, g-HSQC et g-HMBC afin d'obtenir indirectement les déplacements chimiques du carbone et de résoudre ainsi leurs structures sans équivoque. Les déplacements chimiques du proton et du carbone sont résumés dans un même tableau (**Tableau II:10**).

Tableau II:10. Données RMN ^{1}H et ^{13}C (HSQC et HMBC) (500 MHz) dans méthanol-d_4 (CD_3OD) de l'aérosanthrène (1) et de l'aérosine (2) identifiés dans les tiges d'*Aerides rosea.*

	Aerosanthrène			Aerosine		
Position	δ H (ppm) mult, (J (Hz))	δ C (ppm) (HSQC)	HMBC	δ H (ppm) mult, (J (Hz))	δ C (ppm) (HSQC)	HMBC
1	7.12 s	113.3		6.62 s	115.4	
2	-	145.6	H: 4, 1	-	145.0	H: 1, 4
3	-	146.9	H: 1	-	146.3	H: 1, 4, 3 -O-CH3
4	8.95 s	113.7		8.00 s	113.7	
4a	-	127.9	H: 10	-	126.9	H: 1
4b	-	115.9	H: 9	-	115.3	H: 4
5	-	161.1	H: 5-O-CH3	-	156.8	H: 6
6	6.70 d, (2.4)	99.9		6.26 d, (2.4)	102.9	
7	-	157.2	H: 8	-	157.4	H: 8
8	6.77 d, (2.4)	105.5		6.21 d, (2.4)	108.1	
8a	-	136.5	H: 10	-	141.6	H: 9, 10
9	7.30 d, (8.8)	124.9		2.59 m	31.4	
10	7.43 d, (8.8)	128.4		2.59 m	31.4	
10a	-	125.8	H: 1	-	131.7	H: 4, 9, 10
3 -O-CH3				3.84 s	56.4	
5 -O-CH3	4.07 s	56.5				

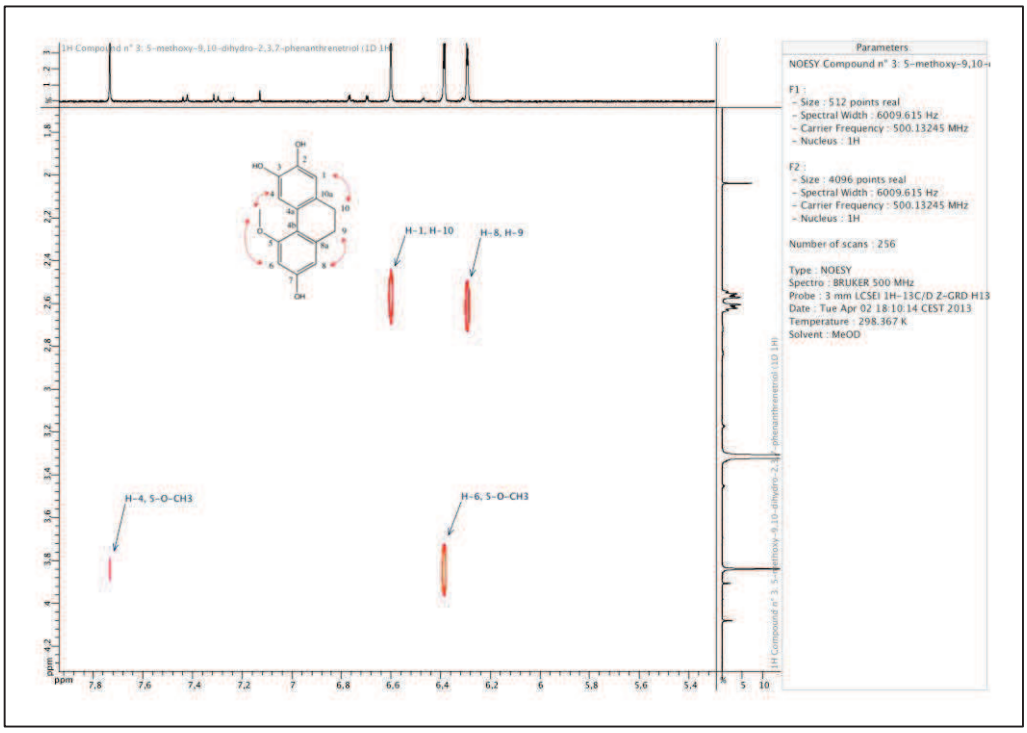


Figure II:24. Spectres RMN bidimensionnel $^{1}H/^{1}H$ NOESY du 5-méthoxy-9,10-dihydro-2,3,7-phénanthrènetriol (3) (500 MHz, CD3OD).

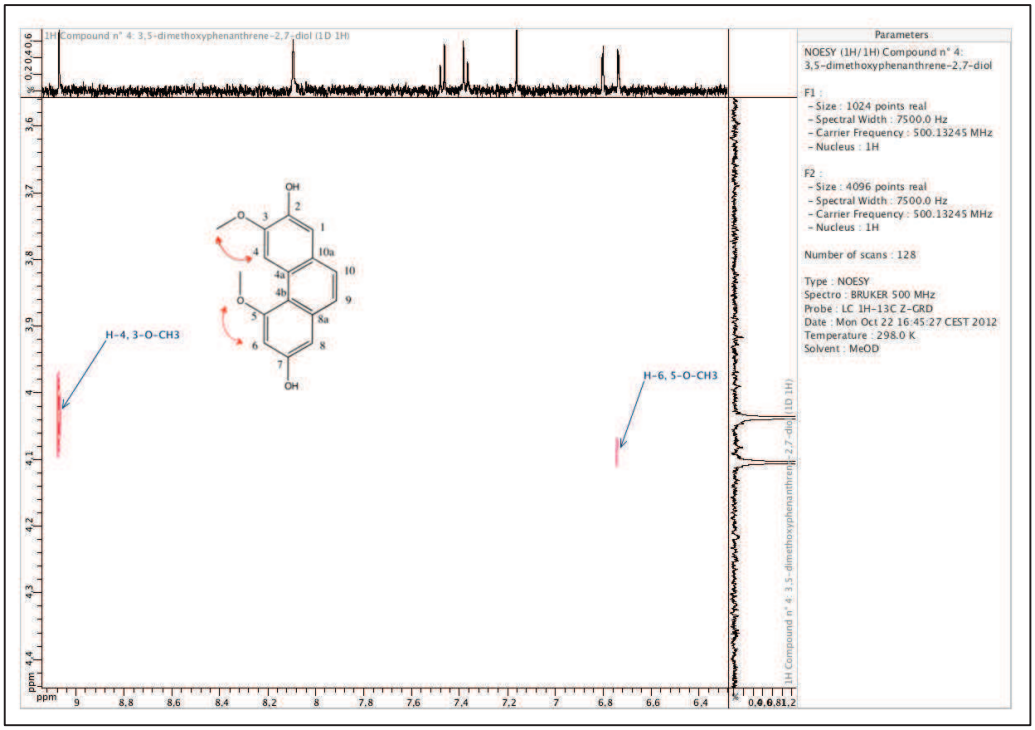


Figure II:25. Spectres RMN bidimensionnel $^{1}H/^{1}H$ NOESY du 3,5-diméthoxyphénanthrène-2,7-diol (4) (500 MHz, CD3OD).

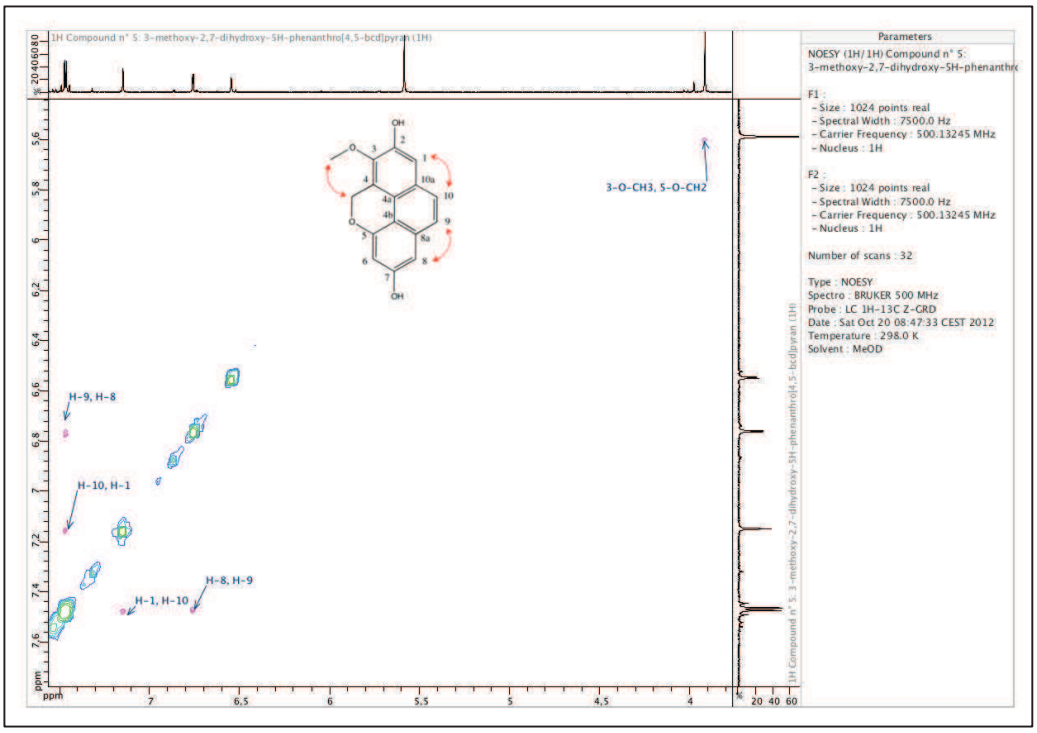


Figure II:26. Spectres RMN bidimensionnel $^{1}H/^{1}H$ NOESY du 3-méthoxy-2,7-dihydroxy-5H-phénanthro[4,5-bcd]pyrane (5) (500 MHz, CD3OD).

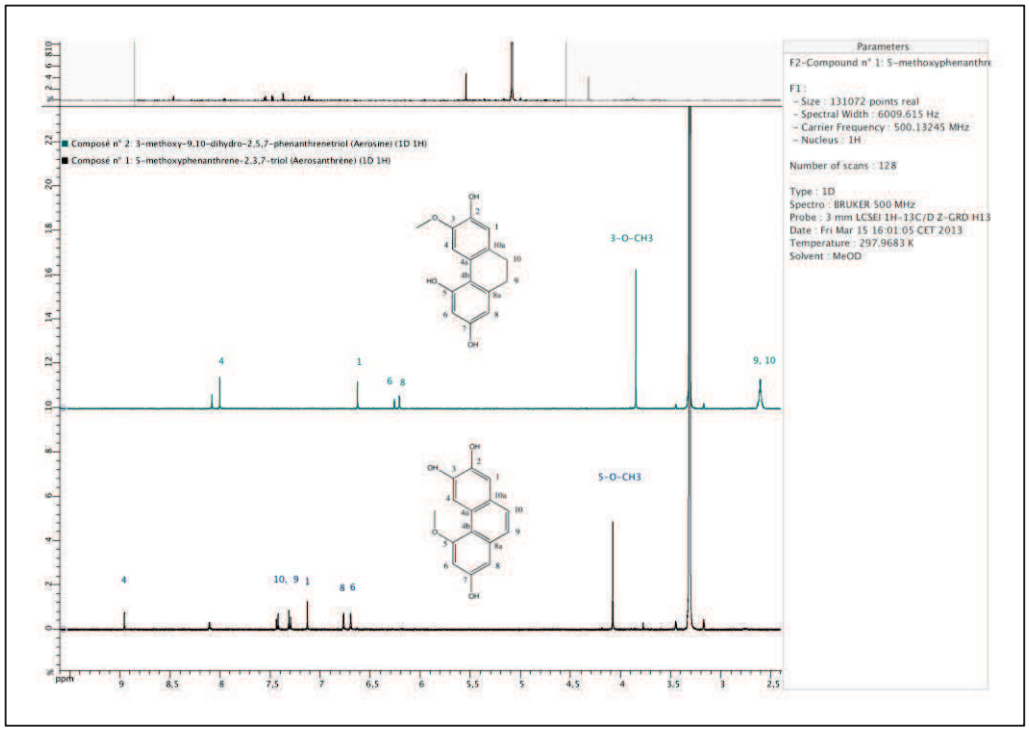


Figure II:27. Spectres RMN monodimensionnels ^{1}H de l'aérosanthrène (bas) et de l'aérosine (haut) (500 MHz, CD3OD).

Sur le spectre du proton d'**aérosanthrène** (**1**), on peut observer deux doublets des protons aromatiques méta couplés et attribués à H-6 et H-8 (δ 6,70 ppm, 1H, *J* = 2,4 Hz ; δ 6,77 ppm, 1H, *J* = 2,4 Hz) ainsi que deux singulets correspondant aux H-1 (δ 7,12 ppm, 1H) et H-4 (δ 8,95 ppm, 1H). Deux autres doublets ortho couplés à δ 7,30 ppm (1H, *J* = 8,8 Hz, H-9) et δ 7,43 ppm (1H, *J* = 8,8 Hz, H-10) confirment l'insaturation du cycle phénanthrénique. L'expérimentation nOe montre un couplage entre le signal des trois protons du groupement méthoxyl (δ 4,07 ppm, s, 3H) et les signaux du H-4/H-6 (δ 8,95 ppm, *s* et δ 6,70 ppm, *d*). Le cycle est donc substitué en position 5. Cette expérience a également permis de distinguer les signaux de H-9 (δ 7,30 ppm) et H-10 (δ 7,43 ppm), couplant chacun avec les signaux de H-1 (δ 7,12 ppm) et H-8 (δ 6,77 ppm), respectivement (**Figure II: 28**).

Le spectre du proton de l'**aérosine** (**2**) présente les mêmes caractéristiques, notamment deux doublets provenant des protons aromatiques méta couplés H-6 (δ 6,26 ppm, 1H, *J* = 2,4 Hz) et H-8 (δ 6,21 ppm, 1H, *J* = 2,4 Hz) et deux singulets attribués à H-1 (δ 6,62 ppm, 1H) et H-4 (δ 8,00 ppm, 1H). On peut observer un multiplet révélant l'existence de deux groupements méthylène H_2-9 et H_2-10 (δ 2,59 ppm, 4H) caractéristiques d'un 9,10-dihydrophénanthrène. La substitution du cycle par le groupement méthoxyl (δ 3,84 ppm, s, 3H) en position 3 a été confirmée par l'analyse du spectre NOESY, car ce signal couple avec celui du proton H-4 (δ 8,00 ppm) (**Figure II:29**).

Pour résoudre leur squelette carboné et ainsi fournir une description complète de nouveaux dérivés phénanthréniques, les spectres bidimensionnels ont été acquis afin d'obtenir indirectement les déplacements chimiques du ^{13}C à partir des expérimentations HSQC et HMBC éditées. Pour les deux composés, le spectre HMBC indique clairement la présence de quatre carbones quaternaires à bas champs, rattachés chacun à un oxygène dans la zone entre δ_C 145,0 et 157,4 ppm. Ces signaux ont été donc attribués à C-2, C-3, C-5 et C-7. On peut ensuite observer des signaux plus blindés correspondant aux autres carbones quaternaires C-4a, C-4b, C-8a et C10-a, dans la zone entre δ_C 115,3 et 141,6 ppm. Pour chaque structure, le spectre HSQC confirme l'existence d'un groupement méthoxyl (δ_H 4.07 (3H, s, 5-OMe) δ_C 56.5 ppm) et (δ_H 3.84 (3H, s, 3-OMe), δ_C 56.4 ppm), respectivement pour l'**aérosanthrène** et l'**aérosine** (**Figures II:30, II:31, II:32, II:33** et **Tableau II:10**).

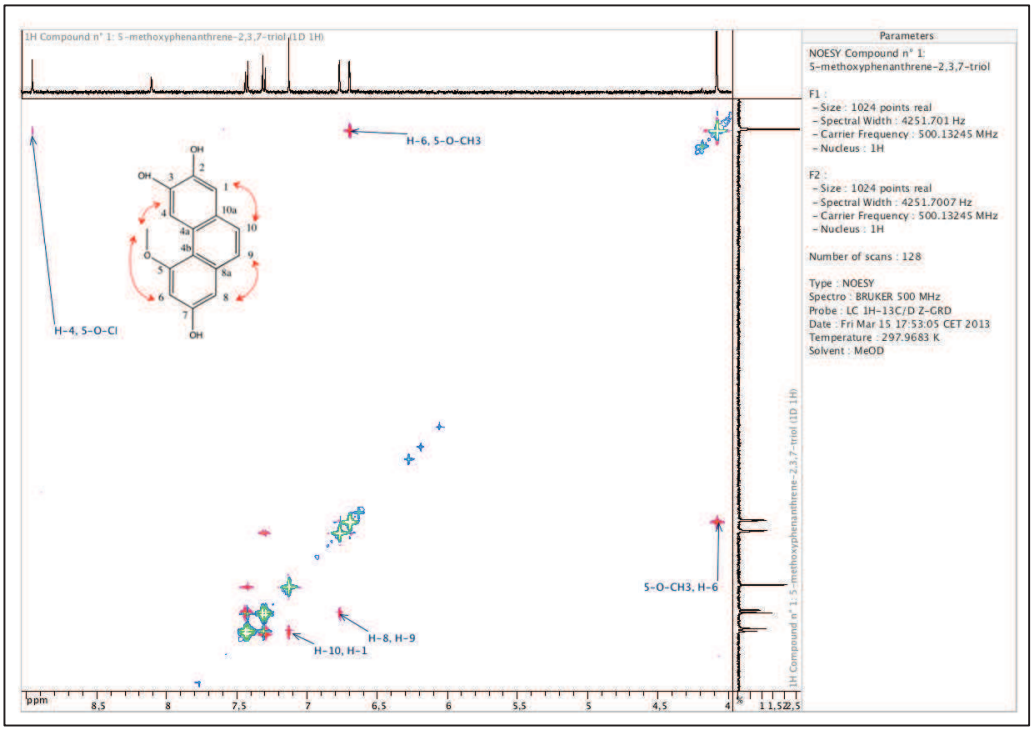


Figure II:28. Spectres RMN bidimensionnel $^{1}H/^{1}H$ NOESY d'aerosanthrène (1) (500 MHz, CD3OD).

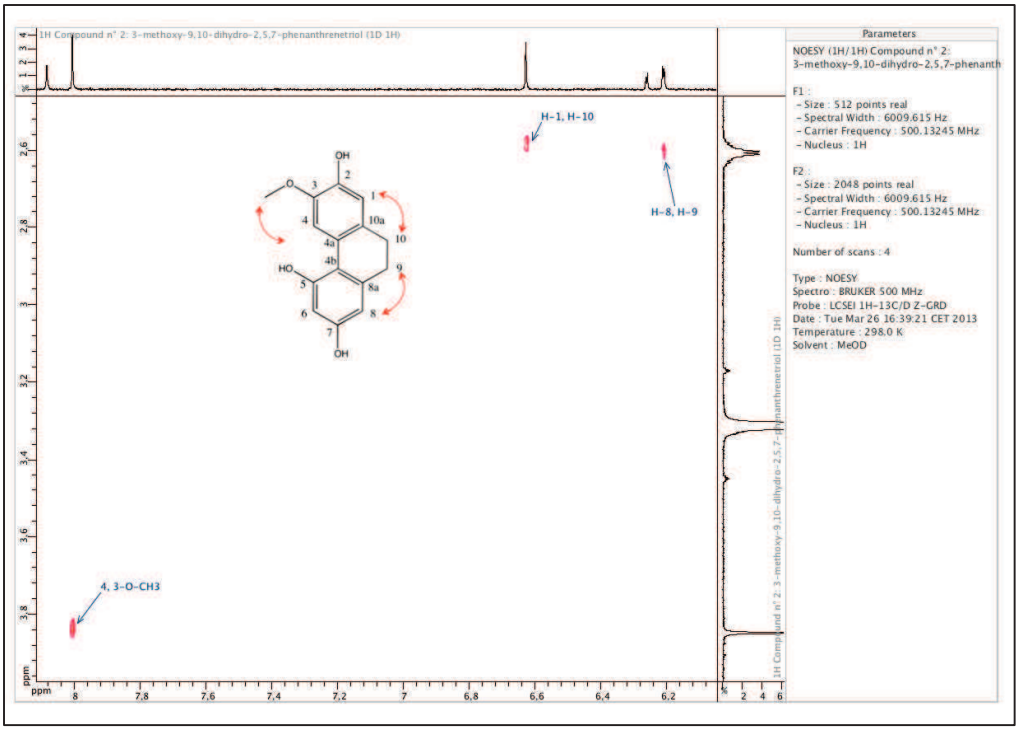


Figure II:29. Spectres RMN bidimensionnel $^{1}H/^{1}H$ NOESY de l'aérosine (2) (500 MHz, CD3OD).

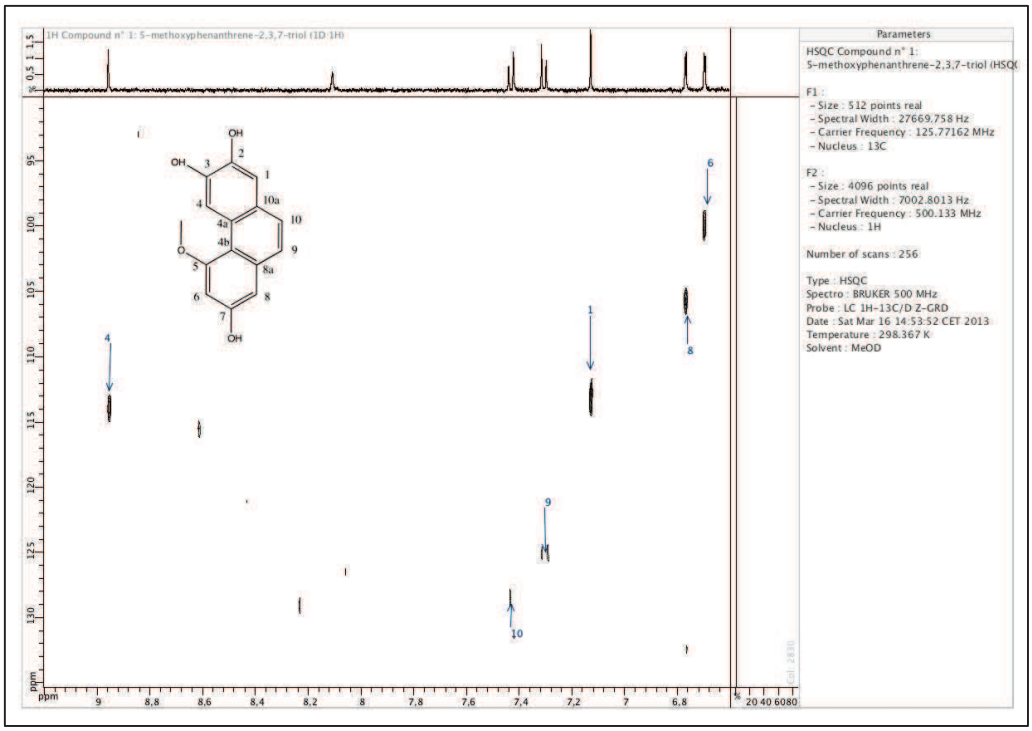


Figure II:30. Spectre RMN bidimensionnel $^{1}H/^{13}C$ HSQC de l'aérosanthrène (500 MHz, CD_3ODCD_3).

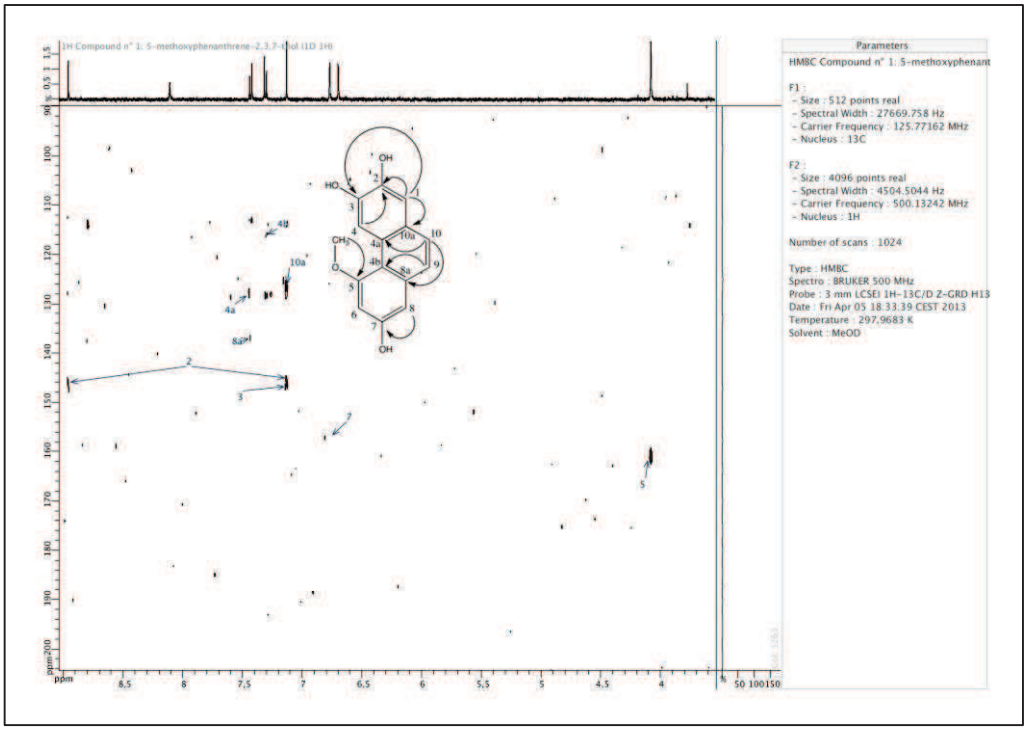


Figure II:31. Spectre RMN bidimensionnel $^{1}H/^{13}C$ HMBC de l'aérosanthrène (500 MHz, CD_3ODCD_3).

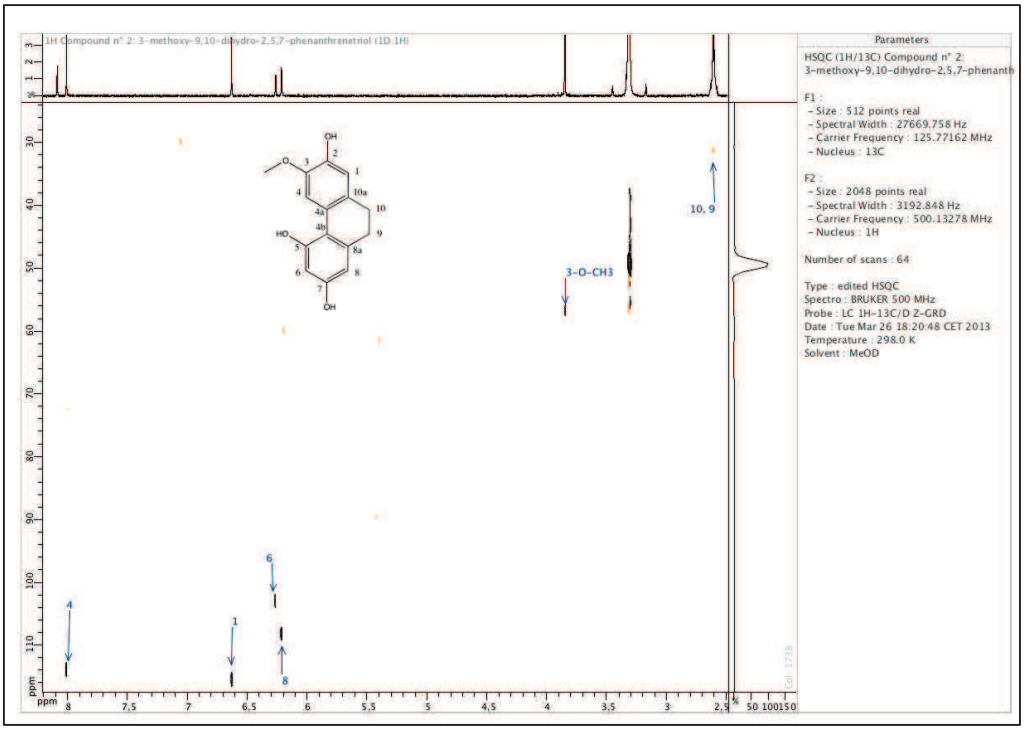


Figure II:32. Spectre RMN bidimensionnel $^{1}H/^{13}C$ HSQC de l'aérosine (500 MHz, CD_3ODCD_3).

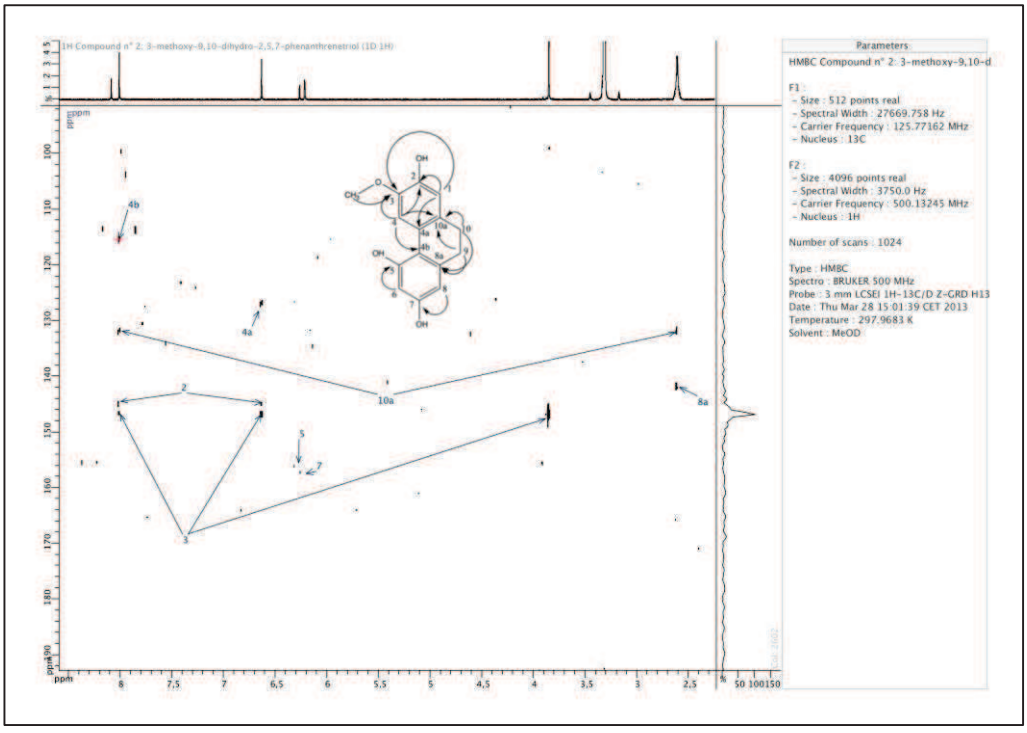


Figure II:33. Spectre RMN bidimensionnel $^{1}H/^{13}C$ HMBC de l'aérosine (500 MHz, CD_3ODCD_3).

C. VIII. Récapitulatif de la composition phytochimique des tiges d'*Aerides rosea*

Les tiges d'*Aerides rosea* contiennent un dérivé d'acide *p*-coumarique, et dix stilbénoïdes, dont deux bibenzyles, deux phénanthrènes, quatre 9,10-dihydrophénanthrènes, un phénanthropyrane et un 9,10-dihydrophénanthropyrane. Les métabolites identifiés en combinant différentes techniques d'extraction, de fractionnement et de purification avec des techniques couplées dernière génération, sont présentés sur la **Figure II:34**.

Les dérivés phénanthréniques sont des métabolites caractéristiques de la famille de Orchidacées. Les composés ci-dessus ont été identifiés pour la première fois ensemble, au sein d'une même espèce, jamais explorée auparavant. L'aérosanthrène et l'aérosine sont des dérivés nouvellement décrits.

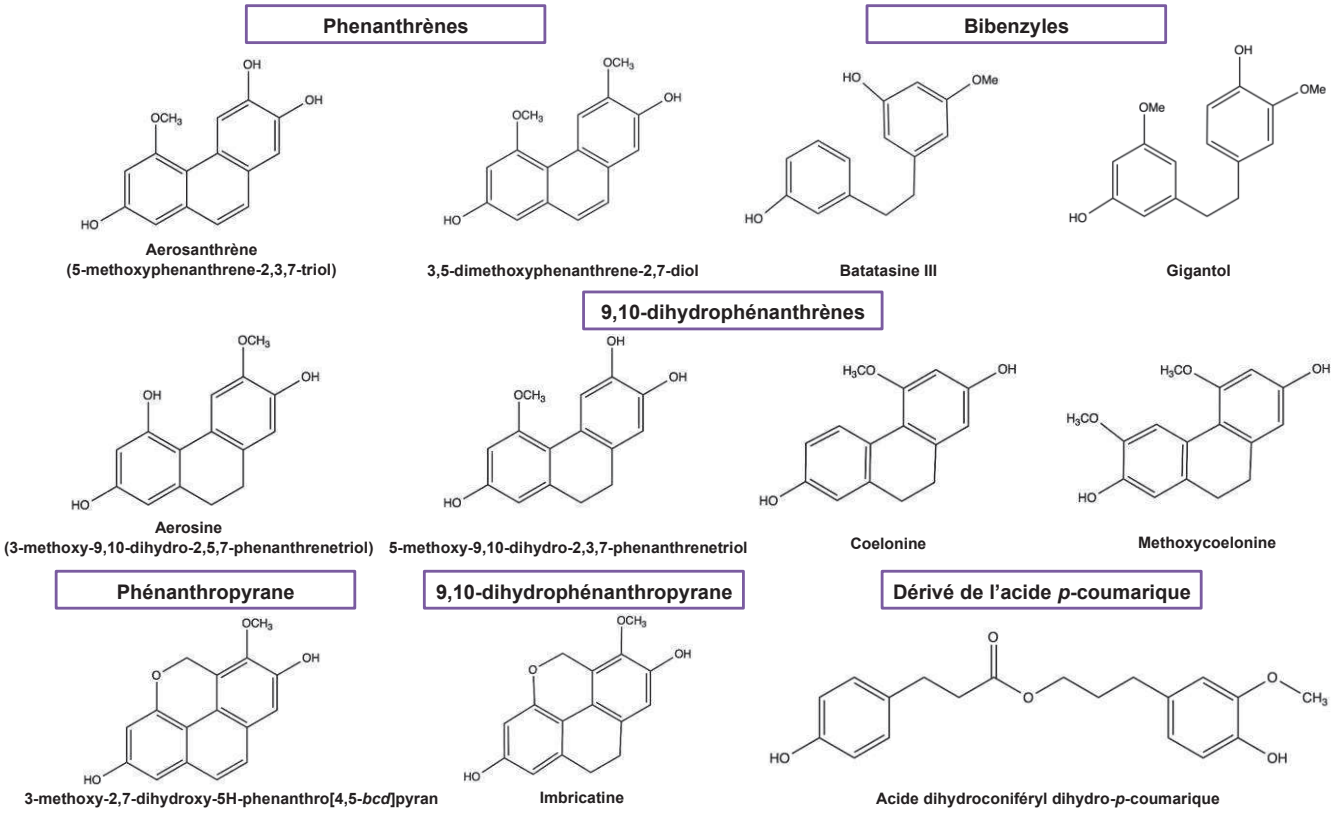


Figure II:34. Composition phytochimique des tiges d'*Aerides rosea.*

D. Bilan

Aerides rosea est une orchidée avec une composition phytochimique complexe. Nous avons mis en évidence onze métabolites principaux. L'imbricatine, la méthoxycoelonine et le gigantol ont été définis comme marqueurs phytochimiques de *Vanda coerulea*, spécifiques des tiges [Simmler C. 2010]. Nous avons démontré leur présence également dans les tiges d'*Aerides rosea,* ce qui diminue considérablement leur degré de spécificité au sein d'une espèce uniquement. En plus de ces trois métabolites, d'autres dérivés phénanthréniques ont été identifiés dans les tiges d'*Aerides rosea.* La plupart d'entre eux ont déjà été identifiés dans d'autres espèces d'orchidées, hormis l'aérosine et l'aérosanthrène, qui sont décrits pour la première fois. Ces deux composés sont ainsi pour l'instant considérés comme des marqueurs spécifiques d'*Aerides rosea*.

Les métabolites identifiés appartiennent à la classe des stilbénoïdes. Ce nom a été créé pour souligner la parenté biogénétique avec les flavonoïdes, les composés phénoliques qui possèdent deux noyaux benzéniques séparés par un pont éthane ou éthène (les bibenzyles et les stilbènes) et leurs produits qui leur sont biosynthétiquement rattachés, à savoir les phénanthrènes et les 9,10-dihydrophénanthrènes (cf chapitre Introduction) [Bruneton J. 2009]. Les bibenzyls et leurs dérivés sont des métabolites secondaires typiques des hépatiques (ex. *Marcantia*). Leur présence dans les plantes supérieures a été reportée notamment dans le genre *Pinus* (Pinacées) et *Morus* (Moracées). Avec les phénanthrènes et dihydrophénanthrènes, ils sont largement distribués dans les Orchidacées. Ce sont notamment les 9,10-dihydrophénanthrènes qui sont caractéristiques de cette famille, mais de façon non exclusive puisqu'on les retrouve également dans les Dioscoreacées ou encore les Combrétacées [Gorham J. 1989].

Certains composés phénanthréniques sont issus de la dégradation d'alcaloïdes, d'autres ont une origine diterpénique (par exemple dans les Euphorbiacées et les Lamiacées) ou sont issus d'un processus spécifique, comme dans le genre *Juncus* [Bruneton J. 2009 et Kovacs A. *et al.* 2008]. Mais la principale voie de biosynthèse des stilbénoïdes, notamment dans les orchidées, est celle du phénylpropanoïde-polymalonate, proposée par Birch et Donovan (1953). Quelques décennies plus tard, cette voie a été confirmée par plusieurs études qui démontrent que les stilbènes et les phénanthrènes sont synthétisés à partir des acides cinnamiques, en impliquant des enzymes de type stilbène-synthases, et les bibenzyls et les dihydrophénanthrènes à partir des acides dihydrocinnamiques impliquant la bibenzyl-synthase (**Figure II:35**) [Gorham J. 1989]. La structure phénanthrénique est formée par couplage oxydatif intra-moléculaire, ayant la L-

phénylalanine, les acides coumariques et dihydrocoumariques comme précurseurs (**Figure II:36**) [Fritzemeier K. H. *et al*. 1983].

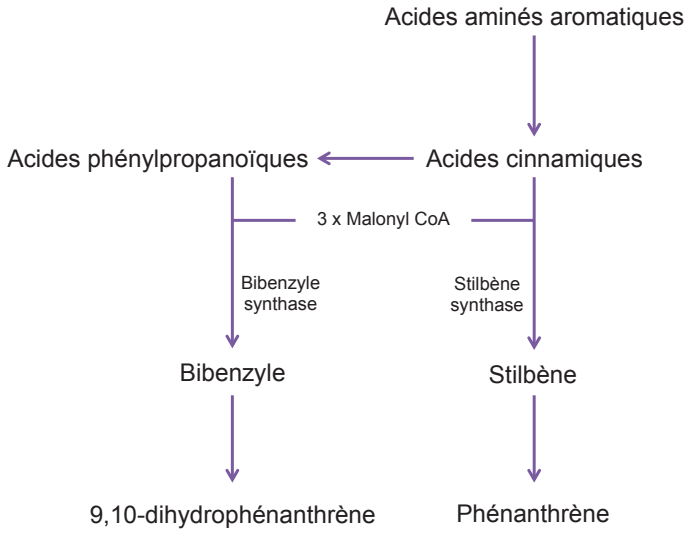


Figure II:35. Voie de biosynthèse principale des stilbénoïdes proposée par Gorham J. (1989).

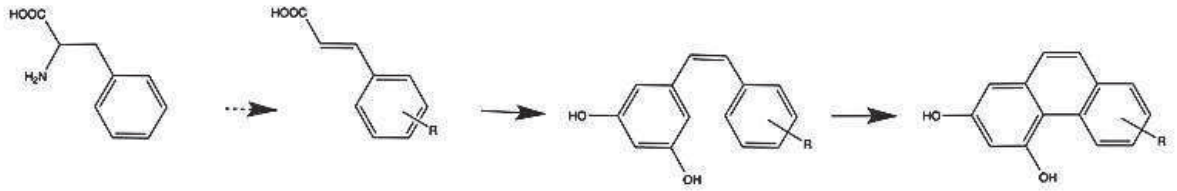


Figure II:36. Possible voie de biosynthèse proposée par Fritzemeier K. H. *et al* (1983).

Les stilbénoïdes sont normalement les constituants du duramen et servent à protéger le bois contre les attaques des champignons, insectes ou autres organismes xylophages. Certains bois à partir desquels des stilbénoïdes ont été isolés, sont également résistants aux termites. Chez les plantes herbacées, ces composés ont également un rôle protecteur vis-à-vis des attaques fongiques et des insectes, cependant le mécanisme d'action n'est pas encore élucidé. Les stilbénoïdes sont donc considérés comme des phytoalexines. La synthèse des dérivés phénanthréniques antifongiques peut être induite par l'attaque d'un organisme approprié, une lésion des tissus ou encore par d'autres stimuli, comme la lumière UV [Fritzemeier K. H. *et al*. 1983 et Gorham J. 1989]. Certains bibenzyls (par exemple l'acide lunularique et les batatasines II à IV) et certains phénanthrènes peuvent jouer un rôle de régulateurs de croissance:

- en intervenant comme des facteurs de dormance [Hashimoto T. *et al.* 1978 et Saito M. *et al.* 1976],
- en affectant la respiration et la photosynthèse [Nimmanpisut S. *et al.* 1976], l'activité de l'ATPase [Janthasoot W. *et al.* 1977]
- ou encore l'oxydation de l'acide indole acétique (AIA) [Mato M. C. *et al.* 1977 et Gorham J. 1978].

On-line identification of phenanthrene derivatives in *Aerides rosea* (Orchidaceae) using HPLC-ESI-HRMS/MS and HPLC-DAD-MS-SPE-UV/NMR hyphenated systems

Veronika Cakova[1,3], Aurélie Urbain[1], Cyril Antheaume[2], Nicole Rimlinger[2], Patrick Wehrung[2], Frédéric Bonté[3] and Annelise Lobstein[1].*

[1] University of Strasbourg, Faculty of Pharmacy, Laboratory of pharmacognosy, 74, route du Rhin, CS60024, 67400 Illkirch Graffenstaden, France.

[2] University of Strasbourg, Faculty of Pharmacy, Service commun d'analyse, 74, route du Rhin, CS60024, 67400 Illkirch Graffenstaden, France.

[3] LVMH recherche, 185 avenue de Verdun, 45800 Saint Jean de Braye, France.

KEYWORDS. Orchids, *Aerides rosea*, phenanthrenes, on-line HPLC-DAD-MS-SPE-UV/NMR, LC-ESI-QTOF-MS/MS.

ABSTRACT. In order to accelerate the identification of new secondary metabolites and avoid the time consuming isolation of known compounds from a newly explored orchid, *Aerides rosea,* a dereplication strategy was applied using LC-DAD-HRMS/MS targeting method. Then, the identification of unknown minor compounds was performed on-line using the hyphenated HPLC-DAD-MS-SPE-UV/NMR system. An *A. rosea* enriched stem extract was fractionated and the developed dereplication method allowed the characterization of four compounds (gigantol, imbricatin, methoxycoelonin and coelonin). The analyses of two fractions by hyphenated HPLC-DAD-MS-SPE-UV/NMR permitted the identification of five additional minor constituents including one phenanthropyran, two phenanthrene and two dihydrophenanthrene derivatives. Their structures were determined with the help of on-line MS and NMR (1D and 2D) data obtained from less than fifty micrograms of each metabolite of interest. Thanks to this state-of-the-art technique, nine secondary metabolites were characterized in *A. rosea* stems, two of them are newly described phenanthrene derivatives: aerosanthrene (5-methoxyphenanthrene-2,3,7-triol) and aerosin (3-methoxy-9,10-dihydro-2,5,7-phenanthrenetriol).

Introduction

The development of hyphenated analytical systems represents a significant breakthrough in the field of phytochemistry, as it overcomes the problems of raw plant material not readily available. This instrumental evolution reduces the successive isolation steps, avoiding notably losses of products. The uses of several HPLC-NMR couplings have been successfully applied to natural products. Numerous on-flow HPLC-NMR experiments were reported, including for example analysis of xanthones, isoflavones, sesquiterpene lactones, lignans, alkaloids or saponins in species from different plant families (Gentianaceae, Fabaceae, Asteraceae, Annonaceae or Erythroxylaceae) [1-6]. However, the single HPLC-NMR on-flow system, which implies a direct connection between the HPLC system and the NMR probe, is restricted to major constituents, because the acquisition time of NMR data is limited [7-8]. Direct coupling also requires the use of expensive deuterated solvents for the whole HPLC analysis. These drawbacks can be overcome combining HPLC-NMR with post-column solid phase extraction (SPE). Indeed, HPLC analysis can be run with protonated analytical grade solvents, as solvents are completely removed with nitrogen gas once the eluted compounds trapped on small SPE cartridges. Furthermore, multi-trapping enables the accumulation of minor compounds, essential for further NMR acquisitions. The first published study using HPLC-DAD-SPE-NMR-MS applied on natural products described the analysis of an acetone crude extract of Greek oregano [9]. This system does not compromise the chromatographic separation and increases the concentration of the analytes on SPE cartridges, which enhances sensitivity, especially for hetero-nuclear inverse 2D NMR experiments. Several studies reported the application of HPLC-DAD-SPE-NMR on many natural compound chemical classes, such as polyphenols [10-11]. This coupling seems to be well adapted to the identification of minor constituents, even isomers [12].

In our continued efforts to contribute to the chemical investigation of orchids, we have recently reported the presence of five stilbenoids and three glucosyloxybenzyl eucomate derivatives in *Vanda coerulea* and *Vanda teres*, respectively, as well as their biosynthetic precursor, eucomic acid [13-14]. In the present study, we have decided to focus on an unexplored *Aerides* species*, Aerides rosea* Lodd. ex Lindl. & Paxton (Orchidaceae). Despite some therapeutic uses reported for two *Aerides* species [15], only one of them has been studied, *Aerides crispum,* leading to the characterization of aeridin, a phenanthropyran derivative [16]. As the genus *Vanda* is closely related to the genus *Aerides*, as shown by phylogenetic studies [17-18], we have firstly investigated the presence of the metabolites previously identified in *V. coerulea* and *V. teres* by a dereplication approach based on experimental data. This strategy enabled to focus our study on unknown minor secondary metabolites, which were subsequently identified by means of hyphenated techniques.

We herein report and discuss the on-line identification of nine phenanthrene derivatives using HPLC-DAD-MS-SPE-UV/NMR, a hyphenated system including an additional UV detector connected just after the SPE cartridges to confirm the efficiency of SPE trapping prior to NMR experiments (Figure 1).

Experimental section

Plant material

Aerides rosea Lodd. ex Lindl. & Paxton (Orchidaceae) dried stems were harvested in October 2010 at Joe's orchid farm in Chiang Mai (Thailand), and directly dried on sun dryer at natural climatic conditions and temperature (about 35°C), and purchased in compliance with the CITES convention on biodiversity. A voucher specimen (n° 038824) has been deposited in the CMU Herbarium of the Faculty of Science, Chiang Mai University, Thailand.

Plant extraction and sample preparation

Aerides rosea dried stems (100 g) were crushed by a rotor mill (ZM 200, Retsch) with a sieve with trapezoid holes of 2 mm. They were extracted successively with cyclohexane, ethyl acetate and methanol (1 mg of plant material/15 mL of solvent) for 15 min in a sonication bath and were then filtered. The procedure was repeated twice for each solvent. The combined filtrates were concentrated to dryness under vacuum to obtain a yellow cyclohexanic extract (0.78% yield, reported to dry raw material) and two dark brown ethyl acetate (3.22% yield) and methanolic extracts (4.88% yield). An aliquot of the ethyl acetate extract (1.8 g) was fractionated on C18 end-capped SPE cartridges (Chromabond, Macherey Nagel) and eluted with methanol/water (85/15; v/v). The enriched C18 SPE fraction (1.4 g) (methanol/water 85/15; v/v) was separated by Sephadex LH-20 (Sigma Aldrich) column chromatography with methanol. This fractionation process was monitored by TLC and HPLC-DAD analyses, and fractions with similar profiles were gathered. TLC was performed on silica gel plates (TLC silica gel 60 F_{254}, Merck Millipore), with dichloromethane/methanol (94:6) as mobile phase and vanillin/sulfuric acid as the detection reagent. Eleven fractions were obtained and analyzed by the targeted HPLC-ESI-HRMS/MS dereplication method. Two fractions (92 mg and 32 mg) containing unknown compounds were analyzed by HPLC-DAD-MS-SPE-UV/NMR.

HPLC conditions

Extracts and fractions were analyzed by RP-HPLC using a Sunfire Waters C18 column (150 mm × 4.6 mm i.d.) with a particle size of 3.5 µm on a Varian LC-920 system equipped with quaternary pumps and an UV-vis diode-array detector (DAD). Samples were eluted with water (A) and acetonitrile (B), both with 0.1% formic acid. The elution gradient was operated at a flow rate of 1 mL/min and at 30°C with the following linear gradient combination: 0 min, 20% B; 3 min, 30% B; 11 min, 35% B; 25 min, 50% B; 37-40 min, 100% B. The elution was monitored at 260 nm.

Targeted HPLC-ESI-HRMS/MS dereplication

The dereplication method was developed on an RRLC-QToF instrument (6520 Q-ToF Agilent technologies). Pure compounds previously isolated from *Vanda coerulea* and *Vanda teres* stems [13-14] were injected separately to obtain their HRMS and MS/MS spectra. Separations were performed on a Zorbax Agilent C18 column (50 mm × 2.1 mm i.d.) with a particle size of 1.8 µm operated at 35°C with a linear solvent gradient of 0.05% formic acid in water (A) and 0.05% formic acid in acetonitrile (B) under the following conditions: 0 min, 20% B; 7 min, 30% B; 8.5-16 min, 95% B. The flow rate was set to 0.5 mL/min. 1 µL of Sephadex fractions (1 mg/mL in methanol) were injected. The targeted mass list of $[M+H]^+$ was established to identify known compounds by comparison of the HRMS and MS/MS with a defined collision energy (eV) and in a precise LC elution time zone (retention time ± 1.5 min): *eucomic acid* (*m/z* = 241.07 → 205.04, 161.06, 133.07, 107.05), 5 eV, RT = 0.85 ± 1.5 min; *flavidin* (*m/z* = 241.08 → 195.08, 224.08, 239.06), 15 eV, RT = 3.75 ± 1.5 min; *coelonin* (*m/z* = 243.10 → 183.08, 211.08, 228.08), 12 eV, RT = 4.13 ± 1.5 min; *imbricatin* (*m/z* = 271.10 → 239.07), 12 eV, RT = 4.60 ± 1.5 min; *methoxycoelonin* (*m/z* = 273.10 → 213.09, 241.09), 11 eV, RT = 5.00 ± 1.5 min; *gigantol* (*m/z* = 275.10 → 91.05, 137.06, 151.08), 9 eV, RT = 6.60 ± 1.5 min; *vandateroside I* (*m/z* = 526.19 → 107.05), 8 eV, RT = 1.16 ± 1.5 min; *vandateroside II* (*m/z* = 794.29 → 107.05), 12 eV, RT = 1.74 ± 1.5 min; *vandateroside III* (*m/z* = 1086.38 → 293.10, 107.05), 15 eV, RT = 4.97 ± 1.5 min. The acquisition of mass spectra was conducted in ESI positive ion mode with a nebulizer nitrogen gas pressure of 30 psi, drying gas flow rate of 8 L/min and drying temperature of 325°C. The capillary voltage was set to 4000 V. HRMS and MS/MS data were recorded within a range of 50 to 1200 Da. This method was also used indirectly to determine the molecular formula of the unknown compounds.

HPLC-DAD-MS-SPE-UV/NMR analysis

The on-line identification of unknown compounds from Sephadex fractions F1 and F2 was achieved with a HPLC-DAD-MS-SPE-UV/NMR system.

The chromatographic separations were achieved using an Agilent 1200 HPLC system with a Sunfire Waters C18 column (150 mm × 4.6 mm i.d., 3.5 µm) maintained in an oven at 30°C. 20 µL of solutions (5 mg/mL) were injected and elution was performed at a flow rate of 0.8 mL/min. The compromise between optimal separation for peak trapping on SPE cartridges and the run length was obtained with 0.05% formic acid in water (A) and acetonitrile (B) under different gradient conditions for each fraction: (F1) 0 min, 20% B; 15 min, 35% B and 18-30 min, 100% B, and (F2) 0 min, 30% B; 15 min, 50% B and 16-31 min, 100% B.

The HPLC eluate was split in parallel, real-time detection, to the diode array detector (95%) and to the mass spectrometer (5%), a Bruker Esquire HCT Ultra MS instrument equipped with an electrospray ion source. The acquisition of mass spectra was conducted in the positive ion mode with a nebulizer nitrogen gas pressure of 10 psi, drying gas flow rate of 8 L/min and drying temperature of 300°C. The capillary voltage was set to 4000 V. MS data were recorded within a range of 50 to 1000 Da.

The compounds eluted from the HPLC-DAD system were trapped using a Spark Holland Prospekt 2 solid phase extraction system. The 10 × 1 mm HLB SPE cartridges (Oasis, Waters) were conditioned with 500 µL of acetonitrile at 6 mL/min and equilibrated with 500 µL of water at 1 mL/min before use. In order to avoid the immediate desorption of compounds from the SPE cartridges, the mobile phase was diluted with 0.05% formic acid in water using a Knauer-120 make-up pump at a flow rate of 0.8 mL/min prior to SPE trapping. To obtain a sufficient amount of compound for 1D and 2D NMR analyses, three repeated chromatographic separations were performed. Different peaks of interest were multi-trapped, according to the UV or MS signal, each one three times on a different SPE cartridge. For breakthrough monitoring, a UV detector (VWD, Agilent Technologies) was placed after the SPE unit. The cartridges were dried under a nitrogen gas flow for at least 30 min.

The multi-trapped compounds were then desorbed and eluted with a 122 µL pushed volume of MeOD into the NMR probe. All spectra were recorded at 298.0 K, on a Bruker Avance III 500 MHz proton operating system, equipped with a 5 µL flow probe including for NMR signal detection a solenoid receiver coil, designed by Protasis (MRM Division). The ^{1}H NMR data were collected with a 6 kHz spectral width and the spectra were acquired until a significant signal to noise ratio was obtained. Depending of the amount of each trapped

compound, the assessment of the position of methoxyl substituents required, for 1D and 2D homonuclear NMR experiments such as g-NOESY and g-COSY, at least 32 to 256 scans. To solve carbon skeletons attribution, 64 to 1028 accumulations were needed to run 2D heteronuclear NMR experiments such as edited g-HSQC and g-HMBC.

The whole hyphenated system was driven back by HyStar® software from Bruker, and all the pure analytes were collected into 1.5 mL containers with the help of a fraction collector (ISCO Foxy R1 Teledyne) after NMR experiments.

Results and discussion

The extraction of plant material results usually in a complex mixture of hundreds or even thousands of compounds present in different concentrations. In many cases, the composition of this mixture is completely unknown. Isolation and structural elucidation of each constituent are time-consuming and expensive because of the quantity of plant material needed and solvent consumption. The successive extractions enabled the concentration of secondary metabolites, including stilbenoids and other phenanthrene derivatives in the ethyl acetate extract. An aliquot of that sample was enriched in polar to medium polar compounds on C18 SPE cartridge, concentrated in the eluted mixture of MeOH/water 85/15 (v/v). After the separation of that sample on a Sephadex LH-20 column, eleven fractions were obtained and analyzed by HPLC-ESI-HRMS/MS. Due to the close phylogenetic and taxonomic relationships of *Vanda* and *Aerides* genera, the presence of already known compounds was expected. The identification of aeridin in *Aerides crispum* [16] increased the probability of the presence of other phenanthrenes also in *Aerides rosea*. In order to quickly investigate the eleven fractions of *A. rosea* extract and identify known compounds previously described in *V. coerulea* [13] and *V. teres* [14], a dereplication strategy was applied. The developed targeted method, based on the experimental comparison of HRMS and MS/MS spectra of previously isolated metabolites from these two species, confirmed the presence of four of five known stilbenoids: imbricatin, coelonin, methoxycoelonin and gigantol, only flavidin was not detected by this method (Figure 2). Vandaterosides and acid eucomic were also absent in the ethyl acetate extract, which was expected due to their high polarity. However, this dereplication approach enabled the detection of two minor fractions, F1 (100 mg) and F2 (30 mg) containing unknown substances.

The preliminary HPLC-DAD analyses of F1 and F2 revealed five compounds of interest **1-5**, as shown in Figure 3, in addition to imbricatin, which was identified in F1 by the dereplication strategy. The HPLC gradient was then optimized for each fraction to obtain the

best chromatographic separation prior to trapping on SPE cartridges. Chromatographic separations were performed on a C18 Sunfire Waters column, chosen for the compromise between the optimal separation, the elution length and the capacity of charge without losing resolution.

Two types of SPE cartridges were tested in order to evaluate their trapping efficiency to concentrate the analytes by means of multi trapping and compare the signal-to-noise ratio. The SPE parameters and their capacity of retention can be difficult to predict only from HPLC parameters, e.g. retention time, because natural product mixtures have initially unknown composition as well as the structures of each compound. This step can have a significant influence on the experiments; some parameters have already been evaluated in the past [19-20]. Between the two phases tested, C18 and HLB (hydrophilic-lipophilic-balanced made from hydrophilic N-vinylpyrrolidone and the lipophilic divinylbenzene), better results were obtained with the second one. The compounds of interest in this study are medium polar products. It has been demonstrated that C18 materials are satisfactory for less polar compounds [19]. Three trappings from 20 µL of the initial fraction were sufficient to increase the analyte amount on the HLB cartridge for all analyzed compounds against 8 trappings on C18 phase, which did not give satisfactory results.

Furthermore, an additional post-SPE UV detector was included in this hyphenated system, to ensure the efficiency of the trapping of compounds on SPE cartridges. The absence of UV signal during the trapping steps confirmed that all the compounds were trapped effectively, and that there was no premature desorption. Drying of the cartridges followed by subsequent elution towards the NMR could then be carried out. This UV detector placed between the SPE cartridges and the NMR probe is a new evolution of the hyphenated technique presently describe, improving greatly the on-line monitoring of the SPE trapping.

The UV spectra of the analytes were obtained directly from DAD detection after the chromatographic separation. Compounds **2**, **3** and **5** showed similar UV spectra, with three UV maxima at λ_{max}^{ACN/H_2O} 219, 276, and 303 nm, λ_{max}^{ACN/H_2O} 217, 276, and 303 nm, λ_{max}^{ACN/H_2O} 224, 267, and 297 nm, respectively, characteristic of 9,10-dihydrophenanthrene derivatives. The two other compounds **1** and **4** showed only one UV maximum at λ_{max}^{ACN/H_2O} 260 nm and 262 nm, respectively, due probably to the unsaturation of the phenanthrene skeleton. The HRMS data of the five compounds, obtained during the dereplication approach, strengthened our hypothesis of closely related phenanthrene derivatives. Compounds **2** and **3** gave the same formula, $C_{15}H_{14}O_4$ ($[M+H]^+$ at *m/z* = 259.0970, err. -1.99 ppm, and 259.0972, err. -2.76 ppm, respectively), suggesting two dihydrophenanthrene derivatives carrying three hydroxyl and

one methoxyl groups. The molecular formula of compound **1**, differing by 2 hydrogen atoms from **2** and **3** ($C_{15}H_{12}O_4$; $[M+H]^+$ at *m/z* = 257.0806, err. 0.92 ppm), could confirm the hypothesis of a full unsaturation of the skeleton. The compound **4** gave a $[M+H]^+$ molecular ion at *m/z* = 271.0955 ($C_{16}H_{14}O_4$, err. 3.64 ppm) suggesting a structure similar to **1**, but with one hydroxyl group substituted by a methoxyl one. The compound **5** gave a pseudomolecular ion at *m/z* = 269.0792, indicating a molecular formula corresponding to $C_{16}H_{12}O_4$ (err. 6.08 ppm).

^{1}H NMR spectra of the five molecules showed similar characteristics of aromatic compounds. Indeed, they all showed a common aromatic singlet identified as H-1 in the range of 6.60 to 7.16 ppm and two aromatic meta-coupled doublets (*J* = 2.1 to 2.4 Hz) identified as H-6 and H-8 of the phenanthrene skeleton in the range of 6.21 to 6.80 ppm. All compounds **1-5** presented a very low-fielded singlet, assigned to the aromatic proton H-4 in the range of 7.73 to 9.07 ppm, except for compound **5** with one methylene proton signal at 5.58 ppm. Two aromatic ortho-coupled doublets attributed to H-10 and H-9 in the range of 7.30 to 7.48 ppm were visible for compounds **1**, **4** and **5**. High-fielded signals at 2.55 to 2.61 ppm due to a saturation of two benzylic methylene groups were attributed to CH_2-9 and CH_2-10 for **2** and **3**. The ^{1}H NMR spectrum of the compound **4** showed two singlets at δ 4.04 and 4.10 ppm, which were attributed to two methoxyl groups, in accordance with the preliminary hypothesis ensued from the HRMS data. The ^{1}H NMR spectrum of **5** showed a singlet at δ 5.58 ppm assignable to the methylene protons of an oxymethylene group indicating that **5** was a monomethoxy-dihydroxy-phenanthropyran derivative, which could explain the three UV maxima despite the unsaturation of the phenanthrene skeleton between H-9 and H-10. Compounds **3**, **4** and **5** were identified as already known phenanthrene derivatives, and their structures were confirmed by the comparison of the different HRMS and ^{1}H NMR data with the literature [21-23]. The NOESY experiments established and confirmed the position of methoxyl substituents (Figure 4). Compound **3** was thus identified as *5-methoxy-9,10-dihydro-2,3,7-phenanthrenetriol*, compound **4** as *3,5-dimethoxyphenanthrene-2,7-diol*, and compound **5** as *3-methoxy-2,7-dihydroxy-5H-phenanthro*[4,5-bcd]*pyran*. The attribution of their different signals is summarized in Table 1. All these three metabolites were already identified in orchid species: compounds **3** and **4** in *Bulbophyllum vaginatum* [21,23] and **5** in *Phalaenopsis equestris* [22]. They are herein reported for the first time in species from Vandeae tribe.

To confirm the structure of **1** and **2**, potentially identified as new phenanthrene derivatives, 2D NMR data was acquired to obtain indirectly their ^{13}C chemical shifts from edited g-HSQC and g-HMBC experiments. For both compounds, HMBC clearly indicates the

presence of four low-fielded quaternary carbons attached to oxygen in the range of 145.0 to 157.4 ppm attributed to C-2, C-3, C-5, and C-7 and four other quaternary carbons more shielded than the previous ones, in the range of 115.3 to 141.6 ppm attributed to C-4a, C-4b, C-8a and C-10a (Figure 5). In each structure, edited g-HSQC confirms the existence of one methoxyl group (δ_H 4.07 (3H, s, 5-OMe) δ_C 56.5) and (δ_H 3.84 (3H, s, 3-OMe), δ_C 56.4) respectively for compounds **1** and **2**. Their relative positions were once again established from NOESY experiments, which showed in both cases, dipolar interactions between H-4/H-6 with 5-O-CH_3 for compound **1** and H-4 and 3-O-CH_3 for compound **2**. Also, the high-fielded signals at 2.59 ppm for compound 2, appears to be correctly as negative signal by the edition mode of the g-HSQC, another proof of the presence of the two benzylic methylene groups CH_2-9 and CH_2-10. The assignments of the different signals are summarized in Table 2. Compound **1** was identified as *5-methoxyphenanthrene-2,3,7-triol* and **2** as *3-methoxy-9,10-dihydro-2,5,7-phenanthrenetriol*. Both compounds are herein reported as two new phenanthrene derivatives, and were named aerosanthrene (**1**) and aerosin (**2**).

Conclusion

Orchids are fascinating plants by their intricate beauty, but they also possess medicinal properties that make them a valuable raw material, which has to be investigated for bioactive substances. Unfortunately, most of orchid species are rare and so difficult to obtain in amounts compatible with fundamental phytochemical research. The evolution of analytical techniques providing higher sensitivity and resolution, and the development of hyphenated systems are particularly beneficial in the field of pharmacognosy as it may overcome the problem of non-abundant or unaffordable raw material. The use of two hyphenated systems supplying a full set of spectra, HPLC-ESI-HRMS/MS and HPLC-DAD-MS-SPE-UV/NMR, provided the on-line identification of natural products from a small amount of crude fractions. Our dereplication strategy confirmed the preliminary hypothesis of chemical similarities between *Aerides rosea* and *Vanda coerulea*, both rich in phenanthrene derivatives, and also accelerated simultaneously the identification of new secondary metabolites. This work represents a first step in the investigation of potential bioactive products, contributing at the same time to the phytochemical knowledge of orchids.

Acknowledgment

The authors thank La Fondation pour la Recherche Médicale (French Foundation for Medical Research), which financially allowed the acquisition of this HPLC-DAD-MS-SPE-UV/NMR equipment. The financial support of this project by Guerlain and LVMH Research &

Development is also gratefully acknowledged, as well as the help of Grahame Mowatt for carefully reading and correcting the manuscript.

Abbreviations

ACN, acetonitrile; DAD, diode array detector; gHMBC, gradient heteronuclear multi-bound coherence; gHSQC, gradient heteronuclear single quantum coherence; ESI, electrospray ionization; H_2O, water; HPLC, high performance liquid chromatography; HRMS, high resolution mass spectrometry; MeOH, methanol; MeOD, deuterated methanol; MS, mass spectrometry; NOESY, nuclear Overhauser effect spectroscopy; NMR, nuclear magnetic resonance; RP-HPLC, reversed phase high performance liquid chromatography; RT, retention time; SPE, solid phase extraction; TLC, thin layer chromatography; UV, ultraviolet; VWD, variable wavelength detector.

References

1. Zanolari B., Wolfender J-L., Guilet D., Marston A., Queiroz E. F., Paulo M. *J. Chromatogr. A.* **2003**, 1020, 75-89.

2. Cavin A., Potterat O., Wolfender J-L., Hostettmann K., Dyatmyko W. *J. Nat. Prod.* **1998,** 61, 1497-501.

3. Vogler B., Klaiber I., Roos G., Walter C. U., Hiller W., Sandor P. *J. Nat. Prod*. **1998,** 61, 175-8.

4. Queiroz E. F., Wolfender J-L., Atindehou K. K., Traore D., Hostettmann K. *J. Chromatogr. A*. **2002,** 974, 123-34.

5. Wolfender J-L., Rodrigues S., Hostettmann K., Hiller W. *Phytochem. Anal.* **1997**, 8, 97-104.

6. Sandvoss M., Weltring A. Preiss A. Levsen K., Wuensch G. *J. Chromatogr. A*. **2001,** 917, 75-86.

7. Jaroszewski J. W. *Planta Med.* **2005,** 71, 691-700.

8. Jaroszewski J. W. *Planta Med.* **2005,** 71, 795-802.

9. Exarchou V., Godejohann M., van Beek T. A., Gerothanassis I. P., Vervoort J. *Anal. Chem*. **2003,** 75, 6288-6294.

10. Clarkson C., Staerk D., Hansen S. H., Jaroszewski J. W. *Anal. Chem.* **2005,** 77, 3547-3553.

11. Christophoridou S., Dais P., Tseng L-H., Spraul M. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4667-4679.

12. Seger C., Godejohann M., Tseng L-H., Spraul M., Girtler A., Sturm S., Stuppner H. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 878-885.

13. Simmler C., Antheaume C., Lobstein A. *Plos One*. **2010**, *5(10), e13713*.

14. Simmler C., Antheaume C., André P., Bonté F., Lobstein L. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74,* 949-955.

15. Hossain, M. M. *Fitoterapia*. **2011**, *82, 102-140.*

16. Anuradha V., Parkasa Rao N. S. *Phytochemistry*. **1998**, *48(1), 185-186*.

17. Zhang G-Q., Liu K-W., Chen L-J., Xiao X-J., Zhai J-W., Li L-Q., Cai J., Hsiao Y-Y., Rao W-H., Huang J., Ma W-Y., Chung S-W., Huang L-Q., Tsai W-C., Liu Z-J. *Plos One*. **2013**, *8(4), e60097*.

18. Kocyan A., Vogel E. F. de, Conti E., Gravendeel B. *Mol. Phylogenet. Evol*. **2008**, *48,* 422-443.

19. Clarkson C., Sibum M., Mensen R., Jaroszewski J. W. *J. Chromatogr. A.* **2007**, 1165, 1-9.

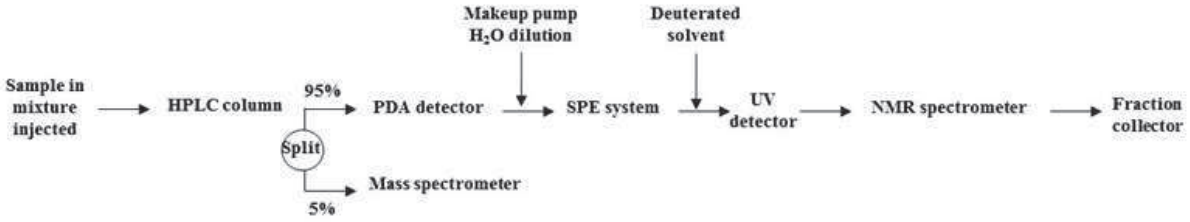
20. Sandvoss M., Bardsley B., Beck T. L., Lee-Smith E., North S. E., Moore P. J., Edwards A. J. Smith R. J. *Magn. Reson. Chem*. **2005**, 43, 762-770.

21. Leong Y-W., Harrison L. J., Powel A. D. *Phytochemistry*. **1999**, *50,* 1237-1241.

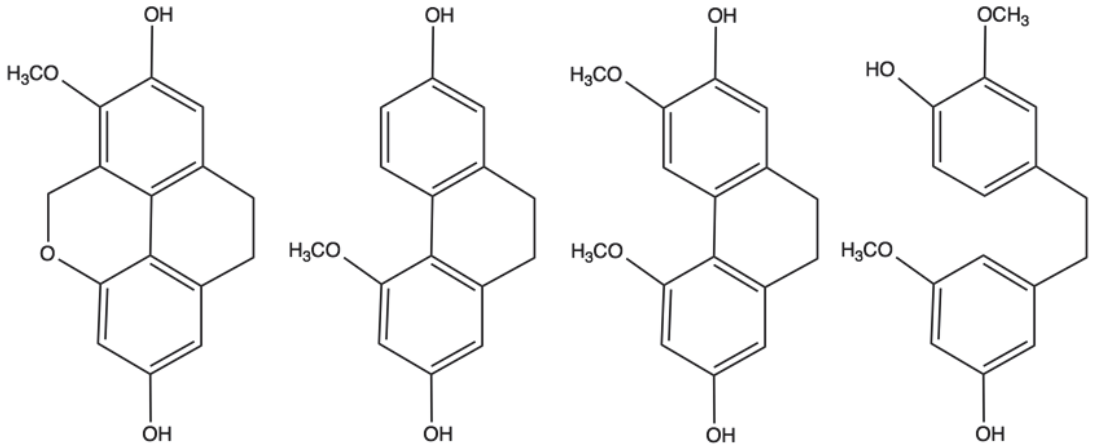
22. Manako Y., Wake H., Tanaka T., Shimomura K., Ishimaru K. *Phytochemistry.* **2001**, *58,* 603-605.

23. Leong Y-W., Kang C-C., Harrison L. J., Powel A. D. *Phytochemistry.* **1997**, *44(1),* 157-165.

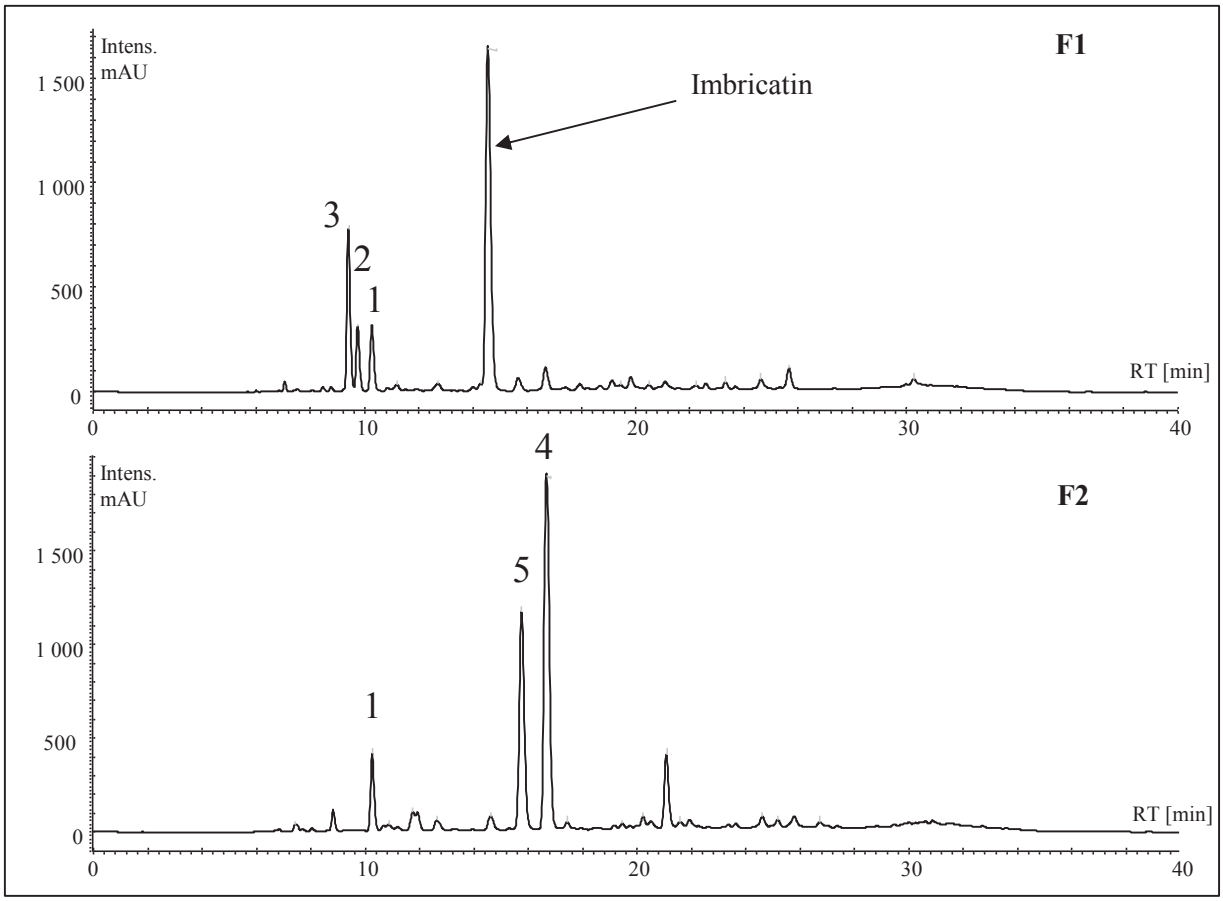
"Figure 1. Schematic description of on-line hyphenated LC-DAD-MS-SPE-UV/NMR system."



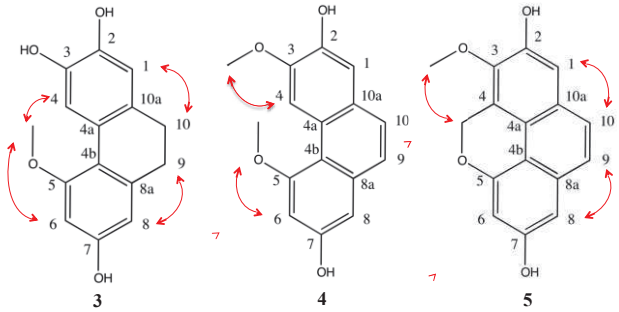
"Figure 2. Structures of the four stilbenoids identified in *A. rosea* stem extract by dereplication."



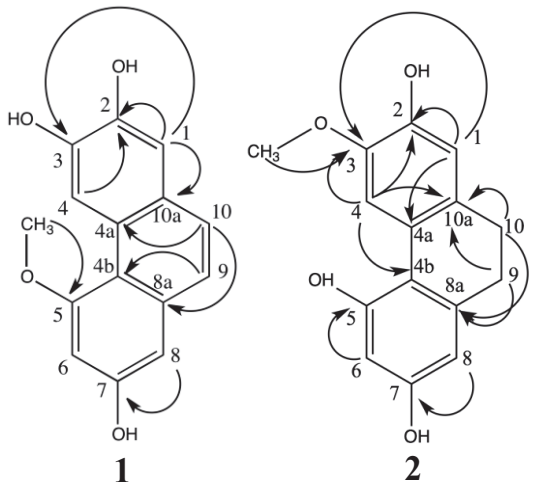
"**Figure 3.** HPLC **c**hromatograms of the fractions of *A. rosea* stems (recorded at 260 nm). Unknown compounds of interest for this study are denoted 1-5."



"**Figure 4.** NOE effects for compounds **3**, **4**, and **5**."



"**Figure 5.** HMBC correlations for compounds **1** and **2**."



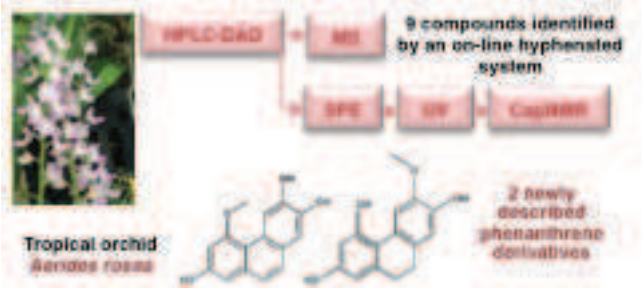
"**Table1.** ^{1}H NMR shift values, multiplicities (mult), and coupling constants (*J*) of compounds **3**, **4**, and **5** measured in MeOD-d_4 at 500 MHz."

Position	**3**	**4**	**5**
	δ H (ppm) mult, (*J* (Hz))		
1	6.60 *s*	7.16 *s*	7.15 *s*
4	7.73 *s*	9.07 *s*	-
6	6.38 *d*, (2.4)	6.74 *d*, (2.4)	6.54 *d* (2.1)
8	6.29 *d*, (2.4)	6.80 *d*, (2.4)	6.76 *d*, (2.1)
9	2.61 *br s*	7.37 *d*, (8.8)	7.45 *d*, (9.0)
10	2.55 *br s*	7.47 *d*, (8.8)	7.48 *d*, (9.0)
3-O-CH_3	-	4.04 *s*	3.91 *s*
5-O-CH_3	3.83 *s*	4.10 *s*	-
5-O-CH_2-	-	-	5.58 *s*

"**Table 2.** ^{1}H NMR shift values, multiplicities (mult), and coupling constants (*J*) of compounds **1** and **2**. ^{13}C shift values were obtained from HSQC and HMBC experiments performed on HPLC-DAD-MS-UV/NMR system (MeOD-d_4 at 500 MHz)."

Position	**1**			**2**		
	δ H (ppm) mult, (*J* (Hz))	δ C (ppm) (HSQC)	HMBC	δ H (ppm) mult, (*J* (Hz))	δ C (ppm) (HSQC)	HMBC
1	7.12 *s*	113.3		6.62 *s*	115.4	
2	-	145.6	H: 4, 1	-	145.0	H: 1, 4
3	-	146.9	H: 1	-	146.3	H: 1, 4, 3-O-CH_3
4	8.95 *s*	113.7		8.00 *s*	113.7	
4a	-	127.9	H: 10	-	126.9	H: 1
4b	-	115.9	H: 9	-	115.3	H: 4
5	-	161.1	H: 5-O-CH3	-	156.8	H: 6
6	6.70 *d*, (2.4)	99.9		6.26 *d*, (2.4)	102.9	
7	-	157.2	H: 8	-	157.4	H: 8
8	6.77 *d*, (2.4)	105.5		6.21 *d*, (2.4)	108.1	
8a	-	136.5	H: 10	-	141.6	H: 9, 10
9	7.30 *d*, (8.8)	124.9		2.59 m	31.4	
10	7.43 *d*, (8.8)	128.4		2.59 m	31.4	
10a	-	125.8	H: 1	-	131.7	H: 4, 9, 10
3-O-CH_3				3.84 *s*	56.4	
5-O-CH_3	4.07 *s*	56.5				

"For Table of Contents Only" Abstract Graphics



Chapitre II
Partie II: Identification des constituants d'*Acampe rigida* (Buch.-Ham. ex Sm.) P. F. Hunt

A. Introduction

En parallèle de l'exploration phytochimique *d'Aerides rosea,* nous nous sommes intéressés à la composition chimique de la deuxième espèce sélectionnée, *Acampe rigida.* Dans le screening préliminaire, les extraits de tiges, racines et feuilles d'*Acampe rigida* ont été comparés en réalisant un extrait hydro-alcoolique (EtOH/eau 90/10 v/v à reflux). Cette extraction a permis une comparaison globale entre les profils chromatographiques de chaque organe de la plante ainsi qu'entre les orchidées décrites par Charlotte Simmler pendant ses travaux de thèse, *Vanda coerulea* et *Vanda teres* (cf page 42). En premier lieu, nous avons observé que les tiges et les racines avaient une composition similaire, contenant probablement des stilbénoïdes communs à ceux de *V. coerulea*, d'après l'analyse de leurs spectres UV. De plus, les concentrations en métabolites étaient comparables dans les deux organes et ce sont donc les tiges que nous avons choisi d'étudier dans un premier temps, et non les racines (**Figure II:37**). Les feuilles ont également retenu notre attention. En observant leur profil chromatographique, quatre composés ont été repérés, absents de tous les autres extraits des espèces étudiées. Ils pourraient être donc des marqueurs phytochimiques potentiels, spécifiques des feuilles d'*A. rigida*. La démarche de notre contribution à l'étude phytochimique de cette espèce sera détaillée dans ce chapitre.

A. I. Caractéristiques et distribution géographique

A.rigida est une espèce à croissance monopodiale, majoritairement épiphyte, mais aussi occasionnellement lithophyte originaire d'Asie. Trouvée dans le Sud-Est asiatique (notamment dans le Yunnan de la Chine, la Thaïlande, le Népal, le Vietnam, ou encore l'Inde), son biotope naturel se trouve dans les régions chaudes tropicales entre 300 et 800 mètres d'altitude. En Thaïlande par exemple, on peut la trouver le plus souvent sur des arbres des forêts humides ou sèches persistantes. Son pic de floraison a lieu entre octobre et janvier. [Nanakorn W. *et al.* 2008 ; www.orchidspecies.com].

A. II. Classification et description botanique

L'espèce est de grande taille, généralement entre 0,4 et 1 m de haut. Ses tiges sont ramifiées et ligneuses, entre 1,5 et 2 cm de diamètre. Ses feuilles sont persistantes et de forme droite. La dimension maximale des feuilles est de 30 à 40 cm de long et 4-5 cm de large. L'inflorescence est souvent courte, comptant entre 5 à 12 fleurs de 1,5 cm. Les pétales et sépales sont jaunes avec un motif de rayures et marques rougeâtres (**Figure**

II:38). Le labelle, muni d'un éperon court, est blanc avec des marques pourpres à rougeâtres. Les fleurs sont légèrement odorantes. [Nanakorn W. *et al.* 2008].

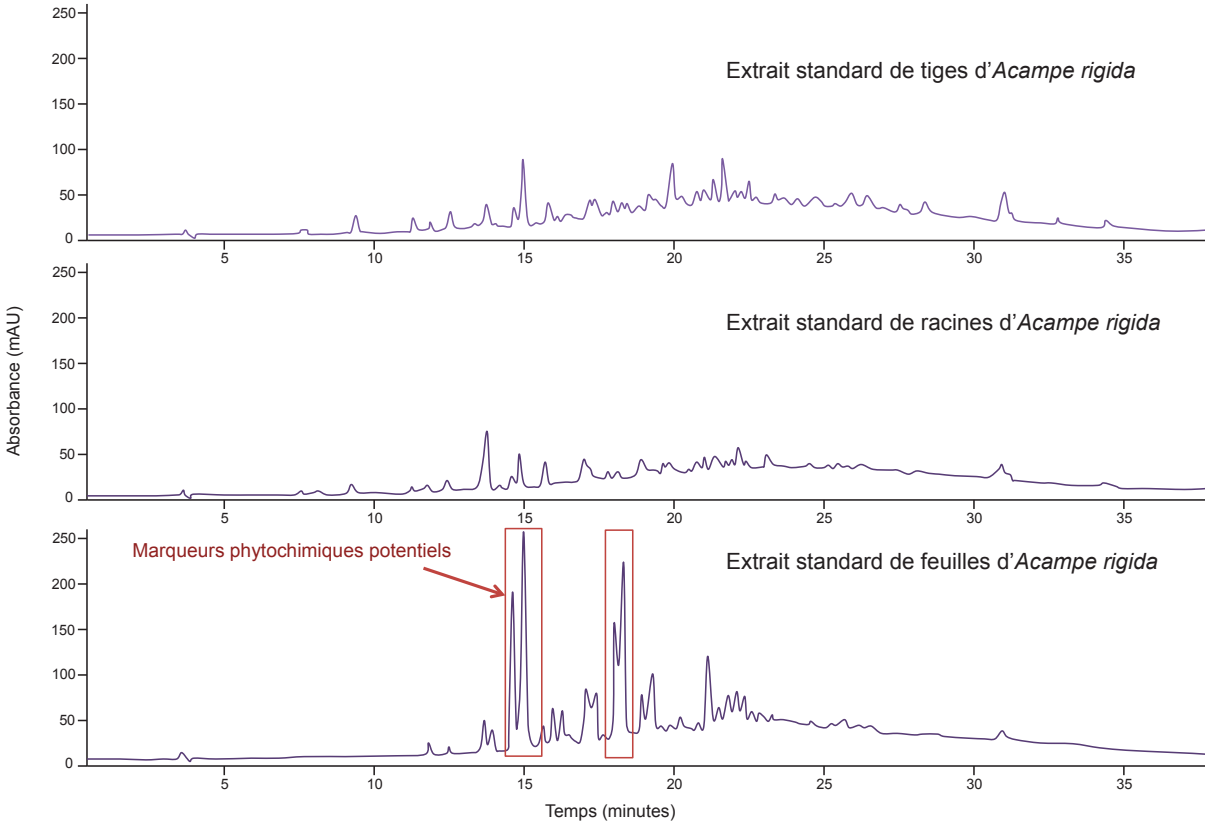


Figure II:37: Comparaison des profils chromatographiques des tiges, feuilles et racines d'*Acampe rigida*. Les composés encadrés en rouge ont été repérés comme marqueurs phytochimiques potentiels des feuilles d'*A. rigida*. Phase stationnaire : Nucleodur C18 250 x 4,6 mm i.d. 5 µm. Phase mobile eau+0,1%A.F. (A) et MeOH +0,1% A.F. (B) Gradient d'élution (temps : %B) : 0 min, 2% ; 30-35 min, 100%. Détection à 60 nm.



Figure II:38: *Acampe rigida* (Buch.-Ham. ex SM.) P. F. Hunt 1: source Collectanea Botanica, Lindley J., planche 38 (1821); 2 : http://eol.org.

La classification d'*Acampe rigida* est décrite ci-dessous selon la classification APG III (2009) [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy ; http://www.tropicos.org]

Règne : Plantae (Plantes)
Sous-règne : Tracheobionta (Plantes vasculaires)
Super-division : Spermatophyta (Plantes à graines)
Division : Magnoliophyta (Plantes à fleurs)
Classe : Monocotylédones
Ordre : Asparagales
Famille : Orchidaceae
Sous- famille : Epidendroideae
Tribu : Vandae
Sous tribu : Aeridinae
Genre : *Acampe* Lindl. (1853)
Espèce : *Acampe rigida* (Buch.-Ham. ex Sm.) P. F. Hunt (1970)

Synonymes : Aerides rigida Buch.-Ham. ex Sm. (1818) ou *Vanda multiflora* Lindl. (1826)

A. rigida a d'autres synonymes, cependant les deux cités ci-dessus sont les plus fréquemment employés.

A. III. Le genre *Acampe*

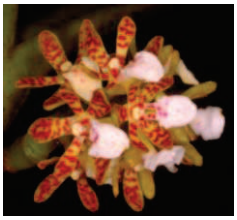
Selon la liste mondiale des plantes, le genre *Acampe* compte 28 espèces, dont seulement sept noms scientifiques sont acceptés [The Plant List of all plant species, http://www.theplantlist.org/browse/A/Orchidaceae/Acampe/]. 21 noms scientifiques sont donc considérés comme des synonymes pour des mêmes espèces (**Tableau II:11**).

A. IV. Usages traditionnels

Certaines orchidées du genre *Acampe* ont été répertoriées comme plantes médicinales traditionnelles, surtout en Inde. Cependant, leur efficacité n'a pas été scientifiquement validée et la nature de leurs principes actifs potentiels n'est pas connue. Généralement, les applications mentionnées dans différentes sources se répètent. En effet, quelques exemples concernent *A. corinata, A. papillosa, A. praemorsa et A. wightiana*, mais ces noms sont en réalité soit des synonymes, soit des variétés d'une même espèce, dont le nom est aujourd'hui scientifiquement accepté (**Tableau II:11**). Les usages traditionnels

concernent donc probablement la même plante. Les exemples d'usages traditionnels sont résumés dans le **Tableau II:12** et concernent dans la plupart des cas les racines. Un seul exemple est donné pour l'application traditionnelle des feuilles [Hossain M. M. 2011].

Tableau II:11: Les espèces du genre *Acampe* et quelques exemples des synonymes avec le même nom du genre. Liste des noms et exemples de synonymes acceptés par WCSP [http://apps.kew.org/wcsp/home.do]. Remarque : Nom illégitime est un nom publié qui ne respecte pas les règles de ICBN (International Code of Botanical Nomenclature). Source des images: Encyclopedia of Life (http://eol.org), Swiss orchid foundation at the Herbarium Jany Renz (http://orchid.unibas.ch/) et WCSP Kew royal botanic gardens (http://apps.kew.org/wcsp/furtherInformation).

Nom scientifique accepté	Synonyme contenant le nom de genre « *Acampe* »	Quelques espèces en images
Acampe carinata (Griff.) Panigrahi	*Acampe papillosa* var. *flava* A.P.Das, Katham & Nirola	
Acampe cephalotes Lindl.		
Acampe joiceyana (J.J.Sm.) Seidenf.	*Acampe thailandica* Seidenf.	
Acampe ochracea (Lindl.) Hochr.	*Acampe dentata* Lindl. *Acampe griffithii* Rchb.f.	
Acampe pachyglossa Rchb.f.	*Acampe madagascariensis* Kraenzl. *Acampe mombasensis* Rendle *Acampe nyassana* Schltr. *Acampe pachyglossa* subsp. *reschiana* (Rchb.f.) Senghas *Acampe renschiana* Rchb.f.	
Acampe praemorsa (Roxb.) Blatt. & McCann	*Acampe excavata* Lindl. *Acampe papillosa* (Lindl.) Lindl. (**nom illegitime**) *Acampe wightiana* (Lindl. ex Wight) Lindl.	
Acampe rigida (Buch.-Ham. ex Sm.) P.F.Hunt	*Acampe intermedia* Rchb.f. *Acampe longifolia* (Lindl.) Lindl. *Acampe multiflora* (Lindl.) Lindl. *Acampe penangiana* Ridl. *Acampe taiwaniana* S.S.Ying *Acampe wightiana* var. *longipedunculata* Trimen	

A. V. Données phytochimiques

Malgré les indications concernant l'usage traditionnel des espèces du genre *Acampe*, aucune investigation phytochimique n'a été retrouvée dans la littérature. Ce fait concerne non seulement le genre *Acampe*, mais également les genres définis comme ses synonymes. Il est donc difficile de prédire la composition d'*Acampe rigida*. La relation taxonomique proche entre les genres *Vanda* ou *Aerides*, contenant notamment des phénanthrènes ou des dérivés hydroxybenzyl malates, supposerait quelques similarités de composition chimique. En effet, quatre stilbénoïdes communs à *Vanda coerulea*, la flavidine, la coelonine, l'imbricatine et le gigantol, ont été détectés dans l'extrait hydro-alcoolique de tiges *d'Acampe rigida* par la méthode de déréplication (cf page 67). Nous avons également observé des similarités des profils chromatographiques des feuilles *d'Acampe rigida* avec celui des tiges de *Vanda teres*. Cependant, aucun dérivé hydroxybenzyl malate de type vandatéroside n'a été retrouvé dans cet organe. Nous ne disposions donc d'aucune indication sur la composition phytochimique des feuilles. Ce premier bilan augmente des chances d'identifier des structures originales au sein de cette espèce.

Tableau II:12: Exemples d'usages des orchidées du genre *Acampe* dans les médecines traditionnelles [Hossain M. M. 2011]

Nom de l'espèce	Organe utilisé	Usages traditionnels	Références
Acampe carinata	Racines	Rhumatisme aiguë, sciatique, névralgie, bénéfique dans le cas de la syphilis secondaire, maladies utérines, piqûres de scorpions, morsures de serpents	[Dash P.K. *et al*. 2008] [Jalal J.S. *et al*. 2008]
Acampe carinata	Feuilles	En association avec l'ail pour les douleurs thoraciques de l'estomac dues à l'hyperacidité	[Dash P.K. *et al*. 2008] [Jalal J.S. *et al*. 2008]
Acampe papillosa	Racines	Rhumatisme, tuberculose, infections vénéneuses, affection hépatique, agent de refroidissement, astringent, expectorant, application sur des brûlures, fièvre, maux de gorge, sciatique, névralgie, maladies utérines, syphilis secondaire	[Pathak P. *et al*. 2001] [Roy A.R. *et al*. 2007] [Chopra R. N. *et al*. 1992]
Acampe praemorsa	Racines	En association avec *Asparagus racemosus* prise par voie orale à jeun pour soigner l'arthrite	[Leander K. K. 1967]
Acampe wightiana	Non spécifié	Tonifiant amer, stimule l'appétit et améliore la digestion	[Caius J. F. 1986] [Kumar S. 2002]

A. VI. Stratégie appliquée

Suite aux résultats des analyses par la méthode de déréplication, nous avons décidé de ne pas poursuivre l'étude phytochimique des tiges. La présence d'autres dérivés phénanthréniques similaires à ceux contenus dans *Vanda coerulea* et *Aerides rosea* était en

effet fortement probable. De plus, leur teneur semblait être beaucoup plus faible. Cette étude sera donc consacrée à la phytochimie des feuilles *d'Acampe rigida.* Nous avons tout d'abord cherché à obtenir un extrait enrichi en métabolites principaux par un solvant adapté, puis l'échantillon a subi différentes étapes de fractionnement. En fonction des profils chromatographiques des différentes fractions, nous avons employé des techniques adaptées à notre problématique. La première stratégie consistait en l'utilisation des techniques phytochimiques classiques, comme l'extraction liquide/liquide, la CLHP semi-préparative et les méthodes spectrales comme CPG-SM et RMN. Pour la deuxième stratégie, des fractions enrichies en métabolites susceptibles d'être spécifiques de cet organe ont été obtenues par chromatographie de partage centrifuge (CPC), puis nous avons procédé à leur identification *on-line* à l'aide du couplage HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN. Notre démarche étape par étape est schématiquement représentée sur la **Figure II:39**. La contribution à l'étude phytochimique de feuilles d'*Acampe rigida* sera décrite et discutée dans cette partie du chapitre.

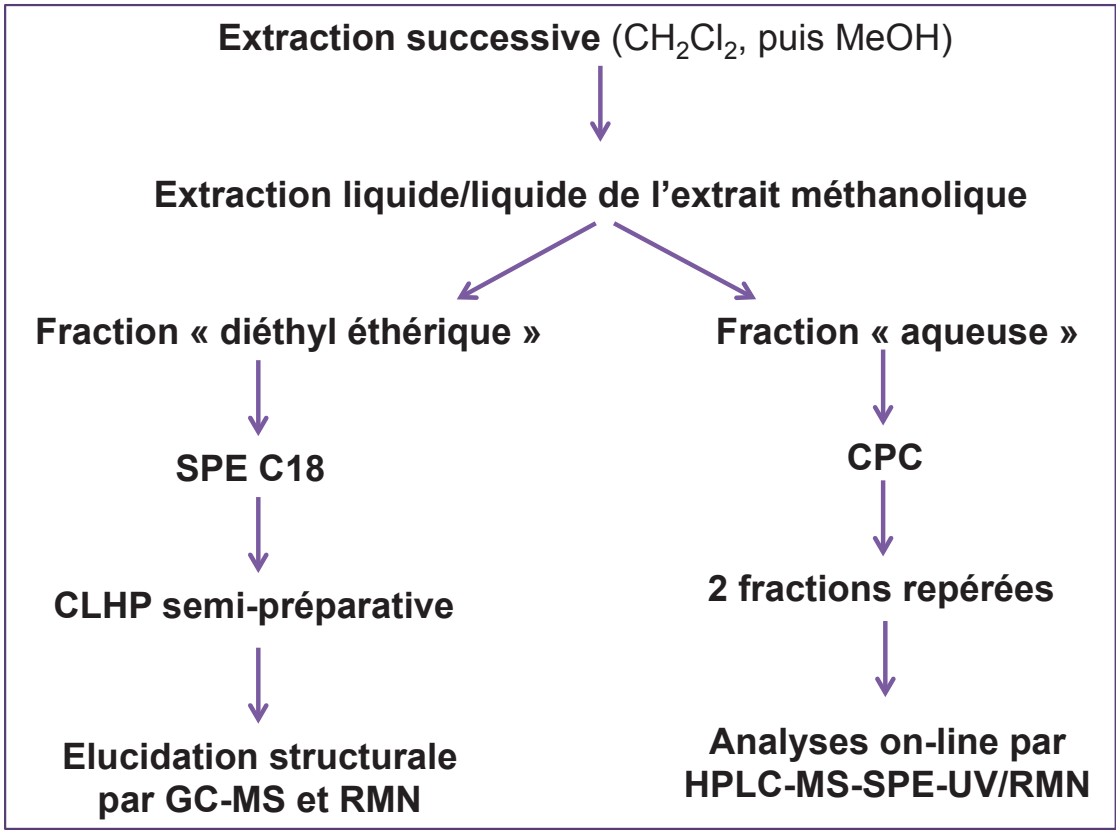


Figure II:39: Schéma représentant les stratégies employées dans l'étude des feuilles d'*Acampe rigida.*

B. Matériel et méthodes

B.I. Matière végétale

Les feuilles d'*Acampe rigida* (Buch.-Ham. ex. Sm.) P. F. Hunt proviennent de TianZi Biodiversity Research & Development Center (Mekong Hill Garden, Jinghong, Xishuagbanna, Yunnan, China), en respectant la convention CITES. Le matériel végétal a été récolté en octobre 2010 à Chiang Mai, Thaïlande (Joe's orchids farm, coordonnées GPS N18° 46', E98° 58'). Le prélèvement a été effectué sur des spécimens cultivés, âgés de plus de 5 ans, au stade de la floraison. Les feuilles ont été séparées des tiges et des racines et directement séchées au soleil direct à 35°C pendant une semaine dans des conditions naturelles d'humidité et de climat tropical.

L'identification botanique d'*Acampe rigida* a été certifiée par le botaniste J. F. Maxwell du Département de botanique de California academy of sciences, détaché actuellement en Thaïlande. Nous attendons la floraison de l'espèce afin de déposer un échantillon d'herbier à l'Herbier de la Faculté des sciences de l'Université de Chiang Mai, en Thaïlande (dépôt prévu en novembre 2013).

Les feuilles séchées ont été transmises par LVMH recherche sous le numéro de lot 2310. Les tiges d'*Acampe rigida* sont nommées tout au long de l'étude sous le code **AcR 2310** (**Figure II:40**).



Figure II:40. Les feuilles séchées d'*Acampe rigida*, lot 2310.

B. II. Broyage

La matière végétale sèche (MVS) a été broyée à l'aide d'un appareillage Retsch (ZM 200). Le broyage s'est fait en deux temps, d'abord grossier à travers un couteau de diamètre moyen (trous ronds de diamètre moyen de 5 mm), puis plus fin (trous trapézoïdaux de diamètre de 2 mm) pour obtenir une poudre fine, compatible avec une extraction optimale.

B. III. Extraction de la matière végétale sèche

La matière première pulvérisée a été extraite par passages successifs de solvants de polarité croissante. D'abord le dichlorométhane (CH_2Cl_2), puis le méthanol (MeOH) Le rapport masse de plante broyée (g)/volume de solvant (mL) est de 1/15.

La MVS est mise au contact avec le dichlorométhane et macérée pendant une heure, puis le mélange est soniqué dans un bain à ultrasons (Fisher Scientifique FB 15060) pendant 10 minutes. L'extrait est filtré sous vide (Büchner). Le filtrat et le marc sont séparés, puis le dernier est récupéré pour refaire la manipulation une deuxième fois.

Après la deuxième extraction au dichlorométhane, le marc est ré-extrait avec le méthanol en suivant la même procédure trois fois.

Les filtrats respectifs sont évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif. On obtient ainsi un extrait **dichlorométhanique** et un extrait **méthanolique**.

B. IV. Analyse des échantillons par CLHP

Afin de suivre l'extraction ainsi que le fractionnement, tous les échantillons ont été analysés par CLHP à l'aide d'un chromatographe LC920 (Varian) équipé des pompes quaternaires, d'un passeur d'échantillons, un four à colonne et d'un détecteur UV à barrettes de diode (DAD).

Les échantillons sont séparés sur une colonne Nucleodur C18ec de 250 x 4,6 mm i.d. avec la porosité de 5 µm (Macherey Nagel) à l'aide d'un gradient d'élution constitué d'un mélange d'eau (solvant A) et de MeOH (solvant B), tous deux acidifiés à 0,1% d'acide formique, dans les conditions suivantes (temps : %B) : 0 min : 2% ; 30-35 min : 100% ; 38 min : 2%.

Les analyses sont effectuées à 30°C avec un débit des pompes réglé à 1 mL/min. Les chromatogrammes sont observés à 260 nm. Le volume d'injection est de 10 µL d'échantillons concentrés à 10 mg/mL.

B. V. Analyse des échantillons par CCM

Afin de suivre le fractionnement des différentes étapes, deux conditions de polarités différentes ont été utilisées. Les échantillons ont été analysés par CCM sur des plaques de gel de silice 60 F_{254} (Merck Millipore) avec un support en aluminium.

- Conditions 1 (pour les composés moyennement polaires et apolaires) :
  Phase mobile : chloroforme / méthanol (94/6) (v/v)
  Observation à 366 nm et 254 nm avant révélation.
  Révélation à la vanilline sulfurique (5% de H_2SO_4 97% de Carlo Erba), observation sous lumière visible après chauffage à 110°C pendant 5 minutes.

- Conditions 2 (pour les composés polaires) :
  Phase mobile : acétate d'éthyle / acide acétique / acide formique / eau (100/11/11/26) (v/v)
  Observation à 366 nm et 254 nm avant révélation.
  Révélation à la vanilline sulfurique (5% de H_2SO_4 97% de Carlo Erba), observation sous lumière visible après chauffage à 110°C pendant 5 minutes.

B. VI. Préfractionnement de l'extrait méthanolique par extraction liquide/liquide

L'extrait méthanolique d'AcR 2310 est sous-fractionné par extraction liquide/liquide. La totalité de l'extrait est dissoute dans l'eau (proportions masse d'extrait/volume de solvant est égale à 100 mg /20 mL). Cette solution est introduite dans une ampoule à décanter et y est rajouté le même volume de diéthyléther ($C_4H_{10}O$), choisi pour sa sélectivité différente par rapport au dichlorométhane plus couramment utilisé. Les deux phases, inférieure et supérieure, sont évaporées à sec, puis pesées pour évaluer le rendement de ce fractionnement.

B. VII. Pré-purification de la fraction diéthyl éthérique par SPE

La fraction éthérique provenant du fractionnement liquide/liquide a été ré-enrichie en composés d'intérêt sur des cartouches Chromabond C18 ec (Macherey Nagel) dans un mélange d'eau et du MeOH (45/55 v/v). Les composés les plus apolaires se retrouvent directement dans 100% de MeOH. Ainsi, deux fractions ont été récupérées. La première fraction a été choisie en vue de l'isolement de ses constituants par CLHP semi-préparative. Le volume des cartouches a été choisi de façon à ce que la masse d'extrait ne dépasse pas 10% du poids de la phase stationnaire.

B. VIII. Isolement de métabolites de la fraction éthérique par CLHP semi-préparative

La purification des métabolites majoritaires concentrés dans la fraction diéthyl éthérique provenant du fractionnement liquide/liquide a été effectuée par CLHP semi-préparative menée sur le chromatographe Gilson 151 UV-VIS, muni d'une pompe 322 et d'un détecteur Gilson 151 UV-VIS. La méthode d'élution consiste en un gradient eau/0,05% acide formique et méthanol/0,05% acide formique. Les conditions sont résumées dans le **Tableau II:13**.

Tableau II:13: Conditions de CLHP semi-préparative pour l'isolement des métabolites contenus dans la fraction diéthyl éthérique de l'extrait méthanolique de feuilles d'AcR 2310.

Appareil	Chromatographe **GILSON –** pompes 322
Logiciel	TRILUTION LC
Phase stationnaire	Nucleodur C18 ec 250 mm x 21,0 mm x 5 µm (Macherey-Nagel)
Détection	à 260 nm
Volume d'injection	Plusieurs injections entre 500 et 1000 µL
Concentration des échantillons	25 mg/mL Filtrés sur 0,45 µm (Roth)
Phase mobile	A : eau + 0,05 % acide formique B : méthanol + 0,05 % acide formique
Gradient d'élution	(temps : %B) : 0 min : 20% ; 14-20 min : 55% ; 24-29 min : 100% ; 31 min : 20%.
Débit	20 mL/ min

B. IX. Identification de métabolites de la fraction diéthyl éthérique par CPG-SM et RMN

Les molécules isolées à partir de la fraction diéthyl éthérique ont été analysées par un chromatographe en phase gazeuse (CPG) (Agilent Technologies 7890 A GC System) couplé à un spectromètre de masse à temps de vol (JEOL AccuTOF IMS-T-100GCv) muni d'une source de type EI/FI (impact électronique/ionisation de champs). Les spectres sont comparés à une base de données existante de NIST (National Institute of Standards and Technology, USA). Les conditions d'élution sont résumées dans le **Tableau II:14**.

En parallèle, les structures de ces molécules ont été confirmées par une analyse de résonance magnétique nucléaire (RMN) monodimensionnelle (^{1}H RMN). Les analyses ont été menées sur un spectromètre Bruker Avance III 400 MHz. Les spectres ont ensuite été analysés à l'aide du logiciel NMR Notebook (NMRTec). Les composés purifiés (1 à 6 mg) ont été préparés dans 400 µL de méthanol deuteré (Méthanol-d_4, CD_3OD ; 99,80%D, Euriso-top) et introduits dans des tubes RMN de 5 mm de diamètre (Euriso-top).

Tableau II:14: Conditions d'élution pour analyse par GC-EI-MS (CPG-SM) des composés contenus dans la fraction diéthyl éthérique de l'extrait méthanolique des feuilles d'AcR 2310.

Colonne	Agilent J&W DB5MS Ultra Inert 20 m x 0,18 mm i.d. x 18 µm 5% Phényle et 95% diméthylpolysiloxane
Elution	A 60° C pendant 1 min, puis jusqu'à 300° C avec augmentation de 15 ° C/min et maintien à 300 ° C pendant 6 min.
Débit d'hélium	8 mL/min
Injecteur	Agilent 7890A avec un injecteur split/spliless 7693A Split 1/5 Température d'injection : 280 ° C
Détection	Mode EI+ Après 2,2 min d'analyse, sur un intervalle de masse de 35 à 700 Da Gaz référence : PFTBA

B. X. Fractionnement de la fraction aqueuse par CPC

a. Appareillage

Les essais de purification sont réalisés sur un système **SCPC250** (colonne CPC de 250 mL) couplé avec un **Spot Prep II** (Armen Instrument) équipé de pompes quaternaires, d'un détecteur UV-DAD (200-600 nm) et d'un collecteur de fractions. Le système est piloté par le logiciel Armen Glider CPC.

b. Tests de partage - détermination des coefficients de partage (Kd)

Nous avons procédé selon la méthodologie appelée « flask test ». Ce test consiste à préparer le système bi-phasique dans une ampoule à décanter, séparer les deux phases, puis dissoudre une pointe de spatule de l'échantillon dans le même volume de chaque phase dans un même flacon. Le même volume de chaque phase est ensuite analysé par CCM (observations à l'œil nu) ou par CLHP. L'aire de chaque pic permet de calculer les coefficients de partage Kd selon la formule

Kd= [A] stat / [A] mob

où [A] est la concentration du soluté dans la phase stationnaire divisée par celle dans la phase mobile.

c. Choix du système de solvant - fraction aqueuse de l'éxtrait méthanolique d'AcR2310

En premier lieu, la fraction aqueuse de l'extrait méthanolique des feuilles d'*A. rigida* a été pré-fractionnée avec un système bi-phasique composé de trois solvants : EtOH-Eau-AcOEt. Plusieurs tests de partage ont été réalisés avec des proportions différentes de chaque solvant, en se basant sur le diagramme ternaire représenté sur la **Figure II:41**.

En fonction du diagramme ternaire du système de solvants EtOH-eau-AcOEt, il est possible de calculer la composition de chaque phase. Sur une même ligne de conjugaison, la composition du système et son équilibre ne varient pas. La proportion de la phase inférieure augmente de gauche à droite (augmentation de la proportion en eau), les mêmes volumes des deux phases sont obtenus au milieu de la ligne. Les deux phases ont été préparées au préalable dans une ampoule à décanter dans les proportions d'**EtOH/eau/AcOEt 18/40/42** v/v/v, correspondant au milieu d'une ligne de conjugaison et ainsi obtenir le même volume des deux phases. La phase inférieure étant choisie comme phase stationnaire, l'élution se déroule en mode ascendant (ASC) pour une élution isocratique.

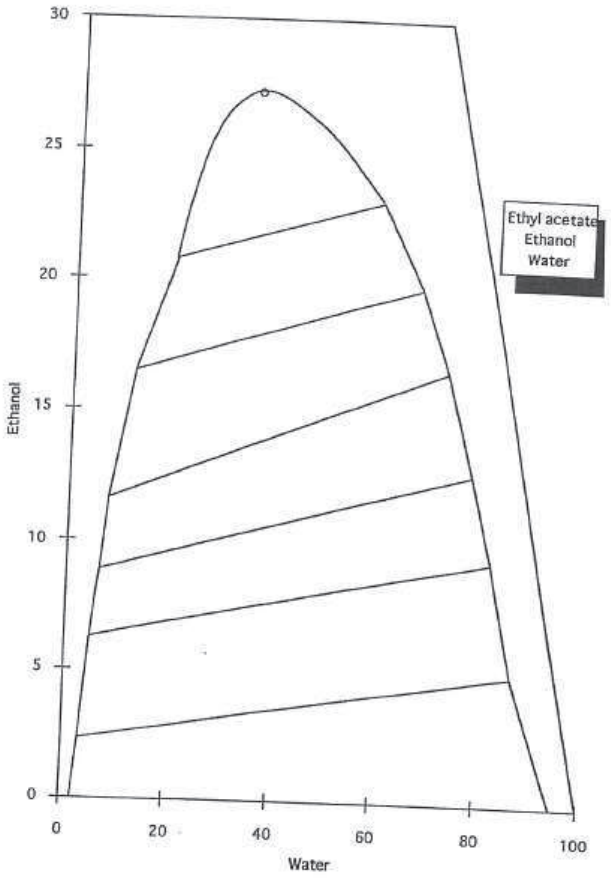


Figure II:41. Diagramme ternaire du système bi-phasique constitué d'acétate d'éthyle-éthanol-eau (document fourni par Armen instrument).

d. *Conditions CPC - fraction aqueuse de l'extrait méthanolique d'AcR 2310*

Chargement de la phase inférieure du système [**EtOH/Eau/AcOEt, 18/40/42** (v/v/v)] en mode ASC

Rotation : 500 rpm, débit : 30 mL/min

Equilibre avec la phase supérieure du système [**EtOH/Eau/AcOEt, 18/40/42** (v/v/v)] à 1800 rpm, 6 mL/min

Après la rétention, **injection** de l'échantillon dissous dans les mêmes proportions de chaque phase à travers une boucle de 10 mL

Elution avec la phase supérieure 1800 rpm, 6 mL/mn pendant 1h 40 min

Début **extrusion** avec la phase inférieure à t = 1h 40min sur chromatogramme CPC, 1800 rpm, 20 mL/min pendant 20 min

Détection à 260 nm, 280 nm et scan de 220 nm à 280 nm.

La méthode utilisée est résumée dans le **Tableau II:15**. Au total, 7 g d'extrait sont injectés.

Tableau II:15: Méthode CPC utilisée pour éluer la fraction aqueuse de l'extrait méthanolique des feuilles d'AcR 2310.

	T (min)	Débit (mL/min)	Phase stat (%) (ph. inf.)	Phase mob (%) (ph. sup.)
Préparation colonne	00 :00	30	100	0
	10 :00	30	100	0
	10 :03	6	0	100
	45 :00	6	0	100
Elution	00 :00	6	0	100
	01 :40 :00	6	0	100
Extrusion	01 :40 :03	20	100	0
	02 :00 :00	20	100	0
Solution injectée	Solution de la fraction aqueuse de l'extrait méthanolique des feuilles d'AcR2310 (filtrée sur 0.45µm)			
Masse injectée	4 injections de **2,2** g, **2,1** g, **1,2** g et **1,5** g dans 5 mL de chaque phase du système solvant			
Système solvant	EtOH/Eau/AcOEt (18/40/42, v/v/v)			
Débit d'élution	6 mL/min			
Détection	260 nm, 280 nm et scan de 220 nm à 280 nm			

Les fractions des quatre injections sont analysées par CCM puis regroupées en fonction des profils obtenus : 10 regroupements sont réalisés.

Chacun de ces regroupements est ensuite analysé par CLHP. Les regroupements correspondant aux fractions enrichies en quatre composés d'intérêt, sont nommés **fraction 5** et **fraction 8**.

Chacune de ces fractions subit une autre étape d'enrichissement, également par CPC, afin d'augmenter la pureté des composés recherchés.

e. Conditions CPC-Enrichissement de composés contenus dans la fraction 5

Les composés d'intérêt dans cette fraction sont nommés **C** et **D**.

Cette fraction est éluée avec un système de solvant différent du précédent en mode isocratique. Après réalisation des tests de partage, le mélange de solvants bi-phasique retenu a été AcOEt/BuOH/eau 40/10/50 v/v/v. Les deux phases, inférieure (phase stationnaire) et supérieure (phase mobile) ont été préparées au préalable à l'aide d'une ampoule à décanter.

Chargement de la phase inférieure en mode ASC : 500 rpm, 30 mL/min

Equilibre avec la phase supérieure [**AcOEt/BuOH/Eau, 40/10/50** (v/v/v), 1800 rpm, 6 mL/min

Après la rétention, **injection** de l'échantillon à travers une boucle de 10 mL

Elution avec la phase supérieure, 1800 rpm, 6 mL/min pendant 2h

Début **extrusion** avec la phase inférieure à t=2h sur chromatogramme CPC, 1800 rpm, 20 mL/min pendant 20 min

Détection à 260 nm, 280 nm et scan de 220 nm à 280 nm.

La méthode utilisée est résumée dans le **Tableau II:16**. Au total, 250 mg de la **fraction 5** sont injectés.

Tableau II:16: Méthode CPC utilisée pour éluer la fraction 5 contenant les composés C et D de l'extrait méthanolique des feuilles d'AcR 2310.

	T (min)	Débit (mL/min)	Phase stat (%) (ph. inf.)	Phase mob (%) (ph. sup.)
Préparation colonne	00 :00	30	100	0
	10 :00	30	100	0
	10 :03	6	0	100
	45 :00	6	0	100
Elution	00 :00	6	0	100
	02 :00 :00	6	0	100
Extrusion	02 :00 :03	20	100	0
	02 :20 :00	20	100	0
Solution injectée	Solution de la fraction 5 de l'extrait méthanolique des feuilles d'AcR2310 (filtrée sur 0.45µm)			
Masse injectée	250 mg dans 5 mL de chaque phase du système solvant			
Système solvant	AcOEt /BuOH/Eau (40/10/50, v/v/v)			
Débit d'élution	6 mL/min			
Détection	260 nm, 280 nm et scan de 220 nm à 280 nm			

f. Conditions CPC-Enrichissement de composés contenus dans la fraction 8

Les composés d'intérêt dans cette fraction sont nommés **A** et **B**.

Cette fraction est éluée avec le même système de solvants que la fraction 5, en mode isocratique, mais avec des proportions différentes de chaque solvant. Après réalisation des tests de partage, le mélange de solvants bi-phasique retenu a été AcOEt/BuOH/eau 30/20/50 v/v/v. Les deux phases, inférieure (phase stationnaire) et supérieure (phase mobile) ont été préparées au préalable à l'aide d'une ampoule à décanter.

Chargement de la phase inférieure en mode ASC : 500 rpm, 30 mL/min

Equilibre avec la phase supérieure [**AcOEt/BuOH/Eau, 30/20/50** (v/v/v), 1800 rpm, 6 mL/min

Après la rétention, **injection** de l'échantillon à travers une boucle de 10 mL

Elution avec la phase supérieure, 1800 rpm, 6 mL/min pendant 2h 45 min

Début **extrusion** avec la phase inférieure à t=2h 45 min sur chromatogramme CPC, 1800 rpm, 20 mL/min pendant 20 min

Détection à 260 nm, 280 nm et scan de 220 nm à 280 nm.

La méthode utilisée est résumée dans le **Tableau II:17**. Au total, 270 mg de la **fraction 8** sont injectés.

Tableau II:17: Méthode CPC utilisée pour éluer la fraction 8 contenant les composés A et B de l'extrait méthanolique des feuilles d'AcR 2310.

	T (min)	Débit (mL/min)	Phase stat (%) (ph. inf.)	Phase mob (%) (ph. sup.)
Préparation colonne	00 :00	30	100	0
	10 :00	30	100	0
	10 :03	6	0	100
	45 :00	6	0	100
Elution	00 :00	6	0	100
	02 :45 :00	6	0	100
Extrusion	02 :45 :03	20	100	0
	03 :05 :00	20	100	0
Solution injectée	Solution de la fraction 8 de l'extrait méthanolique des feuilles d'AcR2310 (filtrée sur 0.45µm)			
Masse injectée	270 mg dans 5 mL de chaque phase du système solvant			
Système solvant	AcOEt /BuOH/Eau (40/10/50, v/v/v)			
Débit d'élution	6 mL/min			
Détection	260 nm, 280 nm et scan de 220 nm à 280 nm			

Le **Tableau II:18** résume les différentes injections, le système de solvant utilisé ainsi que les quantités injectées dans chaque analyse.

Les fractions obtenues ont été rassemblées en fonction de leurs profils CLHP. Les regroupements les plus intéressants ont été nommés Fraction AB et Fraction CD, contenant les composés A et B et C et D, respectivement.

Tableau II:18. Récapitulatif des injections CPC pour purifier les composés A, B, C et D de l'extrait méthanolique des feuilles d'AcR2310.

Echantillon	Colonne	Masse injectée	Système Solvant	Vitesse rotation	Débit	Mode	Détection
Fraction aqueuse de l'extrait méthanolique des feuilles d'AcR2310	SCPC 250mL Volume réel mesuré 285 mL	7 g	EtOH/AcOEt/Eau (18/40/42, v/v/v/) isocratique	1800 tr/min	6 mL/min	ASC	260 nm 280 nm Scan 220-280 nm
Fraction 5 (composés C et D)		250 mg	AcOEt/BuOH/Eau (40/10/50, v/v/v) isocratique			ASC	
Fraction 8 (composés A et B)		270 mg	AcOEt/BuOH/Eau (30/20/50, v/v/v)			ASC	

B. XI. Analyse des métabolites A, B, C et D de la fraction aqueuse par HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN

Les conditions décrites ci-dessous ont été appliquées pour analyser les **fractions AB** et **CD** respectivement, provenant du fractionnement par CPC. Toutes les analyses ont été menées sur un système de couplage HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN (cf chapitre Introduction pages 50-55). Pour le moment, il ne s'agit que des essais préliminaires nous conduisant aux hypothèses de structures des métabolites A, B, C et D. Toutes les étapes devront être optimisées pour élucider la structure de ces quatre métabolites sans équivoque.

a. CLHP

Les fractions ont été séparées sur une colonne ProntoSIL C18 125 x 4 mm avec la porosité de 5 µm (Bischoff Chromatography) à l'aide d'un gradient d'élution constitué d'un mélange d'eau (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B), tous deux acidifiés à 0,05% d'acide formique, dans les conditions suivantes (temps : %B) :

Fraction AB: 0 min : 5% ; 10-19 min : 20% ; 20-25 min : 100%.

Fraction CD: 0 min : 20% ; 10-15 min : 17% ; 18-23 min : 100%.

Les analyses sont effectuées à 30°C avec un débit des pompes réglé à 1 mL/min. Les chromatogrammes sont observés à 254 nm. Le volume d'injection est de 5 µL d'échantillons concentrés à 5 mg/mL.

b. Spectrométrie de masse

L'éluât sorti de la colonne chromatographique a été séparé en deux parties : 5% de l'échantillon sont élués vers le spectromètre de masse et 95% vers le détecteur à barrettes de diode (DAD) et piégés sur des cartouches SPE en vue de l'élution vers la RMN. L'acquisition des spectres de masse a été menée en mode positif avec la pression du nébuliseur à 10 psi, débit du gaz de séchage de 8 L/min et température de séchage à 300 °C. Le voltage capillaire a été paramétré à 4000 V. L'échelle de détection a été fixée entre 50 et 1000 Da.

c. SPE-UV

Afin de réduire la proportion d'acétonitrile et augmenter la rétention des composés d'intérêt sur les cartouches SPE, la phase mobile sortante de CLHP a été diluée avec l'eau acidifiée à 0,05% d'acide formique, utilisant une pompe « make-up » (Knauer-120 make-up pump) avec un débit de 3 mL/min. Les composés d'intérêt ont été piégés sur des cartouches HLB 10 x 1 mm (Oasis, Waters), conditionnées au préalable avec 500 µL d'acétonitrile à 6 mL/min et équilibrées avec 500 µL d'eau à 1 mL/min avant le piégeage. Afin d'obtenir des quantités suffisantes de produits piégés sur les cartouches pour une analyse RMN, douze injections ont été répétées et les pics d'intérêt ont été piégés en fonction de leurs signaux en UV et MS. Avant l'élution des composés vers la sonde RMN, un détecteur UV est placé en sortie de la SPE (VWD detector Agilent technologies) et paramétré à 254 nm. Les cartouches ont été séchées avec un débit d'azote pendant 30 min, puis encore 1 minute chaque cartouche juste avant l'élution des produits vers la sonde RMN. Les composés « multi-piégés » ont été élués avec 220 µL d'acétonitrile deutéré (CD_3CN contenant moins de 0,05% d'eau ; Euriso-top) vers une sonde LC-SEI (Bruker) d'un volume actif de 30 µL. Après l'analyse RMN, tous les composés ont été collectés dans des tubes de 1,5 mL à l'aide d'un collecteur de fractions (ISCO Foxy R1 Teledyne).

d. RMN

Les composés « multi-piégés » ont été élués avec 220 µL d'acétonitrile-d_6 (CD3CN contenant moins de 0,05% d'eau ; Euriso-top) vers une sonde LC-SEI (Bruker) d'un volume actif de 30 µL.

Les analyses RMN on été menées sur le spectromètre Bruker AVIII 500MHz, équipé d'une sonde LC-SEI de 30 µL (Bruker PH LC-SEI 500SB H-C/D-3 ZNA). Après l'analyse

RMN, tous les composés ont été collectés dans des tubes de 1,5 mL à l'aide d'un collecteur de fractions (ISCO Foxy R1 Teledyne).

C. Résultats et discussion

C. I. Enrichissement des métabolites d'intérêt et rendements d'extractions

Dans un premier temps, nous avons cherché à obtenir un extrait enrichi en métabolites d'intérêt. Un protocole d'extraction a ainsi été optimisé afin de concentrer les composés dans un extrait adapté en réalisant des extractions successives avec des solvants de polarité croissante. Les quatre molécules étant relativement polaires, nous avons d'abord éliminé tous les composés apolaires ou de polarité moyenne, qui n'avaient pas d'intérêt dans cette étude, dans un extrait dichlorométhanique. Cette première étape a permis d'abord de fragiliser les cellules végétales en laissant pénétrer le premier solvant d'extraction, puis de simplifier l'extrait final enrichi que nous avons obtenu avec le méthanol.

Deux extraits ont ainsi été récupérés à partir de 100 g de feuilles d'*A. rigida*, un extrait « CH_2Cl_2 » avec un rendement de 5,03% et un extrait « MeOH » avec un rendement de 12,52%. Les composés d'intérêt dans cette étude ont été nommés A, B, C et D (**Figure II:43**)

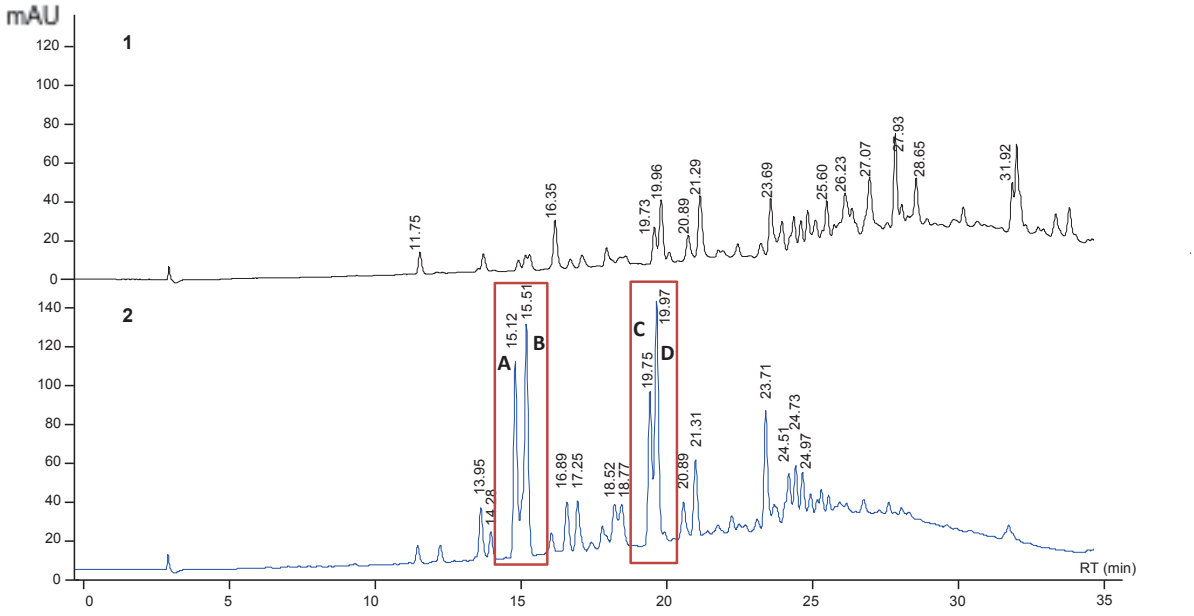


Figure II:43. Profils chromatographiques des extraits CH_2Cl_2 (1) et MeOH (2) des feuilles d'AcR2310 à 260 nm. Les composés d'intérêt sont contenus dans l'extrait MeOH et nommés A, B, C et D. Phase stationnaire : Nucleodur C18 250 x 4,6 mm i.d. 5 µm. Phase mobile eau+0,1%A.F. (A) et MeOH +0,1% A.F. (B) Gradient d'élution (temps : %B) : 0 min, 2% ; 30-35 min, 100%.

C. II. Extraction liquide/liquide de l'extrait méthanolique

L'extrait méthanolique, déjà enrichi en métabolites A, B, C et D, reste très complexe et contient encore des composés en commun avec l'extrait dichlorométhanique. Afin de simplifier l'extrait méthanolique au maximum et éliminer ces composés, nous avons procédé à une extraction liquide/liquide avec deux solvants non miscibles et différents des solvants d'extraction, eau et diéthyl éther. Ainsi, deux critères ont été mis à profit, une polarité très différente, mais également la sélectivité de ces deux solvants. En effet, le diéthyl éther ($C_4H_{10}O$), plutôt apolaire, devait attirer les mêmes molécules extraites déjà en partie avec le dichlorométhane. Les molécules visées dans cette étude, très polaires, devait se retrouver dans la fraction aqueuse (H_2O). Nous pouvons observer sur la **Figure II:44**, que les deux types de composés ont bien été enrichis dans les phases attendues avec un rendement de 12,42% pour la fraction $C_4H_{10}O$ et 64,27% pour la fraction H_2O. Une partie de cet extrait (24,31%) n'a été soluble ni dans le diéthyl éther, ni dans l'eau, et a été de nouveau regroupée avec l'extrait méthanolique de départ.

Le fractionnement liquide/liquide a été une démarche intéressante en vue de simplifier l'extrait MeOH, grâce à la sélectivité et la polarité très différentes des deux solvants utilisés. Les composés dans l'extrait méthanolique, ont déjà eu un peu d'affinité avec le dichlorométhane. Cependant, cette première extraction solide/liquide n'a pas été suffisante pour les épuiser en totalité de la plante. De polarité moyenne, ils se sont retrouvés dans le deuxième extrait. N'ayant aucune affinité avec l'eau, le diéthyl éther a permis de les enrichir et ainsi les isoler de l'extrait méthanolique de départ. Au vu du profil chromatographique plutôt simple de la fraction $C_4H_{10}O$, nous avons voulu isoler et identifier les métabolites élués entre 11,75 et 18,08 min à partir des feuilles d*'Acampe rigida* (**Figure II:44**).

C. III. Purification des composés DE_1 à DE_3 de la fraction $C_4H_{10}O$ par SPE et CLHP semi-préparative

Dans l'objectif de purifier les composés élués entre 11,75 et 18,08 min contenus dans la fraction $C_4H_{10}O$ (cf chromatogramme **3** sur la **Figure II:44**), par CLHP semi-préparative, nous avons d'abord procédé à une première purification par extraction en phase solide sur phase inverse (C18). Cette manipulation avait pour but d'éliminer tous les autres composés minoritaires observés sur le chromatogramme CLHP élués après le dernier composé d'intérêt (à 18,08 min) et ainsi protéger la colonne semi-préparative tout en réduisant le temps d'élution et de lavage après chaque injection.

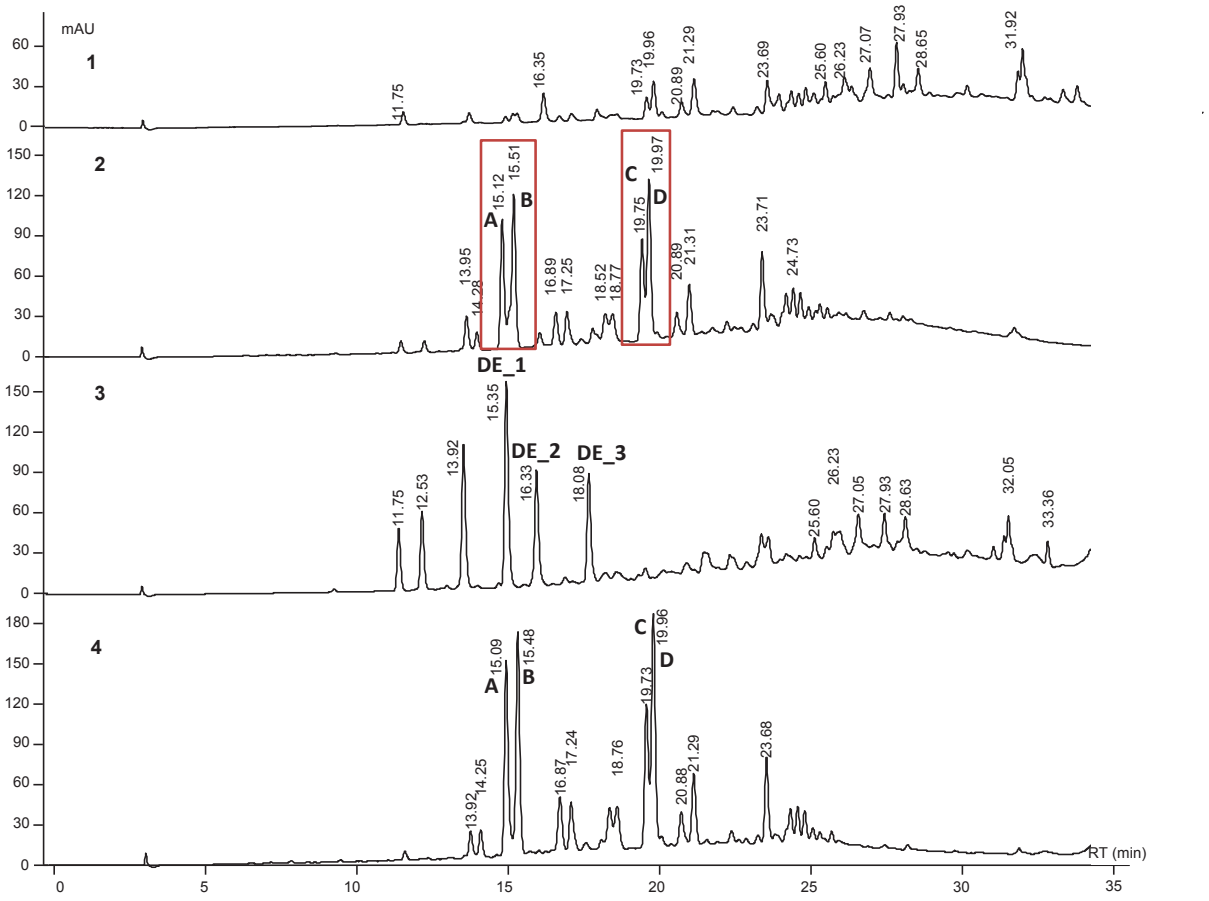


Figure II:44: Profils chromatographiques des extraits CH_2Cl_2 (1) et MeOH (2) des feuilles d'AcR2310, de la fraction $C_4H_{10}O$ (3) et de la fraction H_2O provenant d'une extraction liquide/liquide (4). Les chromatogrammes sont observés à 260 nm. Phase stationnaire : Nucleodur C18 250 x 4,6 mm i.d. 5 µm. Phase mobile eau+0,1%A.F. (A) et MeOH +0,1% A.F. (B) Gradient d'élution (temps : %B) : 0 min, 2% ; 30-35 min, 100%.

La SPE en C18 fonctionne sur le même principe que CLHP en phase inverse. Un mélange est élué par une phase mobile constituée d'eau et d'un solvant organique sur la base du principe d'affinité des différents constituants du mélange pour la phase mobile ou la phase stationnaire. En se basant sur le chromatogramme CLHP, on peut donc prédire approximativement le comportement du mélange sur la cartouche SPE et ainsi déterminer les proportions de la phase mobile. En analyse CLHP, le dernier composé d'intérêt, est élué à environ 55% de MeOH et 45% d'eau. Ce mélange a donc été utilisé pour éluer la totalité de la fraction $C_4H_{10}O$. Ainsi, deux fractions ont été obtenues : la fraction 55/45 MeOH/eau v/v contenant majoritairement six composés (rendement 35% ramené à la masse d'extrait sec passé sur les cartouches SPE), et la fraction 100% MeOH contenant les composés à éliminer (rendement 57%). 8% d'extrait n'ont pas été élués de la cartouche SPE.

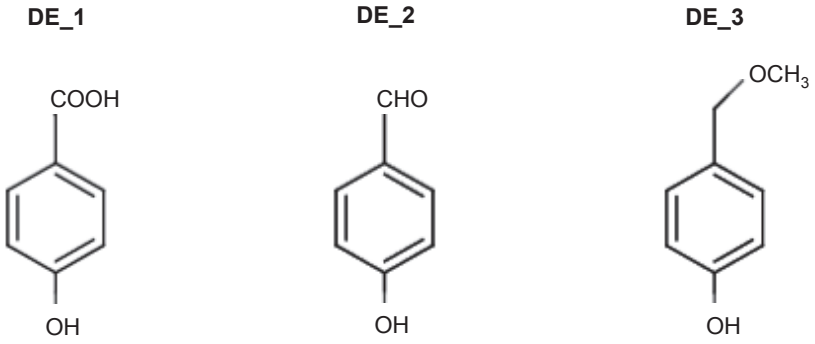
Une partie de la première fraction 55/45 MeOH/eau a été injectée quatre fois en CLHP semi-préparative afin d'isoler séparément les composés recherchés. Cette seconde étape de purification a permis d'obtenir trois composés en quantité suffisante et de pureté satisfaisante. En effet, les composés élués à 11,75; 12,53 et 13,92 min ont été isolés en mélange avec d'autres produits inconnus et leur quantité était insuffisante pour envisager leur élucidation structurale. Il est possible que leur quantité dans l'extrait de départ soit moindre, malgré leur absorbance en UV. Nous n'avons pas poursuivi leur purification pour le moment. Cependant, les trois autres composés ont été isolés avec un degré de pureté satisfaisant pour élucider leur structure. Ils ont été nommés **DE_1** (15,35 min), **DE_2** (16,33 min) et **DE_3** (18,08 min) (cf **Figure II:44**). Nous avons obtenu 5,2 mg de **DE_1**, 1,4 mg de **DE_2** et 3,1 mg de **DE_3**, tous avec un degré de pureté relative à 260 nm d'au moins 90%. Bien entendu, ces rendements obtenus ne reflètent pas leur teneur massique dans l'extrait méthanolique de départ, car nous n'avons utilisé à chaque étape qu'une partie de chaque fraction seulement, dans le but d'une étude qualitative et non quantitative.

C. IV. Caractérisation structurale des composés DE_1 à DE_3

Les métabolites, ainsi purifiés, ont pu être analysés selon différentes techniques spectrométriques (UV, CPG-SM et RMN 1D) afin de procéder à leur caractérisation structurale. La présentation des résultats est basée sur la comparaison des données spectroscopiques, certains ont été comparés avec des bases de données existantes. Dans ce paragraphe, la codification employée précédemment sera remplacée par les noms chimiques de chaque composé identifié afin de simplifier la lecture des données présentées.
La comparaison des données spectrales obtenues à celles précédemment publiées nous a permis d'identifier 3 dérivés phénoliques (**Figure II:45**).

a. Spectres UV

Les spectres UV ont été extraits directement des chromatogrammes CLHP de chaque molécule purifiée. Ils ont donc été mesurés dans un mélange d'eau et de méthanol acidifiés à 0,1% d'acide formique, dans les proportions correspondant à la composition du gradient au temps d'élution de chaque composé (**Figure II:46**). Leurs maxima d'absorbance ont été comparés à ceux répertoriés dans la base de données du Dictionnaire des produits naturels [http://dnp.chemnetbase.com, accès en mai 2013].



Acide 4-hydroxy-benzoïque **4-hydroxy-benzaldéhyde** **4-methoxyméthyl-phenol**

Figure II:45: Corrélation entre la codification/structure et dénomination des composés isolés de la fraction $C_4H_{10}O$ de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Acampe rigida*.

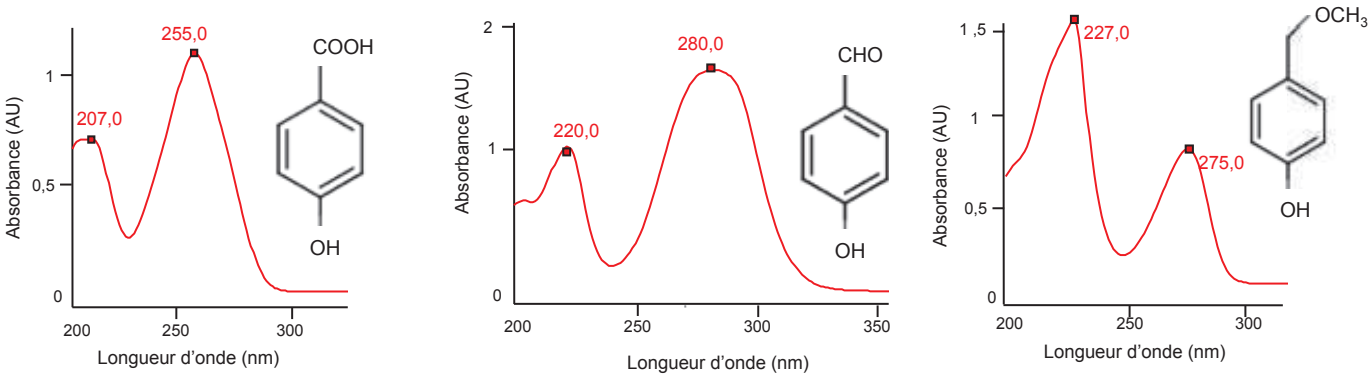


Figure II:46: Spectres UV de l'acide 4-hydroxy-benzoïque, 4-hydroxy-benzaldéhyde et du 4-methoxyméthyl-phénol (de gauche à droite).

b. Spectres de masse

L'identification des trois métabolites a été obtenue, dans un premier temps, par une analyse CPG-SM (GC-HRMS), en comparant leurs spectres de masse (ionisation à impact électronique, analyseur à temps de vol ToF) à ceux des témoins enregistrés dans une banque de données de NIST (National Institute of Standards and Technology, USA), disponible au laboratoire (**Figure II:47**). Cette méthode a été employée à la place d'un couplage CLHP-SM pour sa source d'ionisation différente, l'impact électronique (EI). En effet, l'électrospray n'ionisait pas ces composés de façon suffisante pour réussir à calculer leur formule brute.

En se basant sur les spectres de masse obtenus lors de cette analyse, la base de données a proposé des hypothèses de structure ainsi que sa formule brute pour chaque composé avec la masse de l'ion moléculaire m/z formé par l'impact électronique et ses

fragments ioniques respectifs. Ainsi, l'acide 4-hydroxybenzoïque a été proposé avec une probabilité de 77,5% ($C_7H_6O_3$, m/z=138), le 4-hydroxy-benzaldéhyde de 77,7% ($C_7H_6O_2$, m/z=122) et enfin, le 4-méthoxyméthyl-phénol de 94,2% ($C_8H_{10}O_2$, m/z=138).

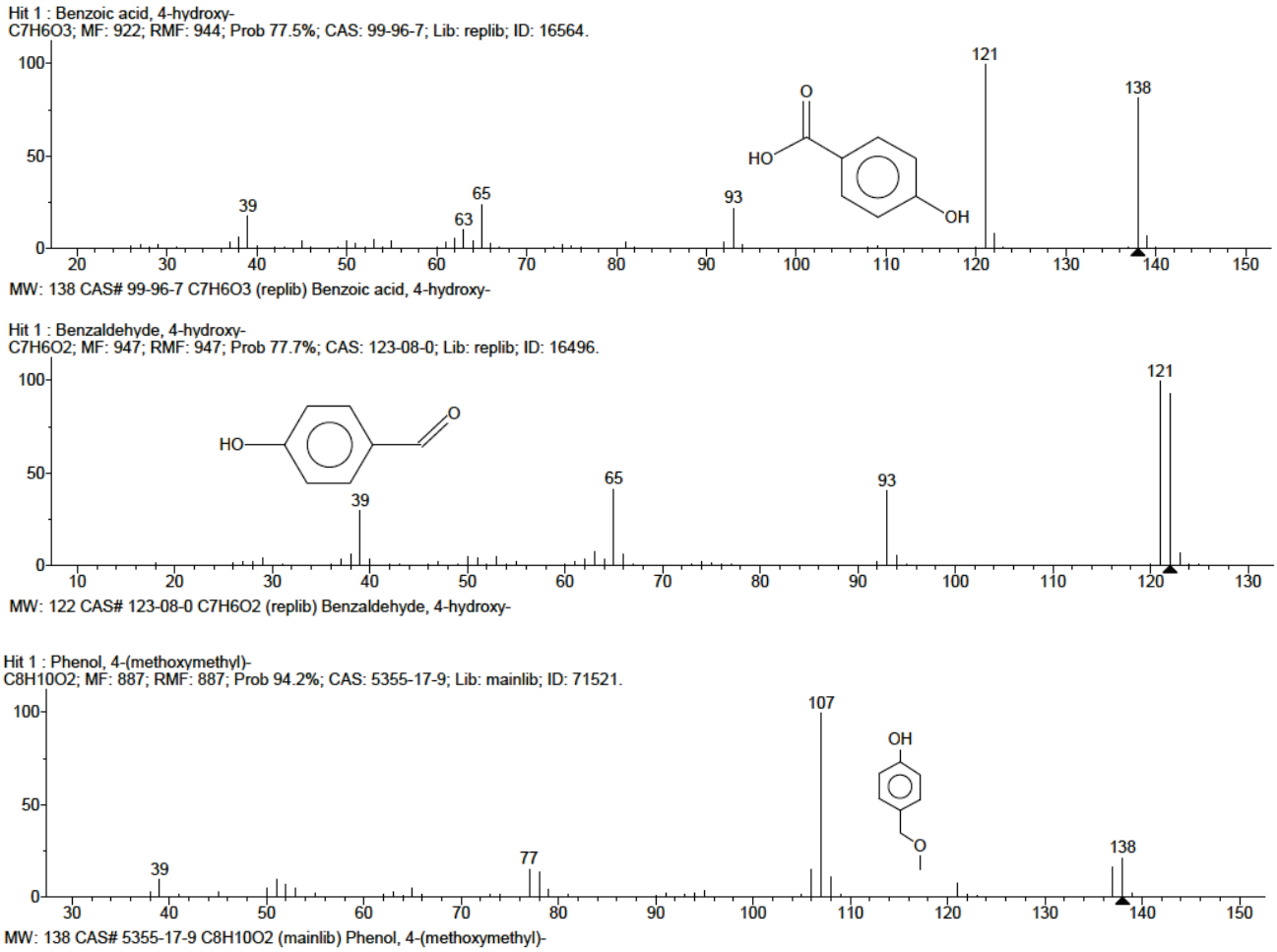
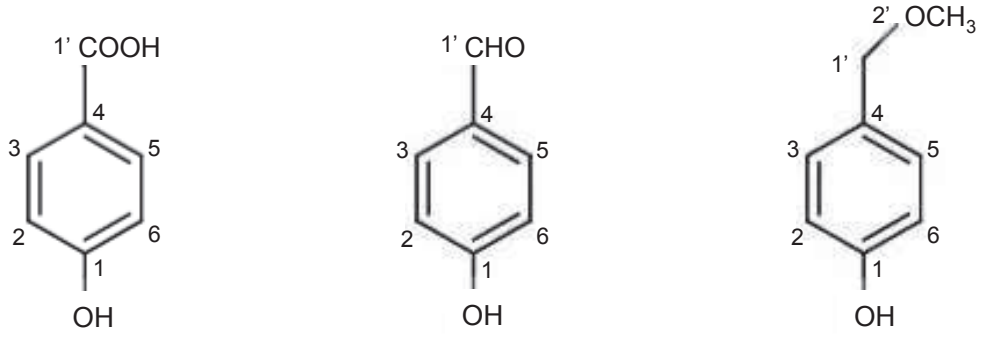


Figure II:47: Spectres de masse de l'acide 4-hydroxy-benzoïque, 4-hydroxy-benzaldéhyde et du 4-methoxyméthyl-phénol (de haut en bas) obtenus à partir d'une analyse CPG-SM (ionisation EI, spectromètre de masse ToF).

c. RMN

Parallèlement à l'analyse CPG-SM, les structures des trois métabolites ont été élucidées sans équivoque par l'analyse RMN 1D (^{1}H). La comparaison des données spectrales obtenues à partir des spectres du proton à celles disponibles dans différentes bases de données répertoriées par l'*American Chemical Society* [http://scifinder.cas.org, accès en mai 2013], a permis de confirmer l'identité de chaque composé isolé. Les déplacements chimiques des trois molécules ont été rassemblés au sein d'un tableau commun selon la numérotation proposée sur la **Figure II:48** (**Tableau II:19**).



Acide 4-hydroxy-benzoïque **4-hydroxy-benzaldéhyde** **4-methoxyméthyl-phenol**

Figure II:48: Structures et numérotation des atomes de carbone des trois métabolites des feuilles d'*Acampe rigida*.

Tableau II:19: Données RMN ^{1}H (400 MHz) dans CD_3OD de métabolites isolés à partir d'*A. rigida.*

	4-hydroxy-benzaldehyde	**Acide 4-hydroxy-benzoïque**	**4-methoxymethyl-phenol**
Position	δ ^{1}H mult (ppm) (*J* Hz)	δ ^{1}H mult (ppm) (*J* Hz)	δ ^{1}H mult (ppm) (*J* Hz)
1	-	-	-
2	7,68 *d* (8,6)	7,87 *d* (8,8)	7,05 *d* (8,5)
3	6,82 *d* (8,6)	6,82 *d* (8,8)	6,65 *d* (8,5)
4	-	-	-
5	6,82 *d* (8,6)	6,82 *d* (8,8)	6,65 *d* (8,5)
6	7,68 *d* (8,6)	7,87 *d* (8,8)	7,05 *d* (8,5)
1' -CHO	9,67 *s*	-	-
1' -CH_{2-}	-	-	4,24 *s*
2' -O-CH_3	-	-	3,22 *s*

Ces composés phénoliques de faible poids moléculaire sont des métabolites secondaires ubiquitaires dans les plantes. L'origine biosynthétique de leur noyau aromatique provient de la voie de l'acide shikimique. Les acides benzoïques et leurs dérivés par exemple peuvent provenir directement de l'acide 3-déhydroshikimique (comme l'acide gallique par exemple) ou de l'acide chorismique (c'est le cas de l'acide salicylique), mais généralement ils sont issus d'une dégradation de la chaîne latérale des acides cinnamiques correspondants. Les acides phénols et les dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque sont très communs aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester, aldéhyde ou d'hétéroside [Bruneton J. 2009]. Le rôle physiologique de ces molécules est très mal connu. Ils sont présents par exemple en grande quantité dans les fruits et légumes et sont considérés comme des piégeurs de radicaux libres.

Dans la famille des Orchidacées, ils ont été répertoriés dans plusieurs genres tels que:

Vanilla [Zhang S. 2012]
Pleione [Liu X. 2011]
Gastrodia [Zhang W. 2011, Zhang W. 2010, Hayashi J. 2002]
Gymnadenia [Yue Z. 2010]
Cypripedium [Ju J. 2004]
Beclardia [Bhoyroo V. 2013]

En revanche, ils sont décrits pour la première fois ensemble dans le genre *Acampe*.

Leurs activités biologiques ont surtout été étudiées dans l'espèce *Gastrodia elata,* notamment concernant le 4-hydroxybenzaldéhyde. Ce métabolite a en effet montré des activités anti-inflammatoires, anti-nociceptives et aussi anti-angiogéniques dans des expérimentations aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* [Lim E-J. *et al.* 2008]. Son activité anti-inflammatoire a été démontrée également *in vitro* et s'explique par sa capacité d'inhibition des cyclooxygénases I et II (COX I et II) [Lee J.Y. *et al.* 2006]. Selon Park S. *et al.* (2011), le 4-hydroxybenzaldéhyde avec la vanilline sont responsables de l'activité de l'extrait aqueux de *Gastrodia elata* dans la diminution de la résistance à l'insuline, un des symptômes principaux des maladies métaboliques comme le diabète de type 2 ou la dyslipidémie. Ce composé participe aussi à l'activité anti-épileptique et anticonvulsivante d'une fraction éthérique de l'extrait méthanolique de *G. elata* en inhibant la GABA transaminase [Ha J-H. *et al.* 2000]. Les deux autres composés, l'acide 4-hydroxybenzoïque et le 4-méthoxyméthyl phénol ont également été identifiés dans *Gastrodia elata.* Tout comme l'ensemble des composés phénoliques de cette espèce, on leur attribue des propriétés anti-oxydante, anti-inflammatoire, impliquées dans l'activité antiasthmatique de *G. elata* [Simin N. *et al.* 2013 et Jang Y-W. *et al.* 2010]. Malgré leur faible poids moléculaire et leur simplicité structurale, il ne faut donc pas négliger le potentiel biologique de ces métabolites présents également dans *Acampe rigida*.

Leurs fonctions biologiques pour le végétal qui les biosynthétise sont très mal connues. Cependant, de part leur caractère volatil, ces composés participent probablement à l'odeur de la plante, comme c'est le cas par exemple de l'orchidée *Vanilla planifolia* [Zhang S. 2012]. Ils peuvent également être des précurseurs biosynthétiques d'autres métabolites secondaires, comme c'est le cas de la vanilline [Podstolski A. 2002] ou servir également à attirer des insectes pour que la plante soit pollinisée [Bhoyroo 2013]. Ces métabolites peuvent aussi être impliqués dans la défense de la plante en cas d'attaque bactérienne.

L'acide 4-hydroxybenzoïque présente en effet des activités anti-bactériennes voire bactéricides [Islam M. T. *et al.* 2013].

C. V. Purification des composés A, B, C et D de la fraction aqueuse de l'extrait méthanolique d'*A. rigida* par CPC

Afin de purifier les marqueurs potentiels des feuilles d'*Acampe rigida*, nous avons utilisé la chromatographie de partage centrifuge (CPC). Cette technique a été choisie pour ses deux principaux atouts ; sa haute capacité de charge et l'absence de perte d'échantillon due au manque de phénomène d'adsorption sur la phase stationnaire, car elle est liquide. Nous avons ainsi pu injecter plusieurs grammes de la fraction aqueuse de l'extrait méthanolique et enrichir les composés d'intérêt A, B, C et D dans deux fractions obtenues à l'issu de deux étapes de purification par cette technique.

Le manque de données bibliographiques sur l'espèce travaillée a rendu le choix du système de solvants difficile. A cette étape, nous avons ignoré la structure et la classe chimique de ces composés. Nous avons donc émis quelques hypothèses en se basant sur les résultats obtenus à partir de la fraction éthérique, contenant des dérivés phénoliques, et la composition des tiges, contenant des stilbénoïdes. Au départ, les dérivés phénoliques ont été extraits avec le méthanol, puis après l'extraction liquide/liquide, ils ont eu plus d'affinité avec le diéthyl éther. Pourtant, en analyse CLHP, leurs temps de rétention sont très proches des composés d'intérêt de la fraction aqueuse. Leur comportement similaire et leur affinité pour l'eau pourraient suggérer un noyau ou un acide phénolique lié à un ou plusieurs sucre(s). Compte tenu de la présence des stilbénoïdes dans les tiges, il pourrait également s'agir de leur forme glycosylée ou d'un autre polyphénol du même type. Nous avons donc cherché dans la littérature scientifique des systèmes de solvants appliqués aux produits naturels pour séparer ou purifier ces classes de composés. Quelques exemples sont répertoriés dans le **Tableau II:20**.

Comme nous pouvons le constater, les solvants le plus souvent utilisés pour ces classes chimiques sont l'acétate d'éthyle, le butanol, l'éthanol et l'eau dans différentes combinaisons et proportions. A partir de ces quatre solvants, nous avons testé quelques systèmes bi-phasiques et nous avons étendu nos essais aux systèmes de la famille ARIZONA, contenant l'hexane et le méthanol, en plus de l'eau et d'acétate d'éthyle. Mais les composés d'intérêt étant très polaires, l'utilisation de l'hexane ne convenait pas, car ce solvant rendait la solubilité de l'échantillon difficile et le partage était médiocre. Ce système a

donc été rapidement écarté et modifié en remplaçant le méthanol et l'hexane par le butanol. Ce solvant convenait par sa polarité, mais pas par sa sélectivité sur l'ensemble de l'extrait et les coefficients de partage n'étaient pas satisfaisants. Même si une séparation pouvait avoir lieu, ce système augmenterait considérablement la durée de l'analyse. Ce problème a été résolu en remplaçant le butanol par l'éthanol, ce qui a modifié la sélectivité du système et a permis de raccourcir la durée de l'élution.

Tableau II:20: Exemples des systèmes de solvants répertoriés dans la littérature scientifique [Ito Y. 2005].

Type de composés (source)	Système utilisé (proportions)	Références
Isoflavones (*Astragalus membranaceus*)	AcOEt-EtOH-*n*-butanol-eau (30/10/6/50 v/v) AcOEt-EtOH-eau (50/10/50 v/v)	[Ma X. 2003]
Isoflavones (germes de soja)	AcOEt-EtOH-eau (40/20/70 v/v) AcOEt-1-BuOH-Eau (20/10/30 v/v) n-hexane-AcOEt-1-BuOH-MeOH-acide acétique-eau (10/20/10/10/10/50 v/v)	[Shinomiya K. 2003]
Acteoside et 2'-acetylacteoside (*Cistanches salsa*)	AcOEt-*n*-BuOH-EtOH-eau (40/6/6/50 v/v)	[Lei L. 2001]
Dérivés p-nitrophenyl et sucres	1-BuOH/acide acétuque-eau (40/10/50 v/v) 1-BuOH-EtOH-eau (40/10/40 v/v)	[Shinomiya K. 1999]
Stilbène glucosides (*Polygonum multiflorum*)	AcOet-EtOH-eau (10/1/10 v/v) et (50/1/50 v/v)	[Cao X. 1998]

a. Analyse CPC de la fraction aqueuse de l'extrait méthanolique d'A. rigida (AcR310)

Différentes proportions d'un mélange ternaire constitué donc d'EtOH-eau-AcOEt ont été testées. Tous les composés se partageaient de façon quasi équivalente dans les deux phases avec les proportions du système 22,5/40/37,5 v/v/v, mais les coefficients de partage (Kd) étaient trop proches (distribués entre 0,5 et 1,8) et par conséquent, les composés risquaient d'être élués tous ensemble sans obtenir des fractions intéressantes. De plus, ce système se trouve presque tout en haut du diagramme ternaire (**Figure II:41**). Avec seulement 30% de rétention à l'équilibre, il risquait donc être trop instable et on pourrait

perdre beaucoup de phase stationnaire en plus pendant l'élution. Dans un premier temps, les proportions choisies pour éluer la fraction aqueuse ont donc été fixées à 18/40/42 v/v/v.

L'analyse par CPC de la fraction aqueuse de l'extrait méthanolique des feuilles d'**AcR2310** nous a permis d'obtenir 10 regroupements en fonction de leurs profils CLHP. Deux de ces fractions ont été enrichies en composés **A** et **B** (Fraction 5) et **C** et **D** (Fraction 8) (**Figure II:49**). Les rendements massiques (injection de 7 g d'échantillon en quatre fois) sont résumés dans le **Tableau II:21**. Le volume de la phase stationnaire à l'équilibre était de 194 mL (68,1% de rétention, volume réel de la colonne étant de 285 mL) avec une pression de 27 bars.

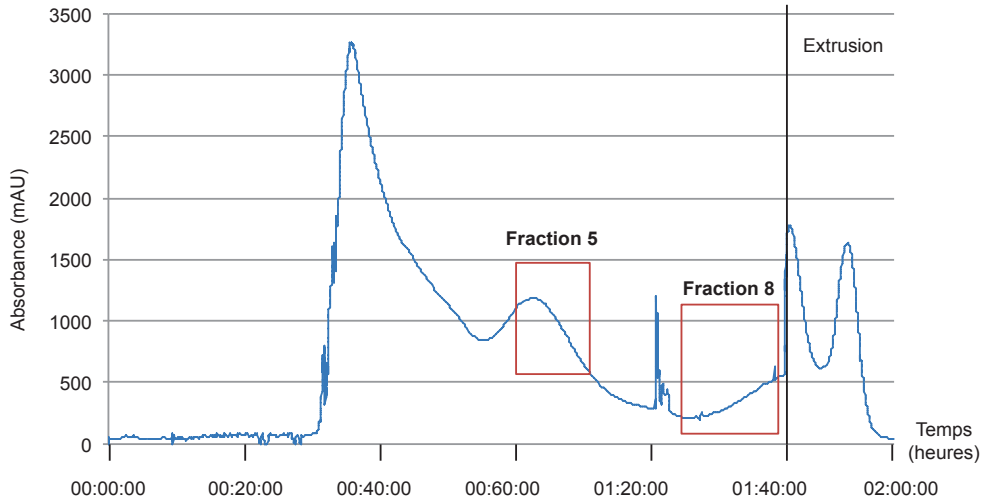


Figure II:49. Chromatogramme CPC de la fraction aqueuse de l'extrait méthanolique d'AcR2310 (détection DAD scan de 220 à 280 nm). Mode d'élution ASC en isocratique (phase supérieure=phase mobile), extrusion après 1h40min d'élution. Fractions regroupées les plus intéressantes sont la Fraction 5 (contenant les composés **C** et **D**) et la Fraction 8 (contenant les composés **A** et **B**).

Tableau II: 21. Rendements massiques des regroupements CPC de la fraction aqueuse de l'extrait méthanolique d'AcR2310.

Regroupements	Masse récupérée	Rendement massique (m/m)
Fraction 1	53,90 mg	0,8 %
Fraction 2	1,69 g	24,1 %
Fraction 3	1,36 g	19,4 %
Fraction 4	114,90 mg	1,6 %
Fraction 5	**271,30 mg**	**3,9 %**
Fraction 6	149,60 mg	2,1 %
Fraction 7	40,50 mg	0,6 %
Fraction 8	**275,50 mg**	**3,9 %**
Fraction 9	364,60mg	5,2 %
Fraction 10	2,69 g	38,4 %

b. Obtention de la Fraction AB et Fraction CD

Les **fractions 5** et **8** contiennent majoritairement les composés **C**, **D** et **A**, **B**, respectivement. Dans la poursuite de la purification, nous avons cherché un système de solvants adéquat pour essayer de les séparer et éliminer leurs impuretés proches.

Des tests de partage ont été réalisés dans différents systèmes de solvant, mais le principal problème était de trouver un mélange adéquat et assez sélectif, vu leur comportement similaire et leur Kd très proches dans pratiquement tous les systèmes testés, (répertoriés dans le **Tableau II:22**). Finalement, nous avons décidé d'injecter les deux échantillons avec un mélange bi-phasique contenant AcOEt-BuOH-Eau avec les proportions **4/1/5** v/v/v pour la **Fraction 5** et **3/2/5** v/v/v pour la **Fraction 8**.

Les Kd ont été mesurés en mode ascendant (phase supérieure=phase mobile) selon la formule Kd= [A] stat / [A] mob, où [A] est la concentration du soluté (exprimée en aire du pic mesuré par CLHP) dans la phase stationnaire divisée par celle dans la phase mobile. Les composés seront élués dans l'ordre croissant des Kd. Afin de prédire si certains risquent de co-éluer, un coefficient de résolution **(α)** est calculé comme rapport entre les Kd les plus proches (α = Kd1 / Kd2, où Kd2>Kd1). Pour avoir une séparation optimale, **α** doit être supérieur à 1,5 [Ito Y. 2005].

Tableau II:22: Tableau récapitulatif des systèmes de solvants testés pour purifier les composés A, B, C et D des Fractions 5 et 8.

Système solvant	Proportions v/v/v
BuOH-eau	1/1
AcOEt-BuOH-eau	1/4/5
AcOEt-BuOH-eau	2/3/5
AcOEt-BuOH-eau	3/2/5
AcOEt-BuOH-eau	4/1/5
AcOEt-BuOH-eau	9/1/10
AcOEt- eau	1/1



Polarité

Selon les résultats calculés pour les deux fractions (**Figure II:50 et II:51** et **Tableau II:23** et **II:24**), nous pouvons constater qu'avec les Kd proches des composés d'intérêt, nous n'arriverons probablement pas à les séparer. Nous avons tout de même décidé de les injecter avec les systèmes choisis afin d'essayer d'éliminer au maximum leurs impuretés

proches et observer un éventuel début de séparation, entre les composés **A** et **B**, et les composés **C** et **D** peut avoir lieu malgré tout.

Le volume de la phase stationnaire à l'équilibre était de 196 mL pour le système 3/2/5 (68,8% de rétention) et de 206 mL pour le système 4/1/5 (72,3% de rétention) avec une pression d'environ 50 bars dans les deux cas. Les chromatogrammes correspondant à ces deux essais sont représentés sur la **Figure II:51**. Nous avons injecté la totalité des deux fractions, à savoir 271 mg de F5 et 275 mg de F8.

Comme prédit, nous n'avons réussi à séparer ni le composé **A** de **B**, ni **C** de **D**. Cependant, nous avons analysé toutes les fractions obtenues par CLHP et nous avons réalisé des regroupements de façon à ce qu'ils ne contiennent que le minimum d'impuretés proches. Nous avons ainsi obtenu deux échantillons que nous avons appelé **Fraction AB** (30 mg) et **Fraction CD** (99,8 mg), enrichies en composés d'intérêt **A** et **B**, **C** et **D**, respectivement.

c. Bilan du fractionnement par CPC

La première étape de fractionnement par CPC a permis d'obtenir des fractions déjà enrichies en composés d'intérêt. Nous avons essayé de les purifier par une deuxième élution par CPC afin de les séparer les uns des autres, ce qui n'a pas donné des résultats satisfaisants. Les molécules **A**, **B**, **C** et **D** sont probablement des isomères très proches et il est difficile de trouver un système de solvants adéquats pour les séparer (surtout quand nous ignorons leurs structures exactes pour le moment). Ainsi, cette technique apporte un atout majeur, la haute capacité de charge, mais reste complémentaire à d'autres techniques chromatographiques existantes dans le domaine des produits naturels.

Compte tenu des rendements faibles de cette deuxième purification, nous avons décidé de procéder à l'analyse des composés **A**, **B**, **C** et **D** par le couplage HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN. Cette démarche devra nous permettre d'obtenir les structures des molécules d'intérêt à partir d'une quantité minimale d'échantillon.

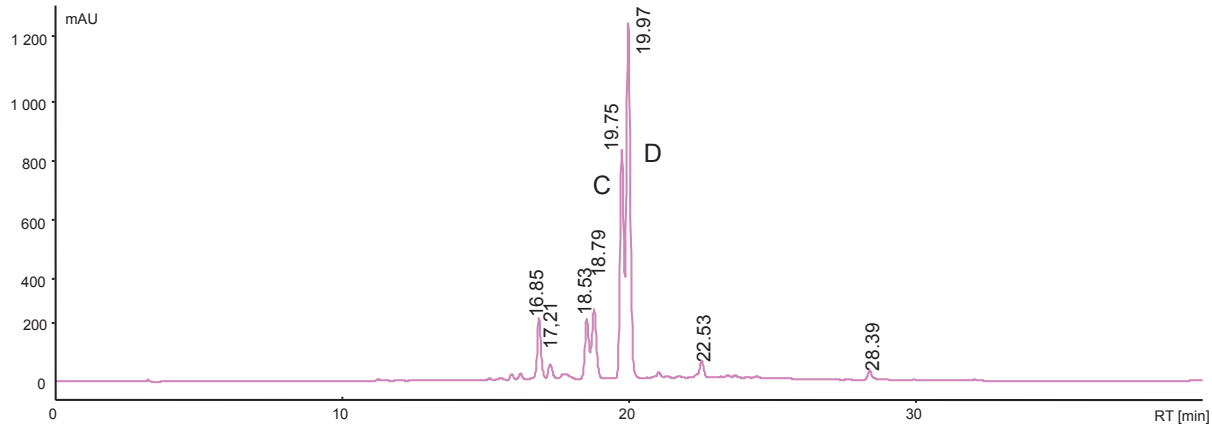


Figure II:50: Chromatogramme CLHP à 260 nm de la Fraction 5 Phase stationnaire : Nucleodur C18 250 x 4,6 mm i.d. 5 µm. Phase mobile eau+0,1%A.F. (A) et MeOH +0,1% A.F. (B) Gradient d'élution (temps : %B) : 0 min, 2% ; 30-35 min, 100% ; 38 min, 2%.

Tableau II:23: Les coefficients de partage des différents composés contenus dans la fraction 5. Système AcOEt-BuOH-eau 4/1/5 (v/v/v), mode ascendant et la prédiction de leur ordre d'élution. Le coefficient de résolution permet de prédire l'éventuelle co-élution des pics voisins.

Temps de rétention (T_R) (min)	Coefficient de partage (Kd) (ASC) Système solvant AcOEt-BuOH-eau 4/1/5 v/v	Ordre d'élution	Ordre d'élution	Kd (T_{RA}) / Kd (T_{RB})	Coefficient de résolution (α)
16,85	2,64	7	1	1,24/0,61	2,0
17,21	3,22	8	2	1,41/1,24	1,14
18,53	2,31	6	3	1,57/1,41	1,11
18,79	2,23	5	4	2,23/1,57	1,42
19,75 (C)	1,57	4	5	2,31/2,23	1,04
19,97 (D)	1,41	3	6	2,64/2,23	1,18
22,53	1,24	2	7	3,22/2,64	1,22
28,39	0,61	1			

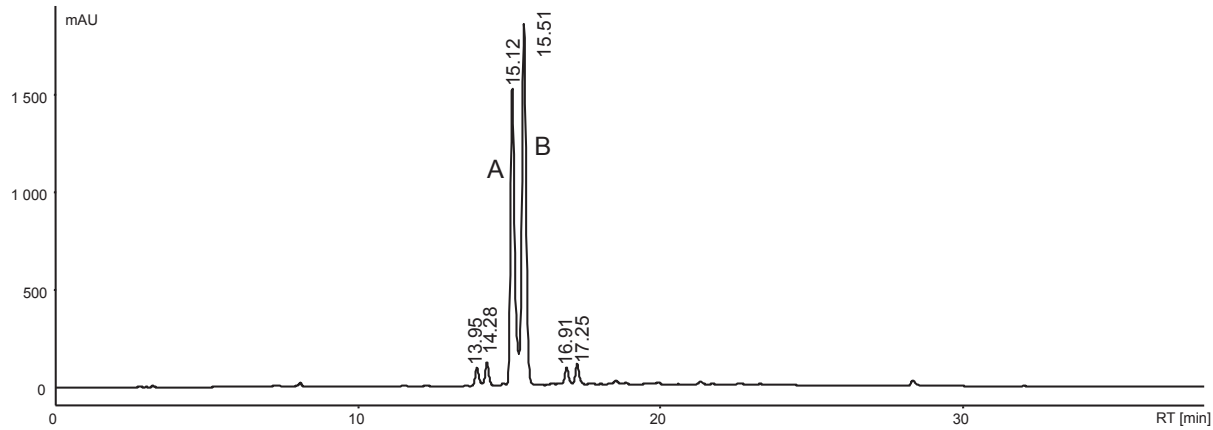


Figure II:51: Chromatogramme CLHP à 260 nm de la Fraction 8 Phase stationnaire : Nucleodur C18 250 x 4,6 mm i.d. 5 µm. Phase mobile eau+0,1%A.F. (A) et MeOH +0,1% A.F. (B) Gradient d'élution (temps : %B) : 0 min, 2% ; 30-35 min, 100% ; 38 min, 2%.

Tableau II:24: Les coefficients de partage des différents composés contenus dans la fraction 8. Système AcOEt-BuOH-eau 3/2/5 (v/v/v), mode ascendant et la prédiction de leur ordre d'élution. Le coefficient de résolution permet de prédire l'éventuelle co-élution des pics voisins.

Temps de rétention (T_R) (min)	Coefficient de partage (Kd) (ASC) Système solvant AcOEt-BuOH-eau 3/2/5 v/v	Ordre d'élution	Ordre d'élution	Kd (T_{RA}) / Kd (T_{RB})	Coefficient de résolution (α)
13,95	3,31	5	1	1,23/1,13	1,09
14,28	3,36	6	2	1,74/1,23	1,41
15,12	1,76	4	3	1,76/1,74	1,01
15,51	1,74	3	4	3,31/1,76	1,88
16,91	1,23	2	5	3,36/3,31	1,02
17,25	1,13	1			

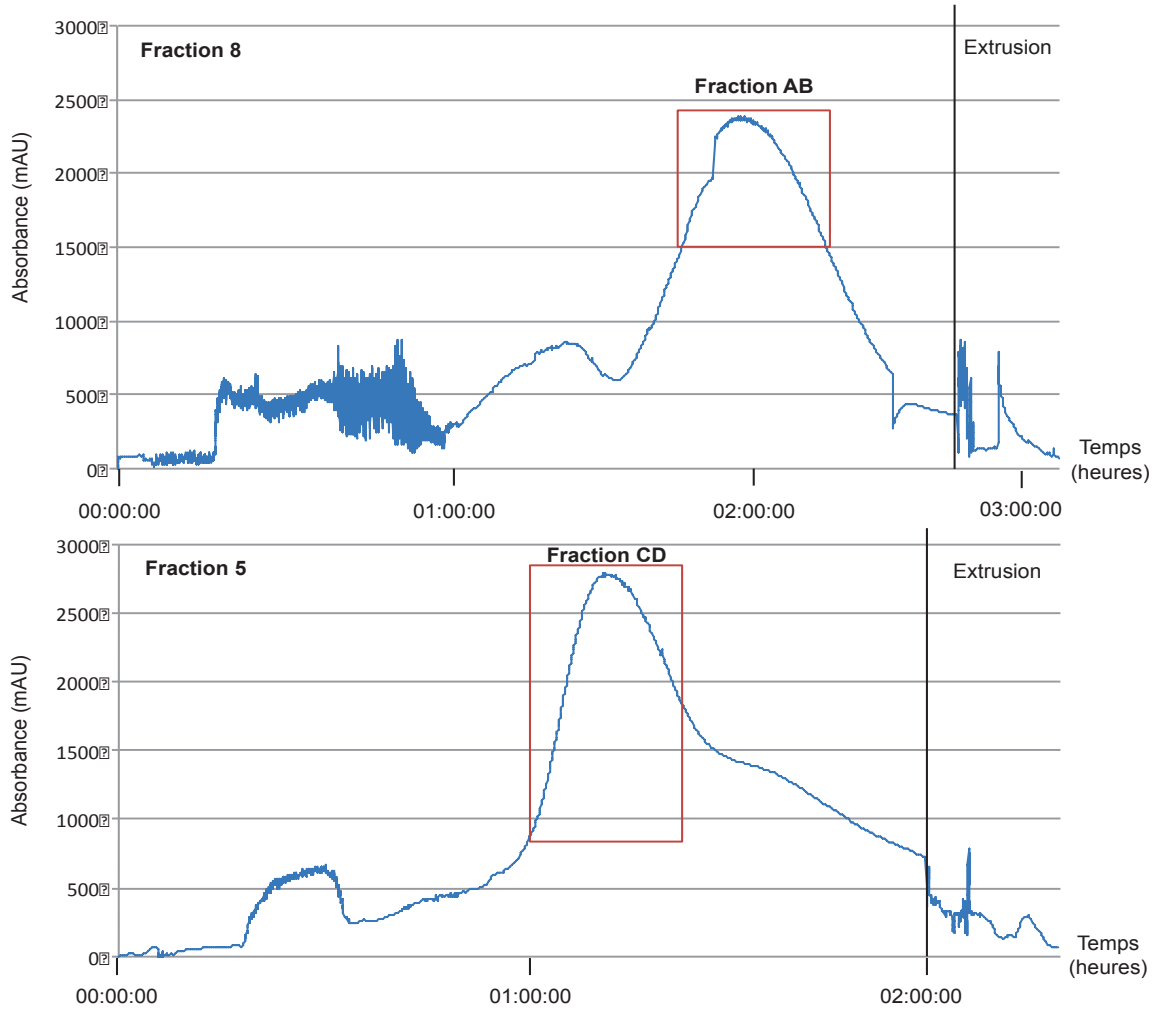


Figure II:52: Chromatogrammes CPC des la fractions 5 (bas) et 8 (haut) (détection DAD scan de 220 à 280 nm). Mode d'élution ASC en isocratique (phase supérieure=phase mobile), extrusion après 2h (F5) et 2h45min (F8) d'élution. Les regroupements sont appelés **Fraction AB** et **Fraction CD** contenant les composés d'intérêt avec le minimum d'impuretés voisines. Système solvant: AcOEt-BuOH-eau 4/1/5 v/v/v (F5) et 3/2/5 v/v/v (F8).

C. VI. Analyse des composés A, B, C et D par HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN

Les résultats présentés ici ne sont que des essais préliminaires que nous avons réalisés sur les deux fractions AB et CD. En effet, nous n'avons pas encore élucidé complètement la structure des quatre composés d'intérêt et nous ne pourrons émettre que des hypothèses. Les différentes étapes de nos expérimentations pourront cependant être discutées ici. A ce jour, nous ne disposons pas de données spectrales suffisantes, l'élucidation structurale des composés **A**, **B** et **D** ne sera donc pas discutée dans ce chapitre. Seule une hypothèse de structure du composé **C** sera proposée en illustrant des données expérimentales disponibles.

a. CLHP-DAD

La séparation des deux fractions a été effectuée sur une colonne ProntoSil C18 125 x 4 mm avec la porosité de 5 µm (Bischoff Chromatography) qui a été fournie par défaut lors de l'installation du couplage HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN à la Faculté. Cette colonne n'est en effet pas parfaitement adaptée pour un couplage avec la spectrométrie de masse, mais constitue un bon compromis entre la séparation de l'échantillon, la durée de l'analyse et la capacité de charge. Cependant, afin de maintenir une bonne résolution entre les pics correspondant aux composés d'intérêt, dont le temps de rétention est extrêmement proche, le volume d'injection n'a pas pu être supérieur à 5 µL. Ce qui a augmenté le nombre d'injections répétées pour concentrer et piéger chaque composé sur les cartouches SPE. Nous n'avons pas fait d'autres essais pour le moment, mais afin d'augmenter le volume d'injection et maintenir une bonne séparation dans un temps d'analyse court, les essais de différentes colonnes chromatographiques, comme la Sunfire (Waters) utilisée dans l'étude précédente, ont été planifiés. Le chromatogramme obtenu suite à l'analyse de la **Fraction CD** contenant le composé **C** est représenté sur la **Figure II:53**.

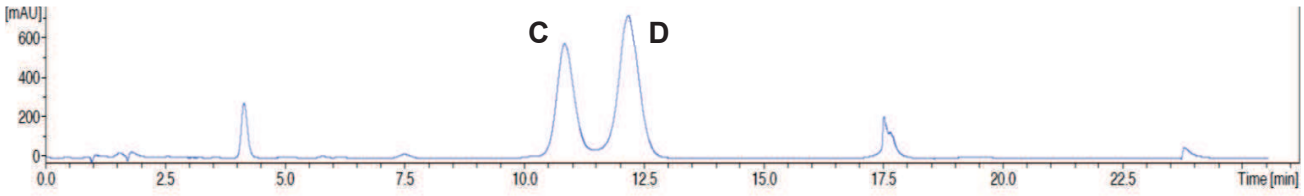


Figure II:53: Chromatogramme CLHP à 254 nm de la Fraction CD. Phase stationnaire : ProntoSil C18 125 x 4 mm i.d. 5 µm. Phase mobile eau+0,05 %A.F. (A) et ACN +0,05% A.F. (B) Gradient d'élution (temps : %B) : 0 min : 20% ; 10-15 min : 17% ; 18-23 min : 100%.

Cette analyse nous a également permis d'obtenir le spectre UV du composé **C.** Il présente deux maxima d'absorbance à λ_{max}^{ACN/H_2O}220 et 280 nm (**Figure II:54**). Son allure ainsi

que ses maxima sont similaires à l'allure du spectre UV de l'acide cinnamique, suggérant la présence de cette unité structurale dans le composé **C** [Patil D. *et al*. 2011].

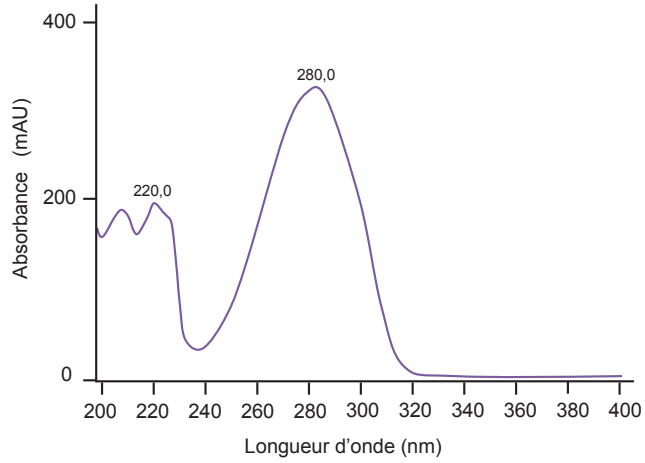


Figure II:54: Spectre UV du composé C. Spectre obtenu à partir du détecteur DAD après la séparation chromatographique par CLHP du système couplé.

b. Spectrométrie de masse

5% de l'échantillon ont été analysés pour obtenir la masse de chaque pic issu de la séparation chromatographique grâce à un système de "split" (cf Figure I:21, page 58). L'analyseur de masse est de type trappe à ion et l'acquisition des spectres de masse s'est faite en mode positif. Cette analyse a permis d'obtenir la masse du composé **C:** $[M+H]^+$ *m/z* = 497,0 (**Figure II:55**).

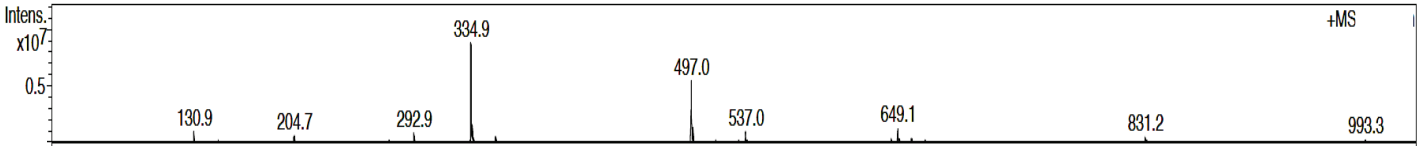


Figure II:55: Spectre de masse du composé C. Acquisition en mode positif. Ion pseudomoléculaire est à $[M+H]^+$ *m/z* = 497,0. Le pic à 537,0 correspond à l'ion $[M+Na]^+$ *m/z.*

Après l'acquisition des spectres RMN, tous les produits sont collectés dans des tubes de 1,5 mL (Eppendorf). Ainsi, nous avons pu effectuer en parallèle une analyse HPLC-ESI-HRMS afin d'obtenir la formule brute du composé **C**. Celle-ci a été calculée comme étant $C_{23}H_{28}O_{12}$ (err. -2,26 ppm) pour une masse exacte de $[M+H]^+$ *m/z* = 497,1665.

c. SPE-UV

Pour maintenir la résolution et la bonne séparation chromatographique, le volume maximal d'injection a été de 5 µL. Au delà, les composés **C** et **D** commencent à co-éluer. Pour obtenir des quantités suffisantes de l'analyte, une multi-injection a été nécessaire. Chaque composé a été piégé 12 fois sur une même cartouche SPE. Le choix de la phase stationnaire s'est porté sur des cartouches HLB (hydrophilic-lipophilic-balanced) de taille de 10 x 1 mm. Une pompe additionnelle "make-up" est placée en sortie de colonne CLHP et rajoute continuellement de l'eau avec un débit 3 fois supérieur par rapport au débit d'élution chromatographique. Cette dilution de l'échantillon avant son arrivée sur les cartouches SPE permet de limiter ainsi son relargage prématuré et d'augmenter sa concentration. Cette étape est surveillée par un détecteur UV supplémentaire à la sortie des cartouches SPE. L'absence du signal confirme une bonne rétention de l'analyte.

Après un piégeage réussi du composé **C,** il a été élué avec 220 µL d'acétonitrile deutéré (CD3CN) vers une sonde LC-SEI (Bruker) d'un volume actif de 30 µL (volume total 60 µL) et analysé sur un spectromètre 500 MHz afin d'obtenir des spectres mono- et bidimensionnels.

d. RMN

A ce stade, seule l'acquisition d'un spectre du proton a donné des résultats satisfaisants. Le volume actif de la sonde utilisée étant important par rapport à la quantité du produit élué, le produit **C** a été trop dilué et l'acquisition des spectres bidimensionnels a donc été insuffisante. Pour cette raison, nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses sur sa structure à partir de l'ensemble des données obtenues.

Sur le spectre ^{1}H, la présence d'une fonction osidique est définie par un ensemble de protons dont les déplacements chimiques sont visibles entre 3 et 4 ppm (**Figure II:56**). Le proton anomérique présente un déplacement chimique entre 4 et 5 ppm, sous forme de doublet dont la constante de couplage détermine la position α ou β du sucre (ici J = 8 Hz donc anomère β). Sur ce même spectre, on observe un motif caractéristique d'une structure de type acide cinnamique, à savoir:

- la présence de deux protons vinyliques à δ 6,65 ppm (1H, d, J = 16 Hz, H-2) et à δ 7,72 ppm (1H, d, J = 16 Hz, H-2). La constante de couplage obtenue indique que ces protons sont en position *trans*.

- la présence additionnelle de 3 protons aromatiques équivalents formant un signal à δ 7,43 ppm (3H, br s, H-6/7/8) et de deux protons aromatiques à δ 7,66 ppm (2H, br s, H-5/9).

Ce constat est en cohérence avec le spectre UV du composé **C** obtenu. Les autres signaux sont pour le moment non attribués. Pour élucider complètement la structure du composé **C**, le déplacement chimique du carbone sera nécessaire pour résoudre le squelette carboné et déterminer ainsi avec certitude la nature de la structure osidique présente. Les spectres bidimensionnels, tels que NOESY, HMBC et HSQC seront indispensables pour déterminer l'emplacement de l'acide cinnamique sur la structure globale. Nous n'avons pas obtenu ces spectres avec la sonde RMN employée. Compte tenu des quantités limitées des métabolites à identifier, afin d'obtenir les informations nécessaires pour établir avec certitude la structure des quatre métabolites présents dans les feuilles d'*Acampe rigida,* nous allons effectuer les mesures avec la sonde capNMR (Protasis) avec un volume actif de 5 µL. Grâce à cet outil, nous pourrons gagner en sensibilité de nos analyses.

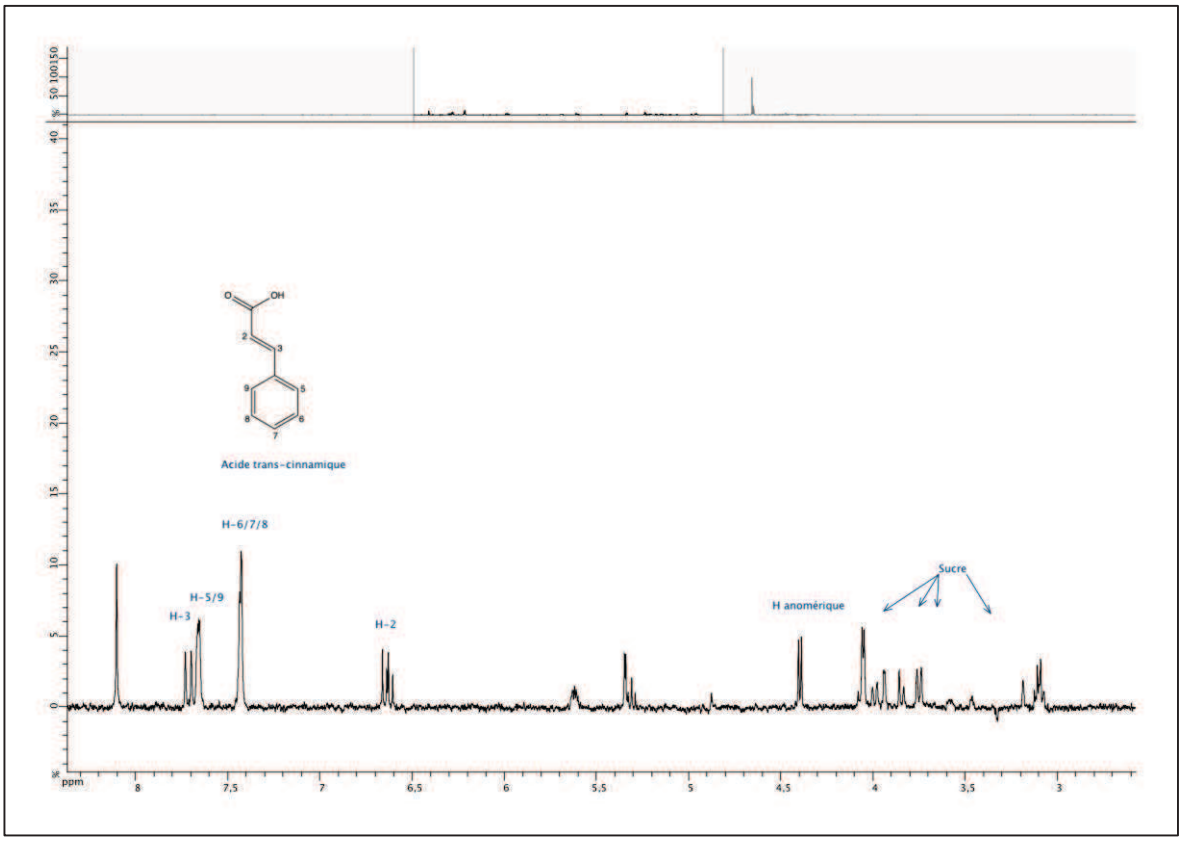


Figure II:56: Spectre ^{1}H du composé C (CD_3CN, 500 MHz).

C. VII. Bilan

Grâce à l'ensemble des techniques innovantes utilisées dans l'exploration de cette espèce, nous pouvons constater une différence de composition entre les tiges et les feuilles d'une même espèce. Les tiges d'*Acampe rigida* contiennent quatre stilbénoïdes communs à *Vanda* coerulea, à savoir la **flavidine**, la **coelonine**, l'**imbricatine** et le **gigantol**. La poursuite de nos travaux sur les feuilles a été privilégiée aux tiges, car il est fortement probable que d'autres dérivés phénanthréniques soient retrouvés. En effet, le profil chromatographique de l'extrait de feuilles est différent de celui des tiges et des racines. En utilisant des techniques phytochimiques classiques, telles que l'extraction liquide/liquide et la CLHP semi-préparative, nous avons identifié trois composés phénoliques, à savoir l'**acide 4-hydroxybenzoïque**, le **4-hydroxy-benzaldéhyde** et le **4-méthoxyméthyl-phénol**. Certes, ces métabolites primaires, probablement précurseurs de métabolites secondaires, ne sont pas pour autant inintéressants en raison de leurs activités biologiques répertoriées dans la littérature. L'ensemble des composés que nous avons mis en évidence dans les tiges et les feuilles *d'Acampe rigida* sont présentés sur la **Figure II:57**.

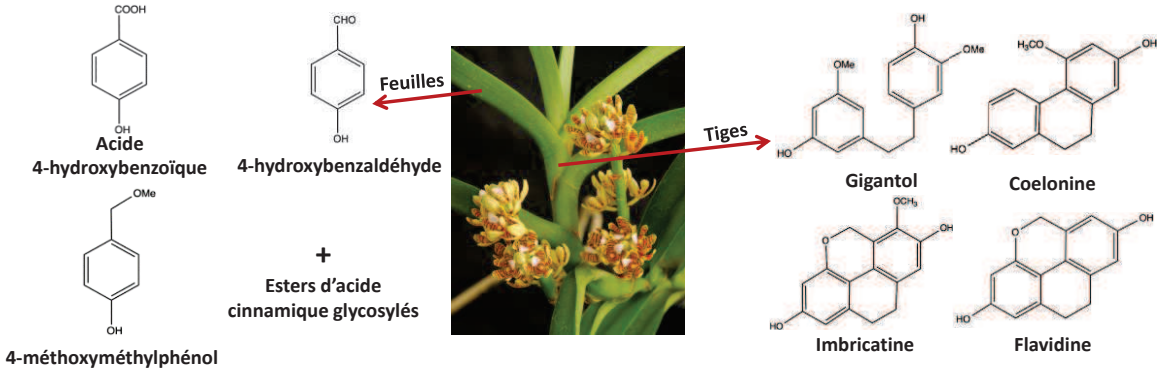


Figure II:57: Les métabolites mis en évidence dans les tiges et les feuilles d'*Acampe rigida*.
Photo source: http://www.rv-orchidworks.com

Aucun stilbénoïde, ni vandatéroside n'a été détecté par la méthode de déréplication dans les feuilles d'*Acampe rigida*. Nous avons donc voulu explorer cet organe pour augmenter nos chances d'identifier des structures originales. Notre stratégie de purification par CPC et l'analyse par le couplage HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN nous a permis d'obtenir uniquement des hypothèses de structures des quatre métabolites d'intérêt, **A**, **B**, **C** et **D**. Il s'agit probablement d'esters d'acide cinnamique glycosylés, peu communs dans les Orchidacées. Il serait donc intéressant de poursuivre ce travail afin d'élucider leurs structures exactes, car ils peuvent être des marqueurs spécifiques de cette espèce.

Chapitre III
Partie I: Purification de marqueurs de *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. par chromatographie de partage centrifuge (CPC)

A. Introduction

Contrairement à *Aerides rosea* et *Acampe rigida* qui n'avaient pas fait l'objet d'exploration phytochimique antérieure mais qui ont fait l'objet de nos travaux de doctorat (cf chapitre II), les études phytochimiques et biologiques de *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. avaient déjà été réalisées dans notre laboratoire d'accueil. Ses racines, ses tiges et ses feuilles renferment en effet des composés nouvellement décrits, issus de l'estérification de la gastrodine et de l'acide eucomique suivi d'une glycosylation. Ces composés, dénommés **vandatérosides I** à **III**, présentent la capacité de stimuler les activités enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale (deshydrogènases et cytochrome C oxydase) et d'induire l'expression de protéines de différenciation sur kératinocytes (HaCaT) et peuvent donc être impliqués dans la prévention du vieillissement cutané démontrée pour un extrait standard de tiges de *V. teres*. Leur structure nouvellement décrite ainsi que leurs fonctions biologiques ont donné lieu à une publication de l'équipe dans *Journal of Natural Products* [Simmler C. *et al.,* 2011].

Depuis, aucun autre travail concernant cette espèce n'a été publié. Notre objectif a été de poursuivre les travaux de doctorat de Charlotte Simmler et d'isoler plusieurs centaines de milligrammes de ces marqueurs phytochimiques. A la fois dans le but de disposer de traceurs pour faciliter le contrôle de qualité de différents lots de matières premières, et aussi pour nous permettre d'élargir les tests biologiques et ainsi peut-être découvrir de nouvelles fonctions / applications de ces molécules naturelles.

A. I. Caractéristiques et distribution géographique

V. teres (Roxb.) Lindl. est une espèce majoritairement, mais pas exclusivement, épiphyte. Originaire d'Asie tropicale, sa distribution géographique s'étend du Népal à la Thaïlande, mais également au Laos et dans la région Assam en Inde. Son biotope naturel est constitué de régions chaudes tropicales, situées entre 200 et 900 mètres d'altitude. C'est une espèce dite héliophile ayant un grand besoin de lumière, qui croit généralement en plein soleil, dont l'intensité conditionnera une bonne floraison. Elle se développe de préférence sur des arbres en zones tropicales. En culture, qui s'avère généralement difficile, le support naturel de type tronc d'arbre est remplacé par des paniers suspendus et des copeaux de bois, arrangés en haies exposées toute la journée au soleil direct. En été, les températures idéales de jour atteignent 35°C, mais cette espèce a besoin d'humidité quotidienne. Sa

période de floraison a lieu autour du mois d'août. [Nanakorn W. *et al.* 2008, www.univers-orchidées.org].

A. II. Classification et description botanique

L'espèce est de grande taille, sa tige peut atteindre 4 m de haut. Ses tiges sont ligneuses, d'environ 2 cm de diamètre. Ses feuilles sont persistantes, de formes cylindriques, charnues et pointues, particulièrement bien adaptées à la chaleur et à l'ensoleillement. Elles ont un aspect succulent de façon à ce que l'échauffement par unité de surface soit le plus faible possible. La dimension maximale des feuilles est de 15 cm de longueur et 0,5 cm de largeur. Afin d'économiser ses dépenses énergétiques, cette espèce n'émet qu'un nombre restreint de feuilles. On peut compter maximum 50 feuilles par pousse de *V. teres*. La période de floraison dure environ un mois et les fleurs, avec un motif de dégradés de couleur blanc orange et rose crème (**Figure III:1**), peuvent être odorantes [Lecoufle M., 2004 ; www.orchidspecies.com].



Figure III:1: *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. 1: source Edwards's botanical register, vol. 21, planche 1809 (http://eol.org, accès en juillet 2013) ; 2 : http://www.orchidspecies.com, accès en juillet 2013.

La taxonomie de *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. est décrite ci-dessous selon la classification APG III (2009) [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy ; http://www.tropicos.org]

Règne : Plantae (Plantes)
Sous-règne : Tracheobionta (Plantes vasculaires)
Super-division : Spermatophyta (Plantes à graines)
Division : Magnoliophyta (Plantes à fleurs)
Classe : Monocotylédones
Ordre : Asparagales
Famille : Orchidaceae
Sous- famille : Epidendroideae
Tribu : Vandae
Sous tribu : Aeridinae
Genre : *Vanda* Jones ex. R. Br. (1795)
Espèce : *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. (1833)

Synonyme : Papilionanthe teres (Roxb.) Schltr. (1915)

A. III. Données phytochimiques

La composition chimique de cette orchidée a été étudiée par Charlotte Simmler pendant ses travaux de thèse. Trois métabolites spécifiques de *Vanda teres* ont été isolés à partir d'un extrait méthanolique des tiges, bien qu'ils soient également présents dans les feuilles et les racines. Il s'agit de dérivés **β-D-glucopyranosyloxybenzyl-2-*p*-hydroxybenzyl-malate**. Ces composés nouvellement décrits ont été dénommés **vandatérosides I** à **III (VT I** à **VT III)** (**Figure III:2**).

D'autres métabolites non spécifiques de *V. teres*, communs à d'autres orchidées, ont également été identifiés dans un extrait standard de tiges (EtOH/eau 90/10 v/v à reflux), tels que la gastrodine (*p*-glucopyranosyloxybenzyle) ainsi que l'acide eucomique (acide 2-*p*-hydroxybenzyl malique). Enfin, cette espèce contient également des flavonoïdes, tels que la lutéoline-4'-*O*-glucoside ou des traces de lutéoline-7-*O*-glucoside, des traces de gigantol (bibenzyle) ou encore du β-sitostérol.

Notre étude porte un intérêt particulier aux métabolites majoritaires, les trois vandatérosides spécifiques de *Vanda teres*, ainsi qu'à l'acide eucomique. Ces quatre composés sont impliqués dans l'activité biologique de cette espèce et ont été qualifiés de bio-marqueurs de cette espèce.

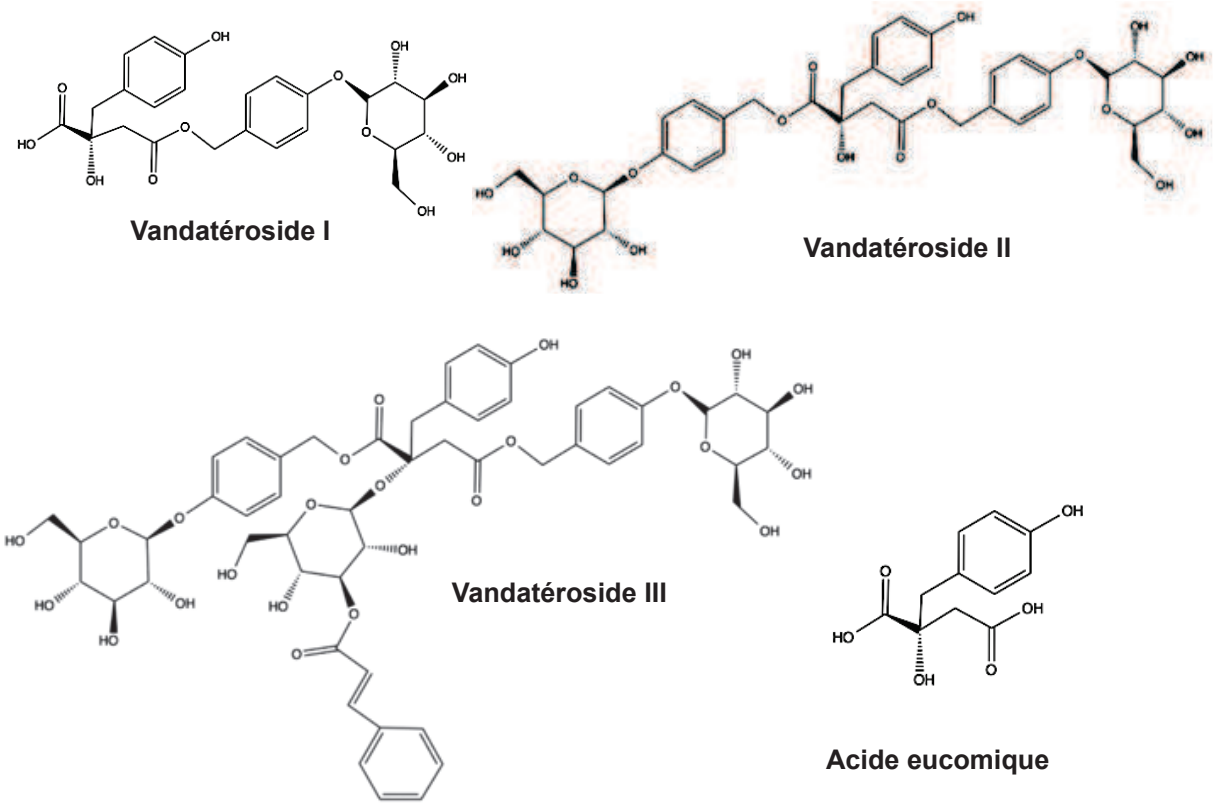


Figure III:2: Structure des bio marqueurs de *Vanda teres*.

A. IV. Données biologiques

L'extrait standard de tiges de *Vanda teres* a fait l'objet d'un dépôt de brevet pour ses applications cosmétiques, intitulé « *Cosmetic or dermatological composition containing an extract of orchis Vanda teres* » (numéros d'identification : FR 2924348, WO 2009071855). Dans ce brevet, il est précisé que l'extrait hydro-alcoolique de tiges de *V. teres* présente des « propriétés de prévention ou de ralentissement de l'apparition des signes du vieillissement cutané associés à de remarquables propriétés anti-inflammatoires ».

En raison de leur haut poids moléculaire, il est peu probable que les vandatérosides parviennent à traverser la couche épidermique pour pénétrer dans la matrice dermique. Les effets biologiques ont donc été évalués uniquement sur un modèle cellulaire utilisant des kératinocytes. En se basant sur des activités biologiques répertoriées dans la littérature scientifique et concernant des composés aux structures similaires, les recherches de Charlotte Simmler ont été orientées vers la dysfonction mitochondriale. Il s'avère que cette dysfonction joue un rôle prépondérant dans l'expression du vieillissement au cours duquel

est observé une baisse des fonctions mitochondriales, responsable d'une baisse du métabolisme énergétique cellulaire. Dans la mesure où l'acide eucomique partage un noyau structural commun aux trois vandatérosides, son activité a également été évaluée. De plus, ce dérivé 2-hydroxybenzyle de l'acide malique est défini comme un α-hydroxy acide (AHA). Ce type de composés est couramment employé dans les produits de soin anti-âge afin d'estomper les rides de surface souvent provoqués par une déshydratation cutanée. L'évaluation biologique de ces quatre métabolites a donc consisté à rechercher un effet stimulant de l'activité mitochondriale ainsi qu'à mettre en évidence un impact sur le renouvellement cutané.

Dans un premier temps, les effets des vandatérosides et de l'acide eucomique ont été analysés sur deux composantes de la chaîne respiratoire mitochondriale. D'une part, la mesure de l'activité des déshydrogénases mitochondriales des complexes I et II de la chaîne respiratoire, et d'autre part l'activité enzymatique de la cytochrome C oxydase associée au complexe IV. Toutes les mesures ont été menées sur une lignée de kératinocytes humains (HaCaT). Les résultats obtenus montrent que le vandatéroside II présente le meilleur pouvoir stimulant à la fois des déshydrogénases mitochondriales et de la cytochrome C oxydase. L'acide eucomique a démontré une activité comparable à celle du vandatéroside II. Les vandatérosides I et III activent faiblement les déshydrogénases mitochondriales, mais ne stimulent pas le fonctionnement de la cytochrome C oxydase.

Dans un deuxième temps, une stimulation de la différenciation des kératinocytes a été mesurée par immuno-marquage de l'expression de protéines caractéristiques : la desmogléine I, l'involucrine et la transglutaminase I. Une augmentation du nombre de protéines immuno-marquées au sein de la lignée de kératinocytes reflète une stimulation de la différenciation de ces kératinocytes. Les vandatérosides I et II induisent l'expression de ces trois protéines de différenciation au sein des kératinocytes. Ils favorisent donc le renouvellement de l'épiderme.

A. V. Stratégie adoptée

Pour pouvoir élargir les recherches sur les activités des marqueurs phytochimiques de *Vanda teres* en explorant d'autres cibles, nous avons eu comme objectif de les isoler en grande quantité à l'aide d'une technique préparative adaptée à l'isolement de substances naturelles à partir d'un extrait de composition complexe.

En effet, la chromatographie de partage centrifuge (CPC) est une technique en plein essor ces dernières décennies dans le domaine de purification de substances naturelles [Foucault A. P. *et al.* 2008]. Les méthodes développées peuvent être facilement transposables à une échelle industrielle, étant donné sa haute capacité de charge ainsi que le faible coût si l'on utilise des solvants de qualité technique. Son principe et fonctionnement ont été expliqués dans le chapitre "Introduction" (cf pages 55-59). La CPC est donc particulièrement adaptée à l'isolement de quantités importantes de fractions enrichies ou de composés purs, comparée à d'autres techniques de chromatographie préparative, telles que la CLHP.

Nous sommes partis d'un extrait hydro-alcoolique (EtOH-eau 90/10 à reflux) de tiges de *V. teres* qui renferme à la fois des composés polaires (sucres) et des composés apolaires (acides gras, phytostérols, pigments). En raison du manque de données répertoriées dans la littérature scientifique concernant le choix d'un mélange de solvants adapté aux dérivés hydroxybenzyle malates recherchés, nous avons orienté notre démarche vers un système universel, adapté à la plupart des substances naturelles. Ce mélange quaternaire, dénommé ARIZONA, a été pour la première fois décrit par Rodolphe Margraff et est considéré comme une combinaison de deux systèmes binaires principaux : AcOEt-eau (1:1) et heptane-MeOH (1:1) [Foucault A. P. *et al*. 1998]. Allant de A (AcOEt-eau) à Z (heptane-MeOH), toutes les polarités entre ces deux systèmes sont couvertes par des proportions différentes de chacun des quatre solvants. Cependant, ce système pouvant correspondre à une large échelle de produits naturels, son efficacité pour purifier des grandes quantités de produits d'intérêt peut vite être limitée par un problème de solubilité de l'échantillon. Ce problème provient surtout de l'heptane ou de l'eau, dont la proportion dans tous les systèmes de A à Z reste constante (50%). Au vu de la polarité des marqueurs d'intérêt de l'extrait de *Vanda teres*, l'heptane ne semble pas être un solvant adapté car il pourrait limiter la solubilité de l'extrait de départ. Nous avons donc orienté notre démarche vers un système similaire, dérivé de l'ARIZONA, contenant toujours le mélange AcOEt-eau, mais en rajoutant du *n*-butanol. L'extrait hydro-alcoolique de *Vanda teres* contenant des composés de polarités très différentes, nous avons opté pour un gradient d'élution. Comme en CLHP, le recours à un gradient permet en effet de séparer des composés de polarités différentes dans un court laps de temps. Cette méthode a été utilisée avec succès par exemple pour séparer des anthocyanes de raisin (*Vitis vinifera* L.) et de cassis (*Ribes nigrum* L.) [Renault J-H. *et al*. 1997] ou, plus récemment, des acides phénoliques de *Lonicera japonica* [Li A. *et al*. 2012].

Dans l'objectif d'obtenir des fractions enrichies en vandatérosides et en acide eucomique, un gradient du système AcOEt-BuOH-eau permettra de pré-fractionner l'extrait

total de *V. teres*. Afin de purifier des centaines de milligrammes de composés purs, chaque fraction enrichie sera ensuite re-purifiée par un second système de solvants. Les résultats de cette purification ayant recours à la CPC, seront discutés dans ce chapitre.

B. Matériel et méthodes

B. I. Extrait de *Vanda teres*

L'extrait travaillé dans cette étude provient d'un extrait pilote de *Vanda teres* qui a été fourni par le Département d'Innovation Ethnobotanique du Centre de Recherche et Développement de LVMH situé à Saint Jean de Braye, près d'Orléans (45 800). Il a été préparé à partir de 5 kg de matériel végétal sec constitué de parties aériennes de *V. teres (*mélange de tiges et de feuilles, lot 1801, en provenance de Joe's orchid farm à Chiang Mai, Thaïlande, coordonnées GPS N18° 46', E98° 58') par 60 L d'EtOH et d'eau (90/10 v/v) pendant 2 heures (chauffage de solvant, 30 min de reflux puis refroidissement). La matière solide a été séparée du liquide par centrifugation et filtration, puis le végétal a été rincé par 20 L de solvant froid (EtOH/eau 90/10 v/v). Une partie du filtrat obtenu a été prélevée et évaporée à sec pour obtenir l'extrait, lot **1801-07/612** avec un rendement de 13,4%.

Cet extrait est appelé « extrait standard » durant cette étude, car il provient d'un procédé standardisé de LVMH recherche.

B. II. Préparation de l'extrait par SPE

L'extrait standard de *Vanda teres* **1801-07/612** a été pré-enrichi sur des cartouches Chromabond C18 ec (Macherey Nagel) afin d'obtenir un extrait contenant des composés de polarité moyenne à très polaires dans un mélange d'eau et du MeOH (15/85 v/v) et d'éliminer les composés les plus apolaires directement dans 100% de MeOH. Ainsi, deux fractions ont été récupérées, la première (15/85) en vue du fractionnement par CPC.

B. III. Analyse des échantillons par CLHP

Afin de suivre le fractionnement ainsi que réaliser des tests de partage, tous les échantillons (extrait, fractions et composés purifiés), ont été analysés par CLHP à l'aide d'un

chromatographe LC920 (Varian) équipé des pompes quaternaires, d'un passeur d'échantillons, un four à colonne et d'un détecteur UV à barrettes de diode (DAD).

Les échantillons sont séparés sur une colonne Nucleodur C18ec de 250 x 4,6 mm i.d. avec la taille des particules de 5 µm (Macherey Nagel) à l'aide d'un gradient d'élution constitué d'un mélange d'eau (solvant A) et de MeOH (solvant B), tous deux acidifiés à 0,1% d'acide formique, dans les conditions suivantes (temps : %B) : 0 min, 25% ; 7-12 min, 40% ; 15-20 min, 45% ; 28-30 min, 90% ; 34-37 min, 100% ; 40 min, 25%.

Les analyses sont effectuées à 30°C avec un débit des pompes réglé à 1 mL/min. Les chromatogrammes sont observés à 220 et 278 nm. Le volume d'injection est de 10 µL d'échantillons généralement concentrés à 5 mg/mL.

B. IV. Analyse des échantillons par CCM

Afin de mettre en évidence les vandatérosides et l'acide eucomique, tous les échantillons (extrait, fractions et composés purifiés), ont été analysés par CCM sur des plaques de gel de silice 60 F_{254} (Merck Millipore) avec un support en aluminium.

La phase mobile est constituée d'un mélange d'acétate d'éthyle, acide acétique, acide formique et eau dans les proportions 100/11/11/26 v/v. Les observations sont réalisées par révélation UV à 254 nm, suivies d'une pulvérisation d'une solution de vanilline sulfurique (5% de H_2SO_4 97% de Carlo Erba) et chauffage à 110°C pendant 5 minutes sous la lumière visible. Les vandatérosides sont révélés en couleur brun foncé et l'acide eucomique gris clair.

B. V. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)

a. Appareillage

Les essais de purification sont réalisés sur un système **SCPC250** (colonne CPC de 250 mL) couplé avec un **Spot Prep II** (Armen Instrument) équipé de pompes quaternaires, d'un détecteur UV-DAD (200-600 nm) et d'un collecteur de fractions. Le système est piloté par le logiciel Armen Glider CPC.

b. Tests de partage - détermination des coefficients de partage (Kd)

Nous avons procédé selon la méthodologie appelée « flask test ». Ce test consiste à préparer le système bi-phasique dans une ampoule à décanter, à séparer les deux phases, puis à dissoudre une pointe de spatule de l'échantillon dans le même volume de chaque phase dans un même flacon. Le même volume de chaque phase est ensuite analysé par CCM ou par CLHP. L'aire de chaque pic permet de calculer les coefficients de partage Kd selon la formule Kd= [A] stat / [A] mob, où [A] est la concentration du soluté dans la phase stationnaire divisée par celle dans la phase mobile.

c. Choix du système de solvant-extrait standard 1801-07/612

En premier lieu, l'extrait standard a été pré-fractionné avec un système de la famille « Arizona » modifié par Oka F (1991). Ce mélange de solvants bi-phasique est constitué de AcOEt-1-BuOH-eau et il permet une élution en mode gradient. Ce mode, dans notre cas, consiste à augmenter la proportion du BuOH dans la phase mobile en maintenant la même phase stationnaire durant l'élution. On peut observer sur le diagramme de phases de ce système ternaire représenté sur la **Figure III:3** que les lignes de conjugaison se rejoignent. Dans ce cas, il s'agit de faire varier la nature de la phase supérieure (à gauche des lignes de conjugaison du diagramme) en augmentant sa polarité (de 100% AcOEt à 100% BuOH), tout en gardant une composition quasi identique au niveau de la phase inférieure (à droite des lignes de conjugaisons du diagramme). Le système ne perdra pas son équilibre établi au début de l'élution.

En fonction du diagramme de phases représenté ci-dessous, il est possible de calculer la composition de chaque phase. Sur une même ligne de conjugaison, la composition du système et son équilibre ne varient pas. La proportion de la phase inférieure augmente de gauche à droite, les mêmes volumes des deux phases sont obtenus au milieu de la ligne. La composition de la phase supérieure retenue était **AcOEt-BuOH-eau 91/5/4** v/v/v. Le gradient d'élution est représenté de façon schématique sur la **Figure III:4**.

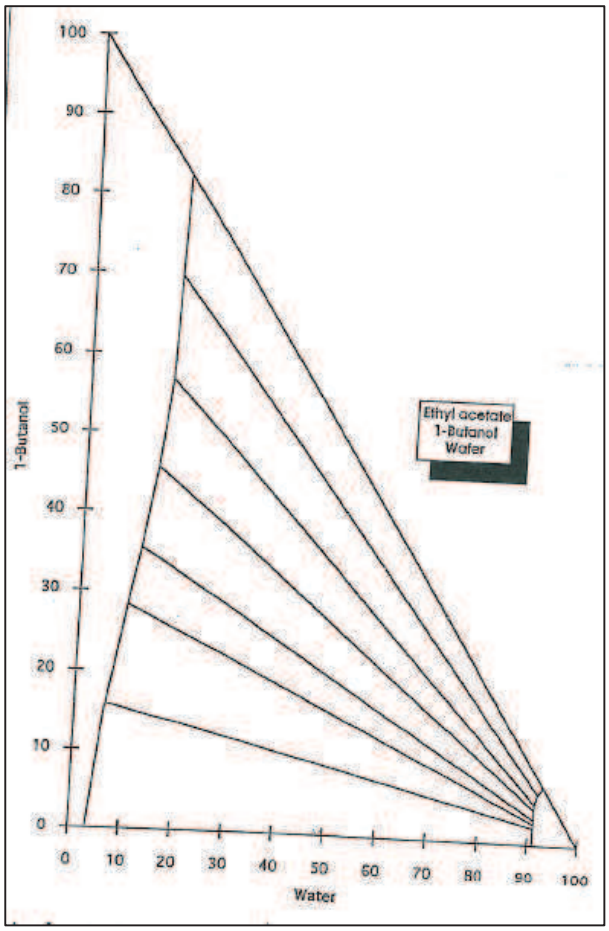


Figure III:3. Diagramme ternaire du système biphasique constitué d'acétate d'éthyle-1-butanol-eau (document fourni par Armen instrument).

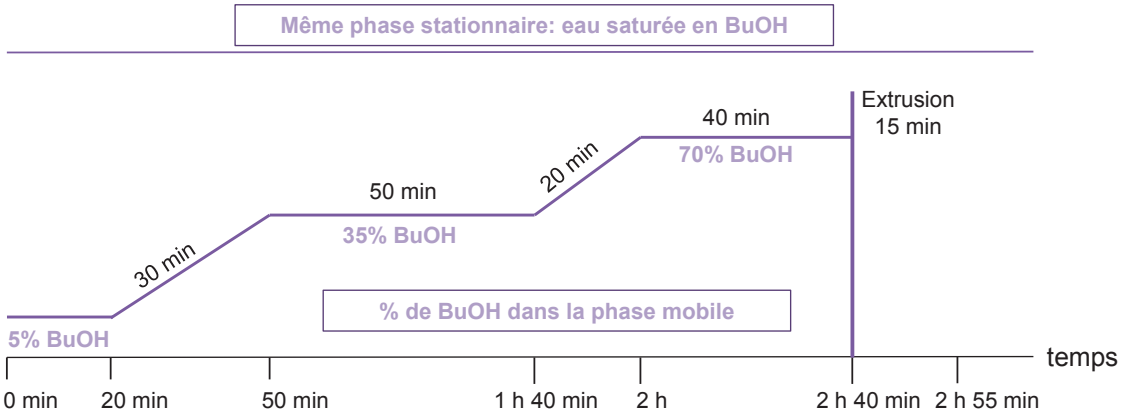


Figure III:4: Représentation schématique du gradient d'élution utilisé pour fractionner l'extrait standard de *Vanda teres* 1801-07/612. La même phase stationnaire est maintenue tout au long de l'élution, la composition de la phase mobile varie en fonction du temps. L'extrusion est réalisée après 2h40 d'élution.

d. Conditions CPC-extrait standard 1801-07/612

Chargement de la phase inférieure (eau saturée en butanol) en mode ASCENDANT (ASC):

Rotation : 500 rpm, débit : 30 mL/min

Equilibre avec la phase supérieure n°1 [**AcOEt/BuOH/Eau, 91/5/4** (v/v/v)],

1800 rpm, 6 mL/min

Après la rétention, **injection** de l'échantillon à travers une boucle de 10 mL

Elution avec la phase supérieure n°1, 1800 rpm, 6 mL/mn pendant 20 min

Gradient d'élution de la phase supérieure n°1 à la phase supérieure n°2 [**AcOEt/BuOH/Eau, 54/35/11** (v/v/v)] en 30 min

Elution avec la phase supérieure n°2 pendant 50 min

Gradient d'élution de la phase supérieure n°2 à la phase supérieure n°3 [**AcOEt/BuOH/Eau, 10/70/20** (v/v/v)] en 20 min

Elution avec la phase supérieure n°3 pendant 40 min

Début **extrusion** avec la phase inférieure à t = 2h 40min sur chromatogramme CPC, 1800 rpm, 30 mL/min pendant 15min

Détection à 278 nm et scan de 220 nm à 280 nm.

La méthode utilisée est résumée dans le **Tableau III:1**.

Tableau III:1: Méthode CPC utilisée pour fractionner l'extrait standard 1801-07/612.

	T (min)	Débit (mL/min)	Phase stationnaire (%) (ph. inf.)	Phase mobile N°1 (%)	Phase mobile N°2 (%)	Phase mobile N°3 (%)
Préparation colonne	00:00	30	100	0	0	0
	10:00	30	100	0	0	0
	10:03	6	0	100	0	0
	30:00	6	0	100	0	0
Gradient élution	00:00	6	0	100	0	0
	20:00	6	0	100	0	0
	50:00	6	0	0	100	0
	01:40:00	6	0	0	100	0
	02:00:00	6	0	0	0	100
	02:40:00	6	0	0	0	100
Extrusion	02:40:03	30	100	0	0	0
	02:55:00	30	100	0	0	0
Solution injectée	Solution d'extrait VT1801-07/612 après SPE (filtrée sur 0.45µm)					
Volume injecté	2 injections de 4.0899 g et 5.9806 g dans 8 mL de phase stat et 2 mL MeOH					
Système solvant	Gradient avec système AcOEt/BuOH/Eau (**Figure III:4**)					
Débit d'élution	6 ml/min					
Détection	278 nm et scan de 220 nm à 280 nm					

Les fractions des deux injections sont analysées par CCM puis regroupées en fonction des profils obtenus: 12 regroupements sont réalisés.

Chacun de ces regroupements est ensuite analysé par CLHP. Les regroupements intéressants (fractions enrichies en vandatérosides et acide eucomique) correspondent aux **fractions 4 à 6**.

Chacune de ces fractions subit une (ou deux) autre(s) étape(s) de purification, également par CPC, afin d'augmenter la pureté des composés d'intérêt.

e. Conditions CPC-Purification de composés contenus dans la fraction 4

Chargement de la phase inférieure en mode ASC : 500 rpm, 30 mL/min
Equilibre avec la phase supérieure n°1, [**AcOEt/BuOH/Eau, 91/5/4** (v/v/v), 1800 rpm, 6 mL/min
Après la rétention, **injection** de l'échantillon à travers une boucle de 10 mL
Elution avec la phase supérieure n°1, 1800 rpm, 6 mL/min pendant 56 min
Gradient d'élution de la phase supérieure n°1 à la phase supérieure n°2 [**AcOEt/BuOH/Eau, 89/07/04** (v/v/v)] en 3 min
Elution avec la phase supérieure n°2 pendant 21 min
Gradient d'élution de la phase supérieure n°2 à la phase supérieure n°3 [**AcOEt/BuOH/Eau, 85/10/05** (v/v/v)] en 20 min
Elution avec la phase supérieure n°3 pendant 15 min
Gradient d'élution de la phase supérieure n°3 à la phase supérieure n°4 [**AcOEt/BuOH/Eau, 67/25/08** (v/v/v)] en 30 min
Elution avec la phase supérieure n°4 pendant 15 min
Début **extrusion** avec la phase inférieure à t=2h 50min sur chromatogramme CPC, 1800 rpm, 30 mL/min pendant 20 min
Détection à 278 nm et scan de 220 nm à 280 nm.

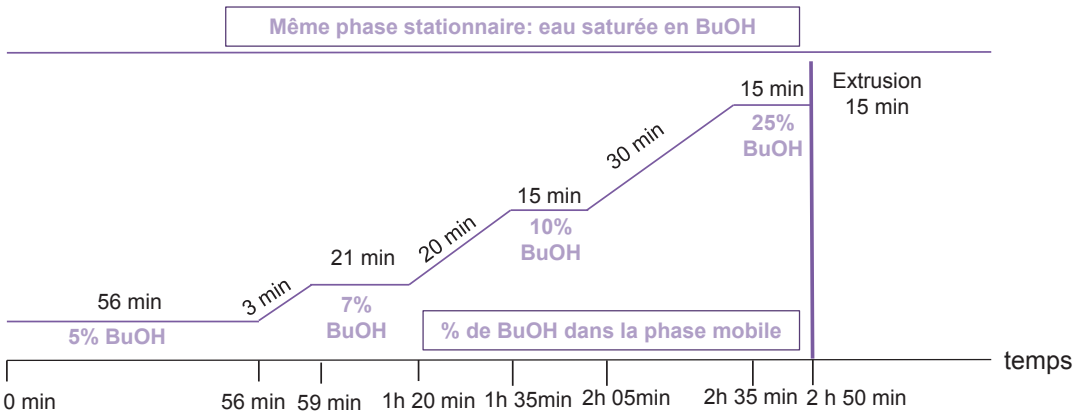


Figure III:5: Représentation schématique du gradient d'élution utilisé pour purifier les composés contenus dans la Fraction 4 issue de l'extrait standard de *Vanda teres* 1801-07/612. La même phase stationnaire est maintenue tout au long de l'élution, la composition de la phase mobile varie en fonction du temps. L'extrusion est réalisée après 2h50min d'élution.

La méthode utilisée est résumée dans le **Tableau III:2** et schématiquement représentée sur la Figure III:5.

Les fractions sont analysées par CCM puis regroupées en fonction des profils chromatographiques obtenus.

Tableau III:2: Méthode CPC utilisée pour purifier les composés dans la Fraction 4.

	T (min)	Débit (mL/min)	Phase stat (%) (ph. inf.)	Phase mob N°1 (%)	Phase mob N°2 (%)	Phase mob N°3 (%)	Phase mob N°4 (%)
Préparation colonne	00:00	30	100	0	0	0	0
	10:00	30	100	0	0	0	0
	10:03	6	0	100	0	0	0
	30:00	6	0	100	0	0	0
Gradient élution	00:00	6	0	100	0	0	0
	56:00	6	0	100	0	0	0
	59:00	6	0	0	100	0	0
	01:20:00	6	0	0	100	0	0
	01:35:00	6	0	0	0	100	0
	02:05:00	6	0	0	0	100	0
	02:35:00	6	0	0	0	0	100
	02:50:00	6	0	0	0	0	100
Extrusion	02:50:03	30	100	0	0	0	0
	03:10:00	30	100	0	0	0	0

Solution injectée	Fraction 4 dans 5 mL de chaque phase du système
Masse injectée	391 mg
Système solvant	AcOEt/BuOH/Eau (91/5/4, v/v/v) phase supérieure Phase stationnaire = ph. Inf. Eau saturée en Butanol
Débit d'élution	6 mL/min
Détection	278 nm et scan de 220 nm à 280 nm

f. Conditions CPC-Purification de composés contenus dans la fraction 5

Cette fraction est éluée avec un système de solvant différent du précédent en mode isocratique. Après réalisation des tests de partage, le mélange de solvants bi-phasique retenu était AcOEt/EtOH/eau 46/14/40 v/v/v. Les deux phases, inférieure (phase stationnaire) et supérieure (phase mobile), ont été préparées au préalable à l'aide d'une ampoule à décanter.

Chargement de la phase inférieure en mode ASC : 500 rpm, 30 mL/min

Equilibre avec la phase supérieure, 1800 rpm, 6 mL/min

Après la rétention, **injection** de l'échantillon à travers une boucle de 10 mL

Elution avec la phase supérieure, 1800 rpm, 6 mL/min

Début **extrusion** avec la phase inférieure à t = 2h 20min sur chromatogramme CPC, 1800 rpm, 6 puis 10 mL/min

Détection à 220 nm et scan de 220 nm à 280 nm.

La méthode utilisée est résumée dans le **Tableau III:3.**

Les fractions sont analysées par CCM puis regroupées en fonction des profils chromatographiques obtenus.

Tableau III:3: Méthode CPC utilisée pour purifier les composés dans la Fraction 5.

	T (min)	Débit (mL/min)	Phase stat (%) (ph. inf.)	Phase mob (%) (ph. sup.)
Préparation colonne	00 :00	30	100	0
	10 :00	30	100	0
	10 :03	6	0	100
	30 :00	6	0	100
Elution	00 :00	6	0	100
	02 :20 :00	6	0	100
Extrusion	02 :20 :03	6	100	0
	02 :34 :13	6	100	0
	02 :34 :17	10	100	0
	03 :05 :00	10	100	0
Solution injectée	Fraction 5 dans 5 mL de chaque phase du système solvant			
Masse injectée	580 mg			
Système solvant	AcOEt/EtOH/Eau (46/14/40, v/v/v)			
Débit d'élution	6 mL/min			
Détection	220 nm et scan de 220 nm à 280 nm			

g. Conditions CPC-Purification de composés contenus dans la fraction 6 et fraction 6bis

L'objectif était de réaliser une purification du composé majoritaire de la **Fraction 6** ainsi que de l'extrait standard **1801-07/612.**

Cette fraction a subi deux purifications successives par CPC. La première utilise un système de solvant **AcOEt/isopropanol/eau** 3/2/5 v/v/v en mode isocratique. Afin d'augmenter la pureté du composé d'intérêt à l'issu de la première CPC, une fraction

enrichie en **vandatéroside II**, nommée ***Fraction 6bis***, a été réinjectée une deuxième fois utilisant le mode « Dual » permettant d'isoler le composé de ses impuretés proches. Cette méthode est adaptée pour la séparation de composés structurellement proches et consiste à inverser la phase mobile et la phase stationnaire lorsqu'un de ces composés commence à être élué. L'inversion des phases peut être réalisée plusieurs fois. Dans ce cas, on parle du « multi-dual mode ».

Les deux phases, inférieure et supérieure, ont été préparées au préalable à l'aide d'une ampoule à décanter. La phase supérieure a été choisie comme phase mobile pour la première CPC de la ***Fraction 6***, l'élution se fait donc en mode **ascendant** (ASC). Pour la ***Fraction F6bis***, la phase mobile était la phase inférieure, l'élution se fait donc en mode **descendant** (DSC).

Les fractions sont analysées par CCM puis regroupées en fonction des profils chromatographiques obtenus. La méthode utilisée pour obtenir la ***Fraction 6bis*** à partir de la ***Fraction 6*** est résumée dans le **Tableau III:4** et celle utilisée pour augmenter la pureté du vandatéroside II dans la ***Fraction 6bis*** dans le **Tableau III:5**.

Les conditions de la première CPC de la ***Fraction 6*** étaient les suivantes:

Chargement de la phase inférieure en mode ASC : 500 rpm, 30 mL/mIn
Equilibre avec la phase supérieure, 1800 rpm, 6 mL/min
Après la rétention, **injection** de l'échantillon à travers une boucle de 10 mL
Elution avec la phase supérieure, 1800 rpm, 6 mL/min
Début **extrusion** avec la phase supérieure à t = 1h 30min sur chromatogramme CPC, 1800 rpm, 30 mL/min
Détection à 220 nm et scan de 220 nm à 280 nm.

Les conditions de la CPC de la ***Fraction 6-bis*** en mode « **dual** » :

Chargement de la phase supérieure en mode DSC : 500 rpm, 30 mL/min
Equilibre avec la phase inférieure, 1800 rpm, 6 mL/min
Après la rétention, **injection** de l'échantillon à travers une boucle de 10 mL
Elution avec la phase inférieure, 1800 rpm, 6 mL/min jusqu'au début du pic de vandatéroside II
Dual mode / Elution avec la phase supérieure en mode ASC, 1800 rpm, 6 mL/min jusqu'au début du pic de vandatéroside II
Dual mode / Elution avec la phase inférieure en mode DSC, 1800 rpm, 6 mL/mn jusqu'à la fin du pic de vandateroside II

Début **extrusion** avec la phase supérieure à t = 2h 19min 45'' sur chromatogramme

CPC, 1600 rpm, 30 mL/min

Détection à 220 nm et scan de 220 nm à 280 nm.

Tableau III:4: Méthode CPC utilisée pour purifier les composés dans la Fraction 6 et obtenir la Fraction F6bis.

	T (min)	Débit (mL/min)	Phase stat (%) (ph. inf.)	Phase mob (%) (ph. sup.)
Préparation colonne	00 :00	30	100	0
	10 :00	30	100	0
	10 :03	6	0	100
	30 :00	6	0	100
Elution	00 :00	6	0	100
	01 :30 :00	6	0	100
Extrusion	01 :30 :03	30	100	0
	01 :45 :00	30	100	0
Solution injectée	Fraction 6 dans 5 mL des deux phases du système solvant			
Masse injectée	880 mg			
Système solvant	AcOEt/iPrOH/Eau (3/2/5, v/v/v)			
Débit d'élution	6 mL/min			
Détection	220 nm et scan de 220 nm à 280 nm			

Tableau III:5: Méthode CPC utilisée pour purifier les composés dans la Fraction 6bis obtenue à partir de la Fraction 6.

	T (min)	Débit (mL/min)	Phase sup. (%)	Phase inf. (%)	Mode
Préparation colonne	00 :00	30	100	0	DSC
	10 :00	30	100	0	DSC
	10 :03	6	0	100	DSC
	30 :00	6	0	100	DSC
Elution	00 :00	6	0	100	DSC
	43 :13	6	0	100	DSC
	43 :15	6	100	0	ASC
	01 :27 :56	6	100	0	ASC
	01 :27 :58	6	0	100	DSC
	02 :19 :41	6	0	100	DSC
Extrusion	02 :19 :45	30	100	0	DSC
	02 :34 :00	30	100	0	DSC
Solution injectée	F6 bis dans 4 mL des deux phases du système solvant				
Masse injectée	485 mg				
Système solvant	AcOEt/iPrOH/Eau (3/2/5, v/v/v)				
Débit d'élution	6 ml/min				
Détection	220 nm et scan de 220 nm à 280 nm				

Le **Tableau III:6** résume les différentes injections, le système de solvant utilisé ainsi que les quantités injectées dans chaque analyse.

Tableau III:6: Récapitulatif des injections CPC pour purifier les vandatérosides et l'acide eucomique à partir de l'extrait VT1801-07/612.

Echantillon	Colonne	Masse injectée	Système Solvant	Vitesse rotation	Débit	*Mode*	Détection
VT1801-07/612	SCPC 250mL Volume réel mesuré 261 mL	4.0899 g 5,9806 g	Gradient avec AcOEt/BuOH/Eau	1800 tr/min	6 mL/min	*ASC*	278 nm Scan 220-280 nm
Fraction 4 (Vandatéroside III et acide eucomique)		391 mg	Gradient avec AcOEt/BuOH/Eau			*ASC*	
Fraction 5 (Vandatéroside I et acide eucomique)		580 mg	AcOEt/EtOH/Eau (46/14/40, v/v/v)			*ASC*	
Fraction 6 (Vandatéroside II)		880 mg	AcOEt/iPrOH/Eau (30/20/50, v/v/v)			*ASC*	
Fraction 6bis (Vandatéroside II)		485 mg	AcOEt/iPrOH/Eau (30/20/50, v/v/v)			*Dual Mode*	

C. Résultats et discussion

C.I. Profil chromatographique de l'extrait VT1801-07/612: mise en évidence des composés d'intérêt

Avant de commencer le fractionnement par CPC, il a fallu s'assurer que l'extrait fourni par un tiers contient bien tous les composés d'intérêt, les vandatérosides I à III (**VT I** à **III**) et l'acide eucomique (**AE**), et ainsi les repérer par des profils CLHP et CCM. En se basant sur les travaux antérieurs du laboratoire, les conditions CLHP mises au point par Charlotte Simmler ont été utilisées pour vérifier la qualité de l'extrait, puis le gradient d'élution a été optimisé afin de raccourcir la durée de l'analyse. Ses conditions de CCM restent inchangées et permettent également de visualiser dans l'extrait les composés d'intérêt.

Sur le chromatogramme à 220 nm, quatre pics majoritaires sont visibles (**Figure III:6**). Cette longueur d'onde a été sélectionnée pour visualiser l'ensemble des composés présents dans l'extrait mais présente l'inconvénient d'être peu spécifique et d'entrainer une dérive de la ligne de base en fin de run. Les maxima d'absorbances des vandatérosides

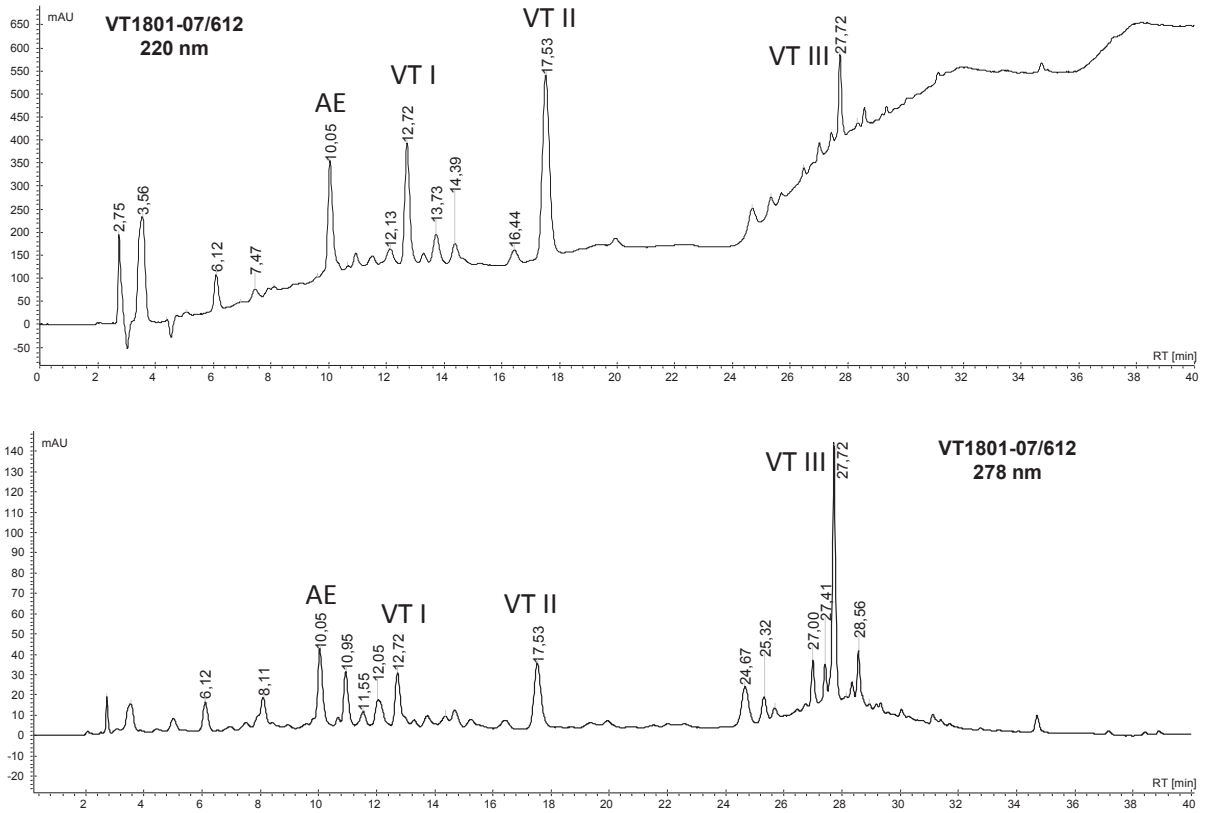


Figure III: 6. Analyse CLHP de l'extrait de *Vanda teres* 1801-07/612 à 220 nm (haut) et 278 nm (bas). Phase stationnaire : Nucleodur C18 250 x 4,6 mm i.d. 5 µm. Phase mobile eau+0,1%A.F. (A) et MeOH +0,1% A.F. (B) Gradient d'élution (temps : %B) : 0 min, 25% ; 7-12 min, 40% ; 15-20 min, 45% ; 28-30 min, 90% ; 34-37 min, 100% ; 40 min, 25%.

étant 225 et 278 nm, une détection à 278 nm a également été choisie afin de mettre en évidence de manière plus spécifique les marqueurs recherchés dans l'extrait.

Sur CCM, les composés d'intérêt sont mis en évidence comme des spots bruns révélés à la vanilline sulfurique et de Rf conformes à ceux trouvés par Charlotte Simmler (**Figure III:7**). La présence dans le lot 1801-07/612 d'un extrait standard de *Vanda* teres des vandatérosides et de l'acide eucomique ayant été vérifiée par CLHP et CCM, ces deux techniques nous serviront pour réaliser des tests de partage nécessaires pour le fractionnement par CPC tout au long des différentes étapes de purification.

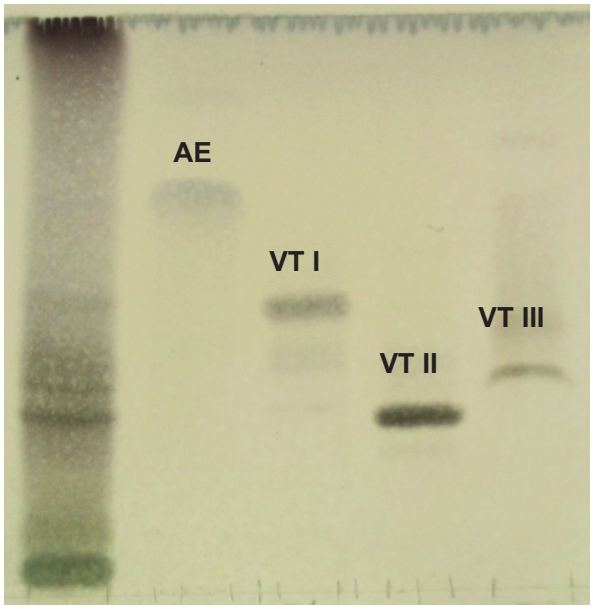


Figure III:7: Analyse CCM de l'extrait de *Vanda teres* 1801-07/612 et les témoins purifiés, acide eucomique et VT I à III. Plaques CCM Silice 60 F_{254} support en aluminium. Phase mobile AcOEt/AA/AF/Eau 100/11/11/26 v/v/v/v. Observation après révélation à la vanilline sulfurique après chauffage à 110°C et observation à la lumière visible.

C. II. Pré-purification de l'extrait VT1801-07/612 par SPE

L'extrait standard est un extrait hydro-alcoolique (EtOH/eau 90/10) qui contient des composés des plus polaires au plus apolaires. Les vandatérosides, composés glycosylés, ainsi que l'acide eucomique sont plutôt polaires. Les composés très apolaires peuvent devenir gênants, d'autant plus lorsqu'ils ne sont pas UV-visibles et donc impossibles à repérer par nos techniques d'analyses comme la CLHP ou la CPC, toutes les deux équipées par un détecteur DAD. C'est le cas par exemple de certaines chlorophylles ou d'acides gras, sans intérêt dans cette étude. L'objectif d'une étape de purification par SPE est de les éliminer et ainsi d'enrichir l'extrait en composés polaires d'intérêt.

Le profil CLHP du mélange montre que le dernier composé d'intérêt, le VT III, est élué à 87% de MeOH et 23% d'eau. En SPE, en plus de l'affinité pour la phase stationnaire, le mélange est également élué grâce au vide créé par une pompe. Ainsi, même si le VT III n'est élué qu'avec 87% de MeOH en CLHP, une phase mobile ne renfermant que 85% de MeOH nous a paru suffisante pour éluer tous nos composés d'intérêt. Ainsi, deux fractions ont été obtenues :

- la fraction 85/15 MeOH/eau (v/v) contenant majoritairement l'acide eucomique et les trois vandatérosides (rendement 95% ramené à la masse d'extrait sec passé sur les cartouches SPE), mais renfermant aussi les autres constituants de l'extrait, de même polarité que les composés d'intérêt
- et la fraction 100% MeOH, contenant les composés à éliminer (rendement d'environ 4%).

C. III. Chromatographie de partage centrifuge

a. Fractionnement de l'extrait standard 1801-07/612 SPE 85% MeOH

Le but principal de cette étude est de purifier en quantité importante des marqueurs de *Vanda teres*. Un extrait enrichi en acide eucomique et en vandatérosides a été obtenu par passage sur cartouche SPE. Nous avons déterminé la pureté relative (déterminée par CLHP à 220 nm) de chaque composé dans la fraction SPE 85% MeOH afin d'évaluer l'efficacité d'un fractionnement par CPC (**Tableau III:7**).

Tableau III:7: Pureté relative CLHP (déterminée à 220 nm) des composés majoritaires dans l'extrait VT1801-07/612 SPE 85% MeOH.

	Acide eucomique (% CLHP à 220nm)	Vandateroside I (% CLHP à 220nm)	Vandateroside II (% CLHP à 220nm)	Vandateroside III (% CLHP à 220nm)
Extrait standard	7,1%	8,7%	20,1%	9,1%

Un gradient d'élution avec le système ARIZONA (optimisé) permet de balayer une gamme de polarité importante et ainsi fractionner un extrait de composition relativement complexe.

Afin de déterminer la proportion du BuOH en début du gradient, des tests de partage sur CCM ont été réalisés avec les systèmes bi-phasiques les plus extrêmes (AcOEt-eau

saturée en BuOH 50/50 v/v et BuOH-eau 50/50 v/v) ainsi qu'un système intermédiaire de polarité moyenne composé d'un mélange des trois solvants (AcOEt-BuOH-eau 30/20/50 v/v/v) (**Figure III:3**). Dans ce système, la phase inférieure est constituée d'une grande proportion d'eau et est donc très polaire. En maintenant cette phase stationnaire, la phase mobile (supérieure) du premier système extrême AcOEt-eau va théoriquement entraîner les composés les plus apolaires qui ont plus d'affinité pour elle. En réalisant un gradient vers un système intermédiaire, les composés d'intérêt de polarité moyenne à polarité élevée vont se séparer progressivement. L'objectif de cette phase intermédiaire est d'obtenir des fractions enrichies en acide eucomique et en vandatérosides. Enfin, faire évoluer le gradient vers un système plus polaire en augmentant la proportion de BuOH, permettra théoriquement de fractionner les composés de polarité élevée. En CPC, le troisième solvant permet de changer non seulement la polarité du système, mais également la sélectivité. Ainsi, certains composés plus polaires pourront être élués avec une proportion de BuOH inférieure que ce qui peut être attendu en observant le chromatogramme CLHP.

Plusieurs proportions du BuOH dans la première phase supérieure du début du gradient ont été testées dans l'objectif d'optimiser la séparation et aussi la durée de l'analyse.

- En commençant le gradient d'élution avec la phase supérieure du système AcOEt-eau saturée en BuOH, les premiers composés apolaires ont été élués après 30 minutes d'analyse sans que la séparation de ce groupe de constituants soit marquante.
- Au cours d'un deuxième essai, nous avons démarré le gradient avec une phase mobile contenant 25% de BuOH. La durée de l'analyse a été ainsi raccourcie, mais tout le groupe de composés apolaires a été élué en bloc, sans être fractionné.
- Dans le troisième essai, nous avons fixé la proportion de BuOH à 5% dans la première phase mobile, ce qui était un compromis entre la séparation des trois groupes de composés et la durée de l'analyse. Les composés très polaires comme les polysaccharides n'étant pas recherchés dans cette étude, nous avons arrêté le gradient avec une phase mobile à 70% de BuOH avant de procéder à l'extrusion.

La première analyse par CPC de l'extrait standard VT1801-07/612 (préfractionné par SPE) nous a permis d'obtenir 12 fractions, dont 3 enrichies en marqueurs de *Vanda teres* (**Figure III:8** et **III:9**). Les regroupements les plus intéressants pour poursuivre la purification des différents marqueurs sont ceux nommés **F4**, **F5** et **F6**. Les rendements massiques (injection de 10 g d'extrait en deux fois) sont résumés dans le **Tableau III:8** et la pureté relative des différents marqueurs dans ces fractions a été de nouveau déterminée (**Tableau III:9**). Le volume de la phase stationnaire à l'équilibre était de 110 mL (58,2% de rétention) avec une pression à l'équilibre de 35 bars.

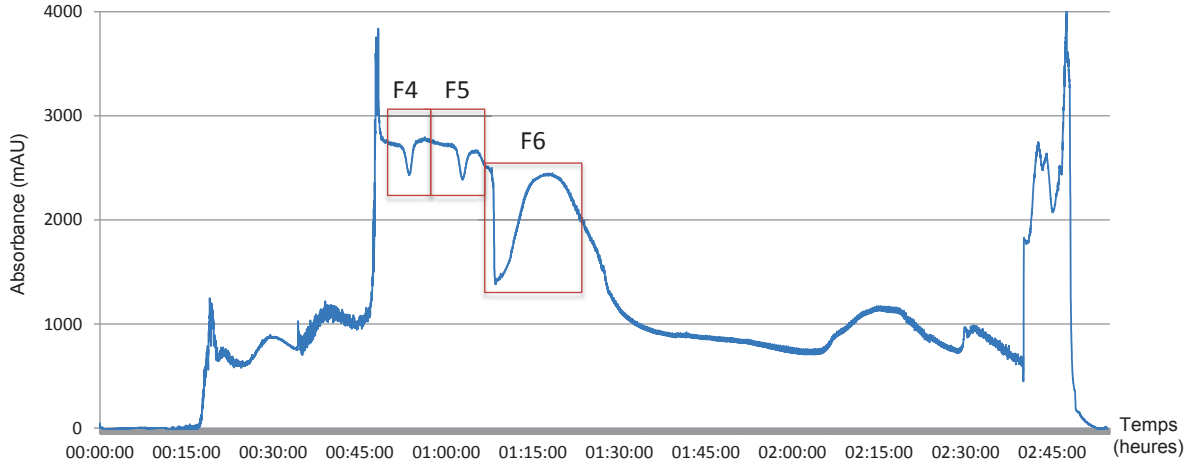


Figure III:8. Chromatogramme CPC du fractionnement de l'extrait standard de *Vanda teres* 1801-07/612 (préfractionné sur SPE) à 278 nm. Les fractions enrichies en vandatérosides et acide eucomique sont entourées en rouge.

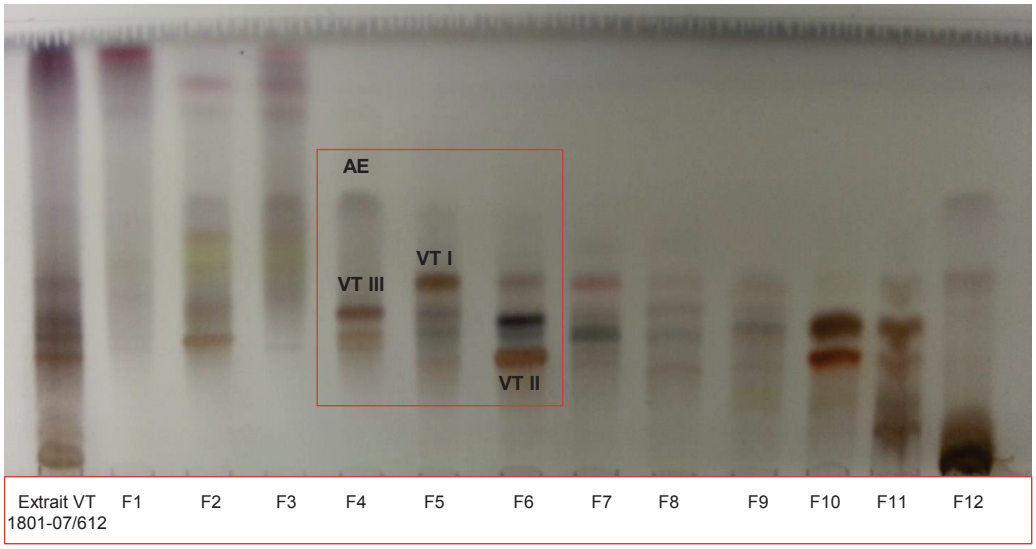


Figure III:9. Analyse CCM des 12 regroupements réalisés après le fractionnement par CPC de l'extrait de *Vanda teres* 1801-07/612. Plaques CCM Silice 60 F_{254} support en aluminium. Phase mobile AcOEt/AA/AF/Eau 100/11/11/26 (v/v/v/v). Révélation à la vanilline sulfurique après chauffage à 110°C à la lumière visible.

Tableau III:8: Rendements massiques (exprimé par rapport à la masse d'extrait injecté) du fractionnement par CPC de l'extrait de *Vanda teres* 1801-07/612.

Regroupements	Masse récupérée	Rendement massique (m/m)
Fraction 1	332 mg	3,2 %
Fraction 2	282 mg	2,8 %
Fraction 3	397 mg	3,9 %
Fraction 4	**555 mg**	**5,5 %**
Fraction 5	**580 mg**	**5,8 %**
Fraction 6	**943 mg**	**9,4 %**
Fraction 7	175 mg	1,7 %
Fraction 8	293 mg	2,9 %
Fraction 9		
Fraction 10	319 mg	3,2 %
Fraction 11	648 mg	6,4 %
Fraction 12	2,724 g	27,1 %

Tableau III:9: Bilan des puretés relatives CLHP (déterminées à 220 nm) des composés d'intérêt présents dans les fractions F4 à F6 issues du fractionnement par CPC de l'extrait de *vanda teres* 1801-07/612.

	Acide eucomique (% CLHP à 220nm)	Vandatéroside I (% CLHP à 220nm)	Vandatéroside II (% CLHP à 220nm)	Vandatéroside III (% CLHP à 220nm)
VT1801-07/612	7,1%	8,7%	20,1%	9,1%
Fraction 4	20,4%	3,1%	-	14,1%
Fraction 5	4,2%	53,2%	-	-
Fraction 6	-	2,1%	76,1%	-

b. Purification de l'acide eucomique et du vandatéroside III de la Fraction 4

La **fraction 4** contenait majoritairement le vandatéroside III et l'acide eucomique. Afin de poursuivre leur purification, il s'agit de repérer à quel moment du gradient (% de BuOH dans la phase mobile), cette fraction a été éluée. Celle-ci a ensuite été réinjectée en utilisant le même système de solvants qui a servi au fractionnement de l'extrait de départ, mais en utilisant un mode isocratique et avec une proportion de BuOH dans la phase mobile plus basse.

La **fraction 4** est éluée quand la phase mobile en tête de colonne contient 35% de BuOH (**Figure III:4**). En tenant compte de la différence entre la tête et la queue de la

colonne (approximativement 12 minutes), nous avons estimé que la **fraction 4** est éluée à environ 25% de BuOH. Deux expérimentations ont été réalisées:

- Au cours d'un premier essai, nous avons opté pour un mode isocratique avec la composition de la phase mobile (phase supérieure) **AcOEt-BuOH-Eau 73/7/20** (v/v/v) et pour la phase stationnaire de l'eau saturée en BuOH. Dans ces conditions, la totalité de la fraction a été éluée massivement, sans séparation des composés d'intérêt. L'ensemble des fractions a donc été rassemblé à nouveau, pour récupérer 391 mg de **fraction 4**.

- Un second essai de séparation de cette fraction a été réalisé. Cette fois-ci, la même réflexion a été maintenue, mais la proportion de BuOH était probablement trop importante et le mode isocratique non adapté. Lors de ce deuxième essai, nous avons voulu ralentir l'élution, et donc optimiser la séparation, et commencer avec 5% de BuOH dans la phase mobile et monter progressivement en fonction du déroulement de l'analyse. Ainsi, le gradient d'élution est monté progressivement jusqu'à 25% de BuOH. Le volume de la phase stationnaire à l'équilibre était de 117 mL (55,2 % de rétention) avec une pression de 32 bars. Le chromatogramme correspondant à ce deuxième essai est représenté sur la **Figure III:10**.

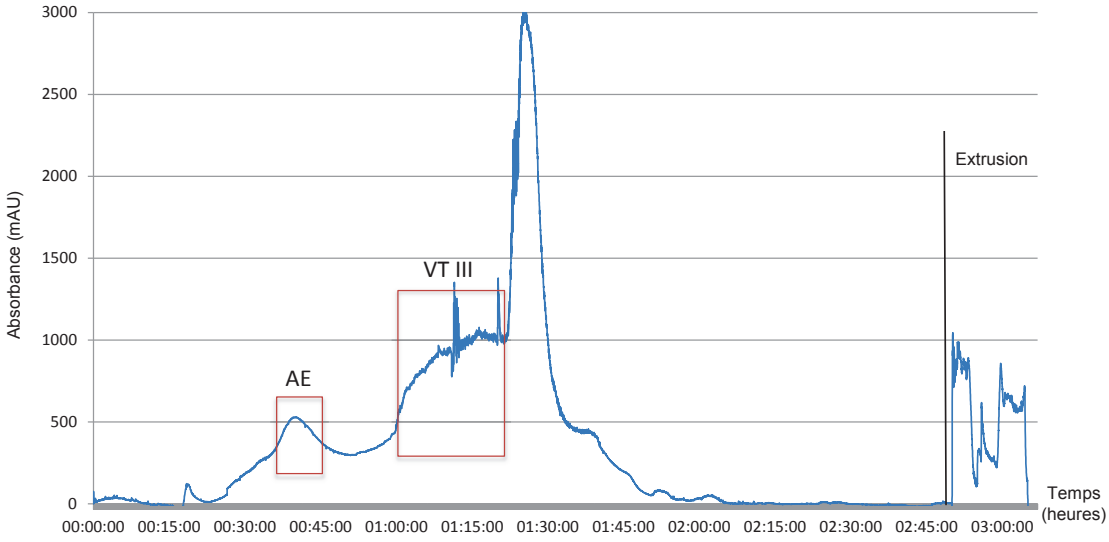


Figure III:10: Chromatogramme CPC de la Fraction 4 à 278 nm permettant de purifier l'acide eucomique et le vandatéroside III.

Le deuxième essai a apporté une meilleure séparation que le premier. Cependant, dès le premier fractionnement de l'extrait standard, utilisant un gradient du même système ternaire que nos deux essais, les composés dans la **fraction 4** ont déjà été élués dans une même fraction. Dans ces conditions, nous avons réussi à obtenir 46 mg d'acide eucomique avec une pureté relative (déterminée par CLHP à 220 nm) de 94,5% (11,8% de rendement massique) et 50,5 mg d'une fraction contenant le vandatéroside III à 68,9% (12,9% de rendement) (**Figure III:11**).

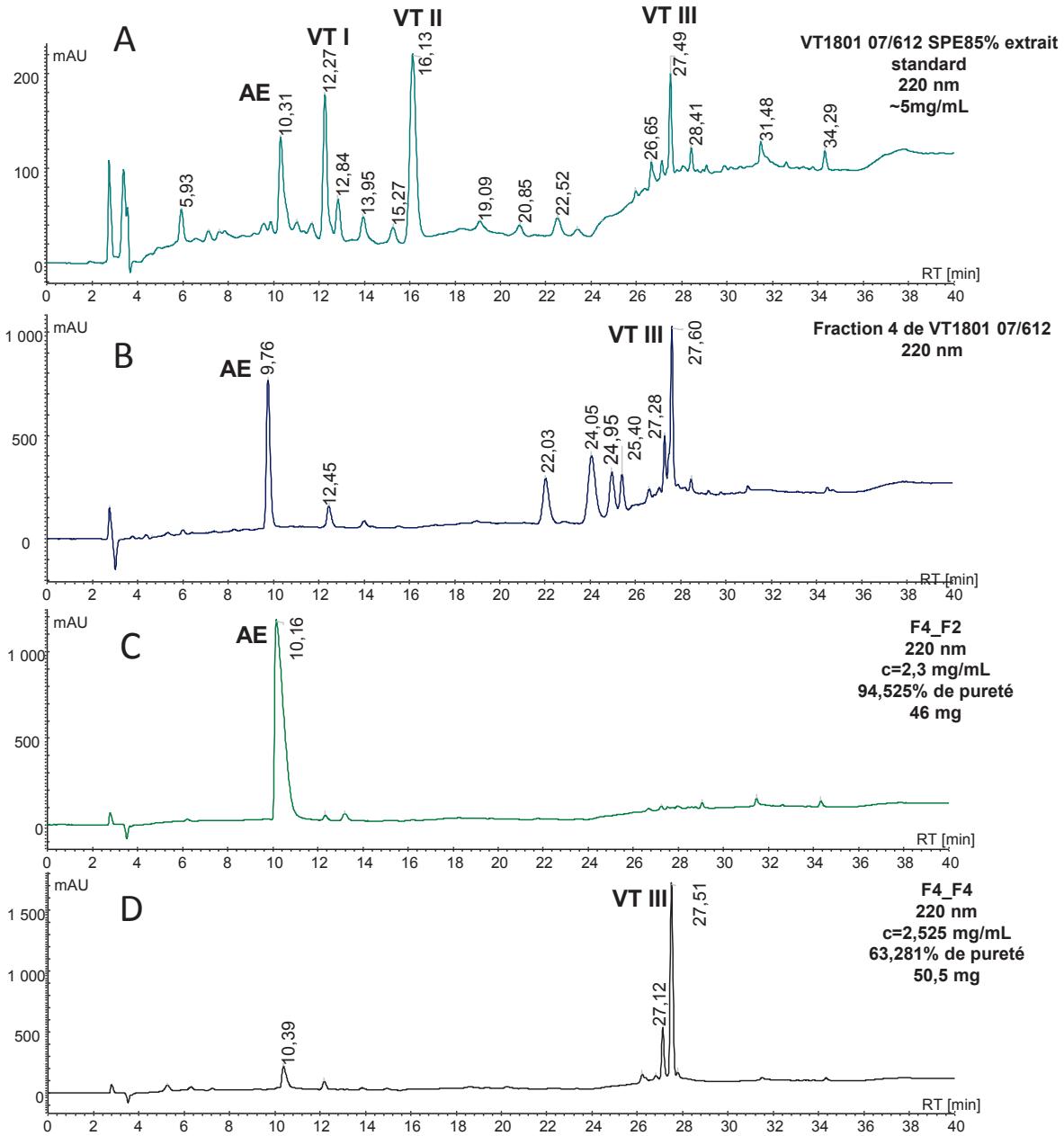


Figure III:11: Analyse CLHP à 220 nm des fractions obtenues à l'issu de la CPC de la Fraction 4. **A**: extrait standard VT1801-07/612 ; **B**: Fraction 4 obtenue à l'issue de la CPC de l'extrait standard ; **C**: Acide eucomique obtenu à 94,5% de pureté relative à 220 nm ; **D**: Vandatéroside III obtenu à 63,3% de pureté relative à 220 nm. Phase stationnaire : Nucleodur C18 250 x 4,6 mm i.d. 5 µm. Phase mobile eau+0,1%A.F. (A) et MeOH +0,1% A.F. (B) Gradient d'élution (temps : %B) : 0 min, 25% ; 7-12 min, 40% ; 15-20 min, 45% ; 28-30 min, 90% ; 34-37 min, 100% ; 40 min, 25%.

Le vandatéroside III n'a pas été obtenu avec une pureté satisfaisante car elle n'atteint que 68,9%. Afin d'améliorer sa purification, il serait judicieux de choisir un système de solvants avec une sélectivité différente de celle du premier système utilisé. Par la suite, afin de purifier les deux autres vandatérosides, nous avons recherché d'autres systèmes afin d'optimiser la séparation et augmenter la pureté des composés recherchés.

c. Purification du vandatéroside I de la Fraction 5

La **fraction 5** contient majoritairement le vandatéroside I mais également l'acide eucomique, bien qu'en plus faible concentration par rapport à la Fraction 4. Un nouveau système de solvant a été recherché afin d'optimiser sa sélectivité. Pour cela, il a été envisagé de remplacer le butanol par l'éthanol ou l'isopropanol avec des proportions différentes (**Tableau III:10**). Ces solvants offrent également l'avantage de permettre une évaporation plus rapide des fractions. En premier lieu, afin d'avoir une idée globale sur le comportement des composés d'intérêt, plusieurs tests de partage ont été réalisés sur CCM. Ensuite, les coefficients de partage (Kd) ont été calculés par analyse CLHP. Grâce à ces coefficients, il est possible de prédire l'ordre d'élution des différents composés et estimer s'ils peuvent être élués séparément ou s'ils risquent de co-éluer avec d'autres constituants du mélange injecté.

Tableau III:10: Tableau récapitulatif des systèmes de solvant testés pour purifier le vandatéroside I et l'acide eucomique à partir de la Fraction 5.

Système solvant	Proportions (v/v/v)
AcOEt-iPrOH-eau	30/20/50
AcOEt-iPrOH-eau	35/15/50
AcOEt-iPrOH-eau	40/10/50
AcOEt-EtOH-eau	42/18/40
AcOEt-EtOH-eau	46/14/40

Parmi les mélanges testés, le système de solvant permettant la meilleure séparation a été le mélange **AcOEt-EtOH-eau 46/14/40** (v/v/v).

Les composés seront élués dans l'ordre croissant des Kd. Afin de prédire si certains risquent de co-éluer, un coefficient de résolution **(α)** est calculé comme rapport entre les Kd les plus proches :

α = Kd1 / Kd2, avec Kd2>Kd1.

Pour avoir une séparation optimale, α doit être supérieur à 1,5 [Ito Y. 2005].

Selon les résultats calculés, l'acide eucomique devrait être élué en premier, suivi du vandatéroside I probablement en mélange avec son pic voisin élué à 13,99 min en CLHP (**Figure III:12**). Même si le coefficient de résolution est inférieur à 1,5, un début de séparation peut avoir lieu. Afin de raccourcir la durée de l'analyse, les composés ayant un Kd de 6,3 et 6,5 seront élués après l'extrusion (**Tableau III:11**).

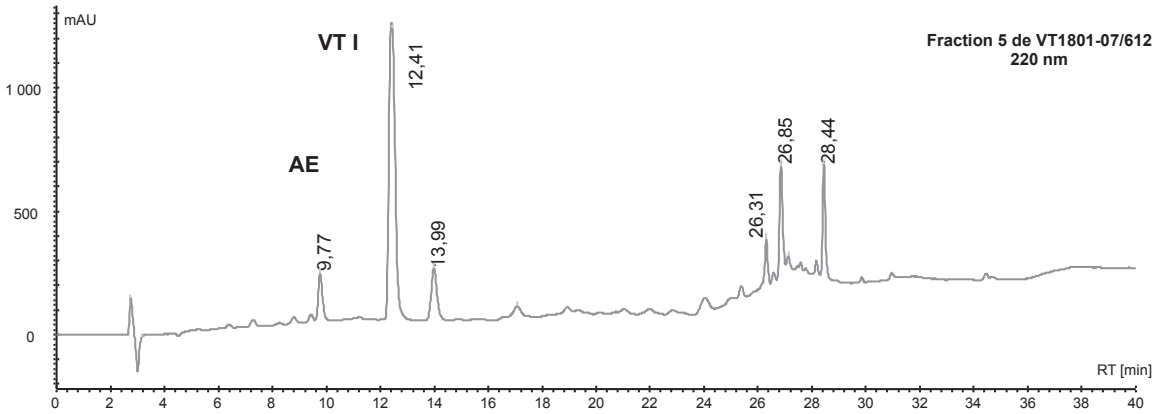


Figure III:12: Chromatogramme CLHP à 220 nm de la Fraction 5. Phase stationnaire : Nucleodur C18 250 x 4,6 mm i.d. 5 µm. Phase mobile eau+0,1%A.F. (A) et MeOH +0,1% A.F. (B) Gradient d'élution (temps : %B) : 0 min, 25% ; 7-12 min, 40% ; 15-20 min, 45% ; 28-30 min, 90% ; 34-37 min, 100% ; 40 min, 25%.

Tableau III:11: Les coefficients de partage des différents composés contenus dans la fraction 5 ainsi que leur ordre d'élution. Le coefficient de résolution permet de prédire l'éventuelle co-élution des pics voisins.

Temps de rétention (T_R) (min)	Coefficient de partage (Kd) (ASC)	Ordre d'élution
9,77	0,48	1
12,41	1,2	2
13,99	1,45	3
26,31	6,5	6
26,85	6,3	5
28,44	3	4

Ordre d'élution	Kd (T_{RA}) / Kd (T_{RB})	Coefficient de résolution (α)
1	1,2/0,48	2,5
2	1,45/1,2	1,2
3	3/1,45	2,1
4	6,3/3	2,1
5	6,5/6,3	1,0

Ayant atteint l'équilibre du système à 80 mL de phase stationnaire (69,3% de rétention), nous avons pu estimer le volume de rétention du vandatéroside I selon la formule :

$$V_R = V_S + (Kd \times V_M)$$

V_S étant le volume de la phase stationnaire à l'équilibre et V_M le volume de la phase mobile.

Ainsi, le VT I devrait être élué de la colonne avec environ 297 mL de phase mobile. Avec un débit de 6 mL/min, le temps d'élution du VT I est estimé à environ 50 min. La pression du système à l'équilibre était de 26 bars. Le chromatogramme obtenu après avoir injecté 580 mg de la **fraction 5** est représenté sur la **Figure III:13**.

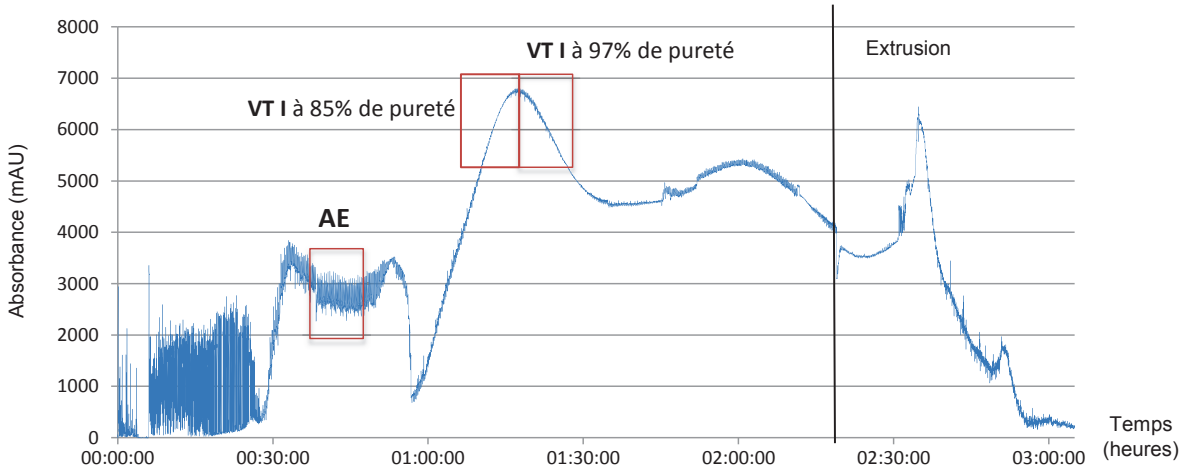


Figure III:13: Chromatogramme CPC à 220 nm de la Fraction 5. Une fraction contenant l'acide eucomique (AE) et deux contenant le vandatéroside I (VT I) à 85 et 97% de pureté relative (déterminée à 220 nm) ont été isolées.

Le mode de prédiction s'est avéré pertinent car le vandatéroside I a commencé à être élué à environ 58 min. Malgré une co-élution prévisible avec d'autres impuretés, une quantité importante de VT I (102 mg) à 97% de pureté relative CLHP (déterminée à 220 nm) a été obtenue. L'acide eucomique étant un composé minoritaire dans cette fraction, seuls 7 mg à 93,2% de pureté ont été isolés (**Figure III:14**).

Ainsi, en utilisant un système de solvants différent du premier sélectionné, à savoir en remplaçant le butanol par de l'éthanol, la sélectivité du système a changé de façon à ce que même une élution en mode isocratique permette une bonne séparation des composés d'intérêt. Le calcul des Kd par CLHP et du coefficient de résolution a été une étape essentielle pour obtenir une bonne purification de l'acide eucomique et du vandatérosie I.

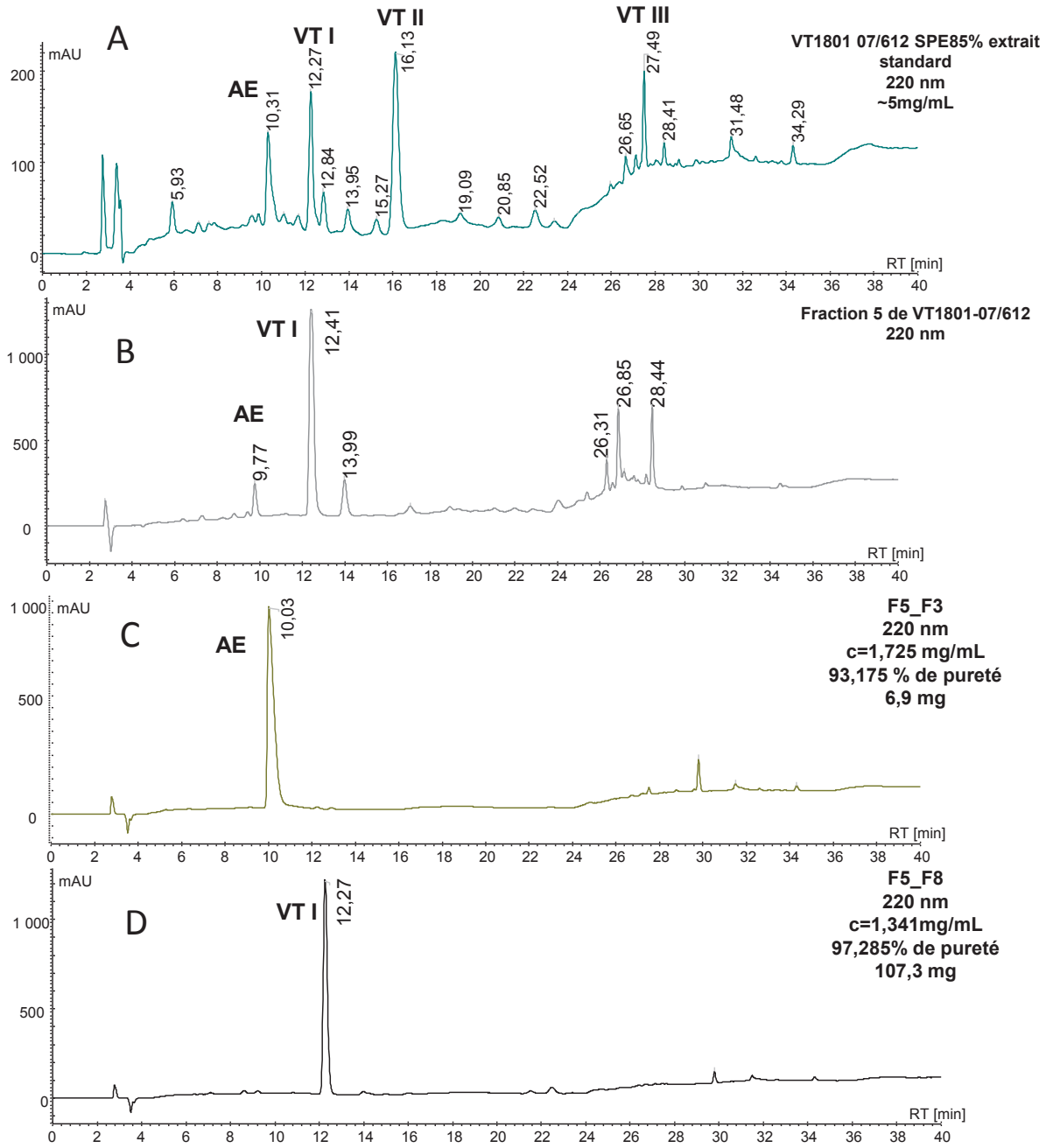


Figure III:14: Analyse CLHP à 220 nm des fractions obtenues à l'issu de la CPC de la fraction 5. **A**: extrait standard VT1801-07/612 ; **B**: Fraction 5 obtenue à l'issue de la CPC de l'extrait standard ; **C**: Acide eucomique (AE) obtenu à 93,2% de pureté relative à 220 nm ; **D**: Vandatéroside I (VT I) obtenu à 97,3% de pureté relative à 220 nm. Phase stationnaire : Nucleodur C18 250 x 4,6 mm i.d. 5 µm. Phase mobile eau+0,1%A.F. (A) et MeOH +0,1% A.F. (B) Gradient d'élution (temps : %B) : 0 min, 25% ; 7-12 min, 40% ; 15-20 min, 45% ; 28-30 min, 90% ; 34-37 min, 100% ; 40 min, 25%.

d. Purification du vandatéroside II de la Fraction 6

La **fraction 6** contenant le VT II a été obtenue avec un rendement massique important (943 mg). Même si la pureté relative du VT II atteignait déjà plus de 76%, l'objectif poursuivi a été de l'améliorer afin d'atteindre plus de 90%. Nous avons suivi la même démarche que précédemment en testant le partage des composés dans différents systèmes de solvant sur CCM. Cette technique est très couramment utilisée en CPC pour obtenir un aperçu rapide du comportement des composés vis-à-vis des deux phases et ainsi sélectionner un système de solvant adéquat. Au vu des profils CCM, un mélange contenant 25% de BuOH semblait intéressant. Cependant, nous avons vu lors du fractionnement de la fraction 4 qu'utiliser le même système qui a déjà servi pour le fractionnement de l'extrait de départ, ne permet pas de changer la sélectivité, mais seulement la polarité. Nous avons donc remplacé le butanol par de l'isopropanol (iPrOH).

En plus du VT II, la **fraction 6** contient également minoritairement le VT I ainsi que d'autres composés non identifiés (**Figure III:15**). L'objectif de cette purification a été de les éliminer pour augmenter la pureté du VT II. Sur la base du test de partage sur CCM, nous avons sélectionné un système de solvant contenant **AcOEt-iPrOH-eau** dans les proportions **30/20/50** v/v/v. Les coefficients de partage (en mode ascendant) ont également été calculés par CLHP afin d'estimer la séparation des différents solutés dans le mélange (**Tableau III:12**).

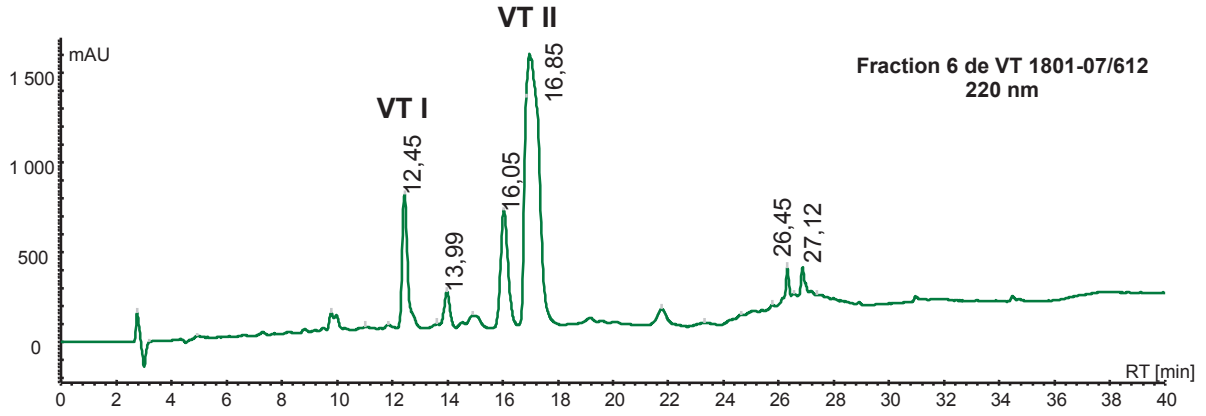


Figure III:15:. Chromatogramme CLHP à 220 nm de la Fraction 6. Phase stationnaire : Nucleodur C18 250 x 4,6 mm i.d. 5 µm. Phase mobile eau+0,1%A.F. (A) et MeOH +0,1% A.F. (B) Gradient d'élution (temps : %B) : 0 min, 25% ; 7-12 min, 40% ; 15-20 min, 45% ; 28-30 min, 90% ; 34-37 min, 100% ; 40 min, 25%.

En utilisant ce système de solvant en mode isocratique, certains composés risquent de co-éluer car leur Kd sont trop proches. Nous avons tout de même décidé d'injecter une première fois la totalité de la Fraction 6 afin d'observer si un début de séparation peut

éventuellement être observée. Ce premier passage permettra en théorie d'éliminer déjà certains composés indésirables, présents dans la fraction injectée. Une fois l'équilibre du système établi avec le volume de phase stationnaire à 101 mL avec une pression de 23 bars, 880 mg de la **fraction 6** ont donc été injectés (**Figure III:16**).

Tableau III:12: Les coefficients de partage des différents composés contenus dans la fraction 6, calculés en mode ascendant (phase supérieure = phase mobile)

Temps de rétention (T_R) (min)	Coefficient de partage (Kd) (ASC)	Ordre d'élution
12,45	0,8	1
13,99	1,08	2
16,05	1,3	5
16,85	1,10	3
26,45	1,37	6
27,12	1,19	4

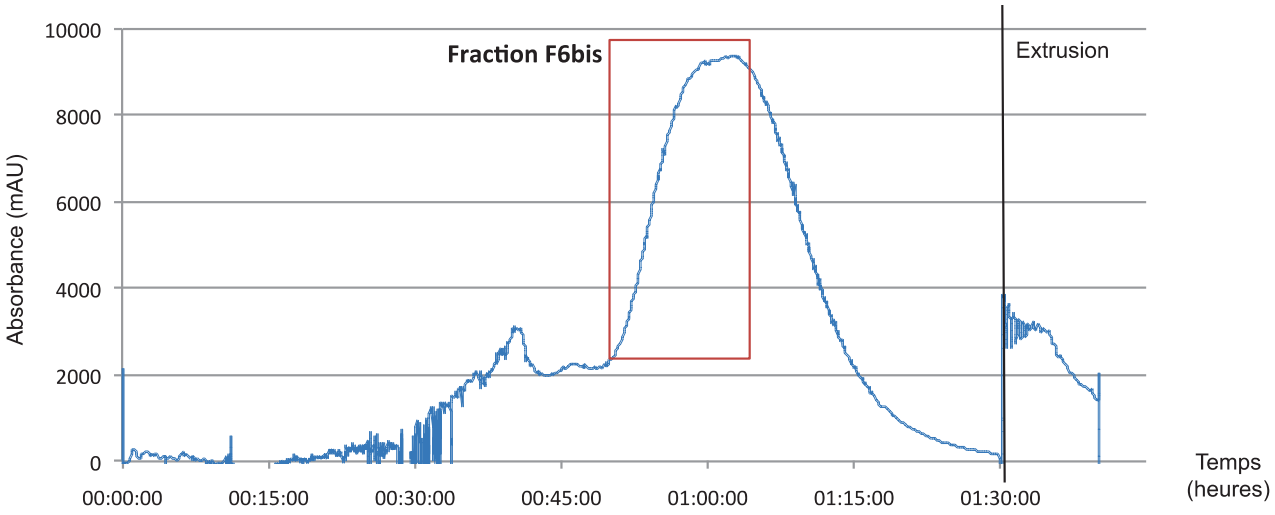


Figure III:16: Chromatogramme CPC à 220 nm de la Fraction 6. Un premier fractionnement a permis d'obtenir la **Fraction 6bis** contenant le vandatéroside II avec quelques impuretés.

Les différentes fractions obtenues ont été analysées par CCM et regroupées en 8 fractions finales. Le regroupement le plus intéressant a été nommé **Fraction F6bis** (508 mg), qui renferme le vandatéroside II débarrassé déjà de certains constituants de la fraction injectée.

Quelque soit le système de solvant testé, le VT II et un composé élué à 13,99 min (**Figure III:15**) ont des coefficients de partage très proches. Dans le système choisi (AcOEt-iPrOH-eau, 30/20/50 v/v/v), le VT II a un Kd de 1,10 et l'autre composé un Kd de 1,08. Il semblerait que ces deux solutés sont structurellement très proches et ont un comportement est similaire quelque soit la nature des phases stationnaire et mobile. Afin de contourner ce problème, le « multi dual mode » a été développé [Delannay E. *et al*. 2006]. Ce mode d'élution consiste à inverser les phases stationnaire et mobile lorsque les pics en mélange commencent à sortir. Ainsi, à chaque changement de sens, le composé d'intérêt est purifié et débarrassé petit à petit de son impureté. Ce mode n'est possible qu'en CPC, car les deux phases, mobile et stationnaire, sont toutes deux liquides.

Nous avons injecté 485 mg de la **fraction F6bis** en utilisant le « dual mode » et en gardant le même système de solvant que précédemment mais en inversant les deux phases et en démarrant l'élution en mode descendant (phase inférieure = phase mobile). Ces conditions nous ont permis de changer l'ordre d'élution des impuretés restantes, plus rapidement (**Figure III:17**). L'équilibre a été atteint à 103 mL (60,5% de rétention) de phase stationnaire avec une pression de 23 bars.

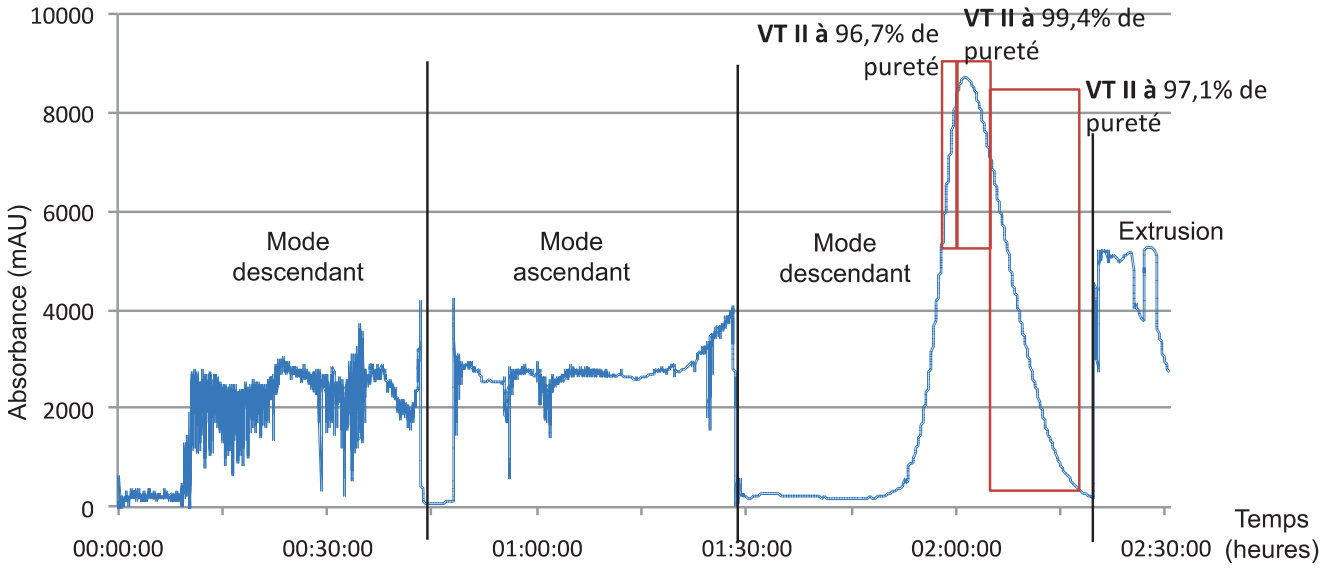


Figure III:17: Chromatogramme CPC à 220 nm de la Fraction 6bis. Dual mode : 1ère élution en mode DSC, changement de phases à 43' 15'' et 2ème élution en mode ASC, puis changement à nouveau en à 1h 27' 58'' et 3ème élution mode DSC jusqu'à l'élution complète du VT II. Extrusion après 2h20'.

Un seul « aller-retour » a été nécessaire pour purifier 142,9 mg de vandatéroside II à 99,4% de pureté relative à 220 nm. Deux autres fractions à 96,7% (81,3 mg) et à 97,1% (161 mg) ont été également obtenues (**Figure III:18**).

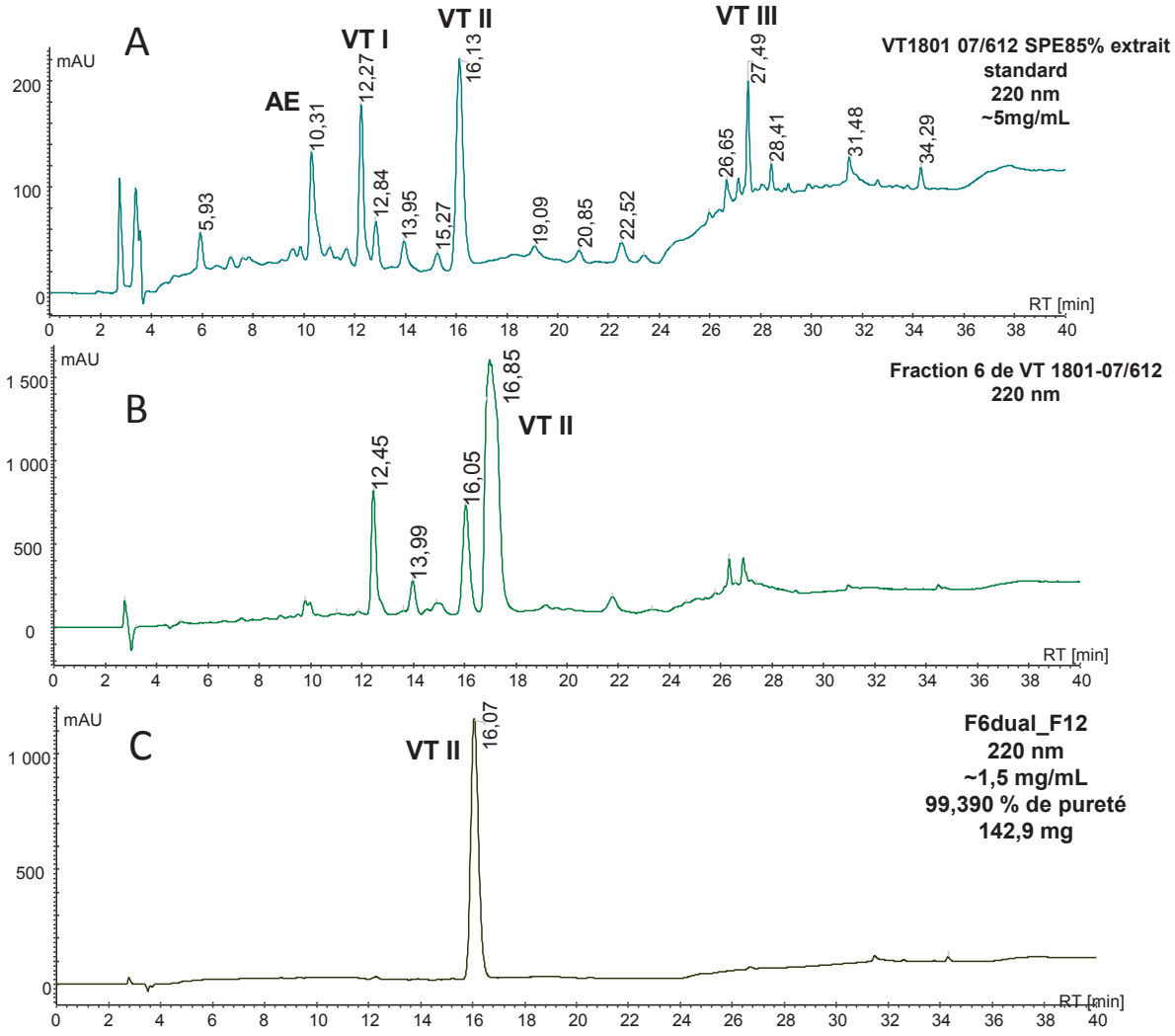


Figure III:18: Analyse CLHP à 220 nm des fractions obtenues à l'issue de la CPC de la Fraction 6bis. A: extrait standard VT1801-07/612 ; **B**: Fraction 6 obtenue à l'issue de la CPC de l'extrait standard ; **C**: Vandatéroside II obtenu à 99,4% de pureté relative à 220 nm après une séparation CPC en dual mode. Phase stationnaire : Nucleodur C18 250 x 4,6 mm i.d. 5 µm. Phase mobile eau+0,1%A.F. (A) et MeOH +0,1% A.F. (B) Gradient d'élution (temps : %B) : 0 min, 25% ; 7-12 min, 40% ; 15-20 min, 45% ; 28-30 min, 90% ; 34-37 min, 100% ; 40 min, 25%.

C. IV. Analyse des composés purifiés par HPLC-ESI-HRMS/MS

L'isolement des métabolites recherchés a été guidé par leur rapport frontal sur CCM et leur temps de rétention en CLHP. Afin de vérifier leur identité, nous avons analysé l'ensemble des fractions finales purifiées par la méthode de déréplication par HPLC-ESI-HRMS/MS (cf chapitre II, pages 64-69).

Le premier composé isolé à partir de la fraction 4 a été élué dans la zone correspondante de l'acide eucomique (TR = 0,85 ± 1,5 min) et son spectre de masse révélait l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ *m/z* = 241,07, puis les fragments de cet ion correspondaient

à ceux recherchés par notre méthode: 205,04; 161,06; 133,07; 107,05 (avec l'énergie de collision de 5 eV).

L'analyse de la deuxième fraction purifiée à partir de la fraction 4 a confirmé qu'il s'agissait bien du vandatéroside III (TR = 27,51 min sur la **Figure III:11_D**) isolé en mélange, majoritairement avec un autre composé. En effet, l'ion pseudomoléculaire correspond à celui recherché par la méthode de déréplication $[M+NH_4]^+$ *m/z* = 1086,38 et les fragments d'ion: 293,10; 107,05 (avec l'énergie de collision de 15 eV). Nous avons obtenu également la formule brute de l'autre composé présent dans le mélange (TR = 27,12 min sur la **Figure III:11_D**), calculée pour $C_{39}H_{44}O_{18}$ ($[M+Na]^+$ *m/z* = 800,2529, err. -0,19 ppm). La différence entre les deux formules brutes est de 13 carbones, 16 hydrogènes et 6 oxygènes ($C_{13}H_{16}O_6$) qui pourrait représenter une perte d'une unité hydroxyoxybenzyle-glucose. Il pourrait donc s'agir également d'un ester d'acide cinnamique, comme le VT III. Une similarité structurale expliquerait la co-élution de ces deux composés dans une seule fraction CPC et leurs temps de rétention proches en CLHP.

Le composé purifié à partir de la fraction 5 correspondait à tous les paramètres de la méthode de déréplication pour confirmer son identité comme le VT I (TR = 1,16 $\pm$ 1,5 min; $[M+NH_4]^+$ *m/z* = 526,19 $\rightarrow$ 107,05; 8 eV). Il en était de même pour le composé isolé à partir de la fraction 6, puis 6bis, confirmant l'identité du VT II (TR = 1,74 $\pm$ 1,5 min; $[M+NH_4]^+$ *m/z* = 794,29 $\rightarrow$ 107,05; 12 eV).

C. V. Récapitulatif des expérimentations

Nous avons effectué une purification des marqueurs de *Vanda teres* par CPC en plusieurs étapes. Afin de les résumer de façon plus claire, nous les avons résumées sur la **Figure III:19**.

C. VI. Bilan

L'objectif de cette étude était de purifier plusieurs centaines de milligrammes des marqueurs de *Vanda teres*, à savoir l'acide eucomique et les vandatérosides I à III. Pour cela, nous avons opté pour l'usage de la chromatographie de partage centrifuge. De nombreux travaux [Ito Y. 2005 et Foucault A. P. *et al*. 2008] démontrent en effet l'intérêt de cette technique pour la séparation des substances naturelles à l'échelle préparative à partir d'extraits végétaux de composition complexe. La sélection du système de solvant adapté à

une problématique donnée est aujourd'hui facilitée par des recherches bibliographiques car de nombreuses classes chimiques de produits naturels ont déjà été purifiées avec succès grâce à la CPC.

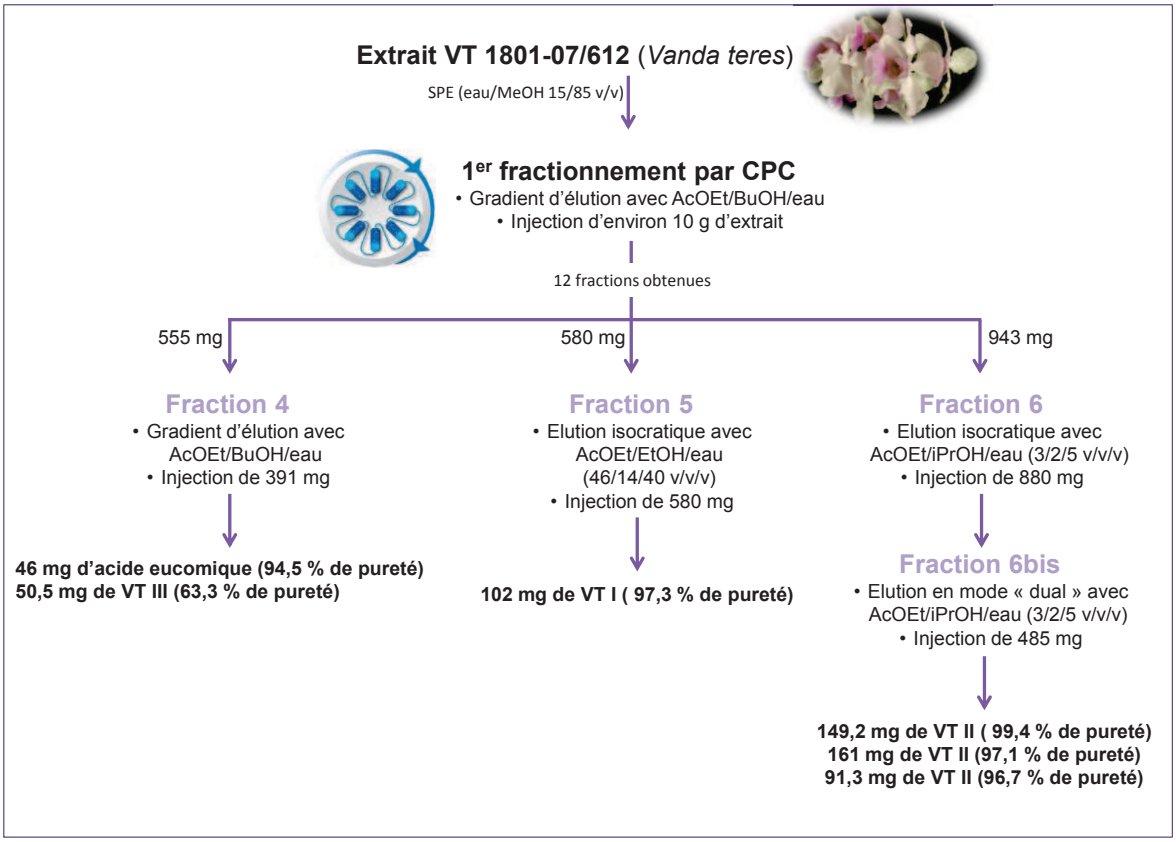


Figure III:19: Résumé du fractionnement de l'extrait VT1801-07/612 par CPC en plusieurs étapes clé.

Dans notre cas, aucun dérivé d'hydroxybenzyles malates n'a jamais été travaillé auparavant, ce qui a limité les informations trouvées dans la littérature scientifique. Les vandatérosides étant des hétérosides, un choix d'un système plutôt aqueux semblait être le premier repère. Les systèmes de solvant de la famille ARIZONA balayant déjà une gamme de polarité importante, ils peuvent convenir à la purification de la plupart des substances naturelles. Cependant, nous avons vu que même le système le plus polaire, AcOEt-eau 50/50 (v/v), n'était pas suffisamment sélectif pour séparer l'ensemble des composés contenus dans un extrait complexe, tel que l'extrait VT1801-07/612 préfractionné par SPE Notre choix s'est donc tourné vers un système étendu d'ARIZONA, en rajoutant le butanol, qui a permis de modifier la sélectivité et séparer ainsi les constituants, même très polaires, présents dans l'extrait de départ.

L'utilisation d'un gradient d'élution en chromatographie de partage centrifuge est encore peu fréquente. Nous avons démontré son intérêt pour fractionner un extrait complexe en séparant les composés de polarité croissante, en enrichissant nos composés d'intérêt dans des fractions éluées par un système intermédiaire. Le gradient a permis un pré-fractionnement et chaque fraction a été re-purifiée afin d'augmenter la pureté des constituants recherchés.

En général, la chromatographie de partage centrifuge est une technique complémentaire à d'autres techniques chromatographiques, préparatives ou non. La purification des substances naturelles présentes dans un extrait de composition complexe implique souvent d'avoir recours à la flash-chromatographie, chromatographie d'exclusion, chromatographie SPE, CLHP…, à la fois en amont et en aval de la CPC, pour augmenter la pureté des composés d'intérêt. Dans notre cas, nous avons réussi à purifier des composés à haute valeur ajoutée en utilisant uniquement la SPE et la CPC, et en obtenant un minimum de 90% de pureté (**Tableau III:13**). Seul le vandatéroside III n'a pas atteint ce degré de pureté, ce qui démontre l'importance des tests de partage et du choix d'un système de solvants adapté. L'élargissement de l'évaluation biologique des composés originaux présents dans les parties aériennes de *Vanda teres* à d'autres cibles, peut donc désormais être planifié car nous avons atteint notre objectif de départ, à savoir la purification de plusieurs dizaines, voire centaines, de mg de ses marqueurs (**Tableau III:14**).

Certains tests de partage ont été réalisés sur CCM. Cette approche est la première et la plus répandue. Elle permet de donner un aperçu rapide du choix du système de solvants, mais avec le développement des techniques chromatographiques plus performantes, comme la CLHP, les deux sont complémentaires. L'avantage de la CLHP est qu'elle permet un calcul précis des coefficients de partage des constituants recherchés et ainsi prédire leur ordre d'élution ainsi que le temps de rétention et la résolution entre deux composés proches. Nous avons pu observer l'importance des Kd et l'exactitude des prédictions avec les fractionnements CPC des fractions 5 et 6.

Charlotte Simmler a déterminé les teneurs de ces marqueurs dans un extrait standard de *V. teres* (par dosage CLHP). Nous avons donc pu estimer des quantités attendues des composés purifiés, sur 10 g d'extrait injectés en CPC (**Tableau III:15**). Selon ses données, nous n'avons pas purifié la totalité de ces marqueurs à partir de l'extrait standard. Cependant, Charlotte Simmler a étudié deux lots de *Vanda teres* différents et il n'est pas précisé dans son mémoire de thèse, dans quel lot de matière végétale ces quantités ont été évaluées. La teneur en ces différents marqueurs pouvant varier d'un lot à

l'autre, nous ne pouvons pas calculer avec certitude l'efficacité de cette purification à partir de 10 g d'extrait. Un dosage par CLHP des composés d'intérêt dans le lot d'extrait utilisé aurait été pertinent.

Tableau III:13: Récapitulatif des puretés relatives CLHP (déterminées à 220 nm) des composés d'intérêt suite au fractionnement de l'extrait VT1801-07/612 par multi-CPC.

	Acide eucomique (% CLHP à 220 nm)	Vandatéroside I (% CLHP à 220 nm)	Vandatéroside II (% CLHP à 220 nm)	Vandatéroside III (% CLHP à 220 nm)
VT1801-07/612	7,1	8,7	20,1	9,1
Fraction 4	20,4	3,1	-	14,1
Fraction 5	4,2	53,2	-	-
Fraction 6	-	2,1	76,1	-
Fractions finales	94,5	97,3	99,4	63,3

Tableau III:14: Récapitulatif des quantités des marqueurs de *Vanda teres* obtenus suite au fractionnement de l'extrait VT1801-07/612 par multi-CPC.

	Acide eucomique	Vandatéroside I	Vandatéroside II	Vandatéroside III
Quantités purifiées (n° de fraction; pureté CLHP à 220 nm)	**46 mg** (F4; 94,5%) **7 mg** (F5; 93,2%)	**102 mg** (F5; 97,3%)	**142,9 mg** (F6bis; 99,4%) **161 mg** (F6bis; 97,1%) **81,3 mg** (F6bis; 96,7%)	**50,5 mg** (F4; 63,3 %)

Tableau III:15: Teneur en métabolites dans l'extrait standard de *V. teres* et les quantités attendues à partir de 10g d'extrait injecté en CPC.

	Acide eucomique	Vandatéroside I	Vandatéroside II	Vandatéroside III
Teneur dans l'extrait standard (% masse / masse d'extrait)	**6,1 %**	**6,7 %**	**14,1 %**	**2,6 %**
Quantité de composé purifié attendue à partir de 10 g d'extrait	610 mg	670 mg	1,41 g	260 mg

Dans cette étude, nous avons pu confirmer les multiples avantages de la CPC. La première est incontestablement la **capacité de charge**. En effet, nous avons pu injecter plus de 10 g d'extrait en seulement deux fois en utilisant une colonne de 250 mL. Ce qui nous a permis de purifier des dizaines à centaines de milligrammes de composés. Le deuxième avantage est le **coût** de cette technique, car nous avons utilisé des solvants de qualité technique et non analytique. De plus, le logiciel Armen permet de calculer le volume exact de chaque solvant nécessaire pour l'élution, et évite ainsi tout gaspillage dans la préparation des phases. Le vandatéroside II a été finalement purifié avec une approche originale, le

« dual-mode », ce qui n'est possible qu'en CPC, car les deux phases, stationnaire et mobile, sont liquides.

Cette étude illustre l'intérêt de la CPC appliquée à un extrait naturel contenant des produits naturels à haute valeur ajoutée. L'élution en mode gradient et un fractionnement par plusieurs étapes de CPC successives pourraient devenir un outil de routine dans le domaine de purification de substances naturelles à l'échelle préparative.

Nos résultats feront l'objet d'une publication (en cours de rédaction) qui sera soumise à "Journal of chromatography A".

Chapitre III
Partie II: Etudes qualitatives et quantitatives de *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. et *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl.

A. Introduction

Les études phytochimiques et biologiques de *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl. et de *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. ont été réalisées dans le cadre des travaux de doctorat de Charlotte Simmler dans notre laboratoire d'accueil. Les extraits de ces deux orchidées sont incorporés dans une gamme de soins cosmétiques anti-âge. En effet, l'activité de leurs marqueurs biologiques a été évaluée sur la prévention du vieillissement cutané. Dans toute entreprise valorisant des ressources naturelles, il est important de standardiser la teneur des molécules à haute valeur ajoutée dans différents lots de matières premières végétales. Depuis la création de l'Orchidarium, toutes les recherches fondamentales ont été menées sur des lots de plantes adultes récoltées au stade de la floraison. Une hypothèse a été émise qu'en période de floraison, la plante met en œuvre tout son métabolisme pour protéger sa fleur, l'organe reproducteur nécessaire à la survie d'une espèce. Ainsi la biosynthèse de ses métabolites secondaires est déclenchée. Par ailleurs, leur concentration peut être augmentée pour faire face aux conditions environnementales et à d'éventuels stress bio- ou abiotiques.

Dans l'objectif de bénéficier des matières premières de qualité constante et reproductible, non seulement pour une valorisation industrielle mais également pour la recherche fondamentale, ce travail consiste à vérifier cette hypothèse et à comparer différents échantillons en fonction de leur biotope, de leur période de prélèvement, de leur stade végétatif et de leur âge. Nous avons étudié *Vanda coerulea* et *V. teres* d'abord de façon qualitative pour confirmer simplement la présence de tous leurs métabolites identifiés précédemment, puis quantitative pour évaluer leur teneur en fonction de ces différents facteurs de variabilité définis.

A. I. Présentation des espèces étudiées

a. *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl.

Originaire d'Himalaya, cette orchidée a une distribution géographique qui s'étend dans plusieurs régions de l'Asie tropicale. On la trouve naturellement dans les régions indiennes (Assam, Arunachal Pradesh, Meghalaya, Nagaland), au Népal, en Birmanie, au Nord de la Thaïlande, dans le Sud de la Chine (Yunnan), et parfois au Laos, au Bhoutan et au Vietnam. Son biotope naturel correspond à des forêts à feuilles persistantes, situées entre 900 et 1500 m d'altitude. En culture, c'est une des espèces favorites des horticulteurs, car, grâce à son adaptation à des basses températures nocturnes, elle peut être facilement

cultivée en régions tropicales et subtropicales. Dans des conditions optimales, elle peut fleurir 4 à 5 fois par an. Le support utilisé en horticulture est des paniers suspendus et le substrat est constitué de copeaux de bois [http://www.kew.org/plants-fungi/Vanda-coerulea.htm].

V. coerulea est une espèce épiphyte à croissance monopodiale avec des tiges ligneuses de 1 à 1,5 cm de diamètre, pouvant atteindre 50 cm de haut. Ses feuilles sont plates, engainantes et alternes. Longues de 15-18 cm et larges de 1,7-2 cm, elles sont disposées en deux rangées opposées. L'inflorescence peut atteindre 35 cm de long portant des fleurs d'une taille de 4-5 cm, bleues pâles à pourpres avec une mosaïque de ces couleurs plus foncées. Cette espèce est populairement connue sous le nom "Vanda bleue", en raison de la couleur de ses fleurs (**Figure III:20**) [Nanakorn W. *et al.* 2008 et http://www.kew.org/plants-fungi/Vanda-coerulea.htm].



Figure III:20: *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl. 1: source Warner R. "Select Orchidaceous plants", first series (1862-1865). 2: (http://eol.org).

b. *Vanda teres* (Roxb.) Lindl.

Voir Partie I de ce Chapitre III.

A. II. Métabolites d'intérêt

Dans cette étude, nous avons recherché à quantifier les cinq stilbénoïdes, marqueurs phytochimiques de *Vanda coerulea,* et les vandatérosides, marqueurs phytochimiques de

Vanda teres, ainsi que l'acide eucomique, leur métabolite commun (**Figure III:21**), afin de suivre la variation de leurs teneurs en fonction des différents facteurs définis.

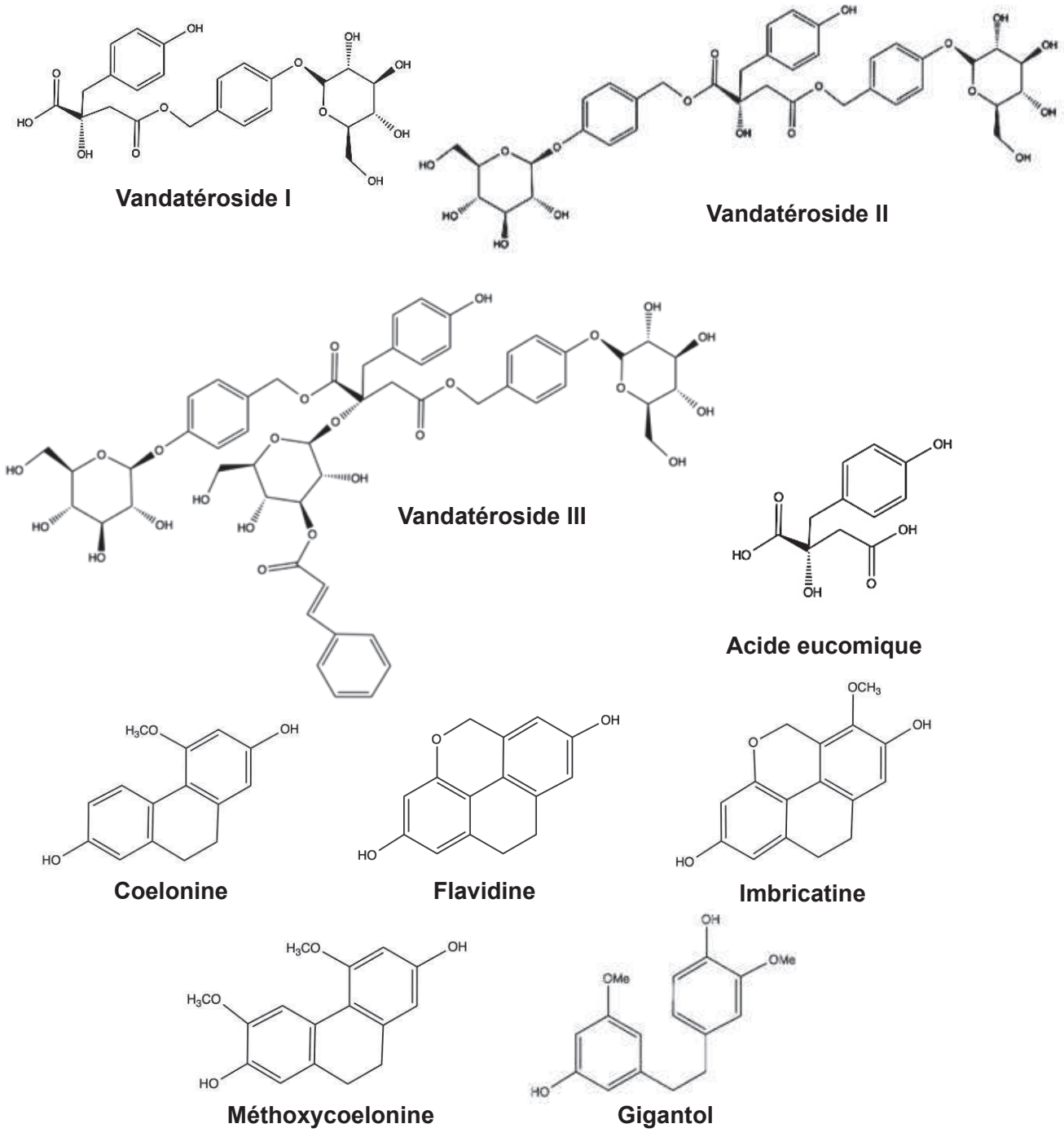


Figure III:21: Récapitulatif des marqueurs phytochimiques et biologiques d'intérêt dans cette étude.

A. III. Définition des objectifs de cette étude

En comparant les concentrations des métabolites dans les différents échantillons de ces deux orchidées, ces travaux pourront nous apporter des éléments de discussion en fonction des objectifs suivants que nous nous sommes fixés:

- **Observation** de la variation des teneurs en marqueurs de *Vanda coerulea* et *Vanda teres* en fonction du stade végétatif, de leur biotope et de la période de prélèvement;
- **Confirmation** de l'hypothèse que les métabolites sont les plus concentrés au moment de la floraison;
- **Optimisation** des périodes de récolte des matières premières déjà valorisées.

A. IV. Echantillons prélevés en fonction des hypothèses posées

Grâce au réseau de partenaires impliqués dans l'Orchidarium, nous avons eu la possibilité d'étudier des échantillons de *Vanda coerulea* provenant de trois biotopes différents:

- **Milieu artificiel (serre)** à Genève (Suisse)

Dans ce milieu, nous avons prélevé trois types d'échantillons (**Figure III:22**)

- spécimens en floraison
- spécimens sans fleurs
- spécimens présentant un bouton floral (floraison proche)



Figure III:22: Trois stades végétatifs de *Vanda coerulea* étudiés. A: Bouton floral; **B:** Spécimen sans fleurs; **C:** Spécimen en floraison (photographies personnelles).

Nous avons effectué ce prélèvement à trois périodes différentes de l'année (février, juillet et octobre 2012). Cette stratégie devrait nous permettre d'observer les variations des teneurs des cinq stilbénoïdes et de l'acide eucomique, de confirmer l'hypothèse qu'ils sont les plus concentrés au moment de la floraison, mais également de vérifier la composition phytochimique de *Vanda coerulea* cultivée dans un milieu artificiel.

- **Climat naturel, espèces cultivées** à Chiang Mai (Thaïlande)

Nous avons prélevé également trois types d'échantillons dans ce milieu (**Figure III:23**):

- spécimens en floraison
- spécimens sans fleurs
- spécimens âgés de moins d'un an

Cette stratégie devrait nous permettre d'observer les variations des teneurs des métabolites d'intérêt en fonction du stade végétatif. L'étude de la composition chimique de jeunes spécimens a pour but d'optimiser l'approvisionnement des matières premières, car pour l'instant, seuls les spécimens adultes (3-5 ans) ont été étudiés.



Figure III:23: Culture de *Vanda coerulea* dans leur climat naturel en Thaïlande (photographie personnelle).

- **Milieu sauvage** dans la réserve naturelle TianZi (dans le province de Yunnan en Chine) (**Figure III:24**): les orchidées cultivées au départ, sont ré-introduites dans leur environnement naturel lorsqu'elles ont atteint un stade adulte

Trois types d'échantillons ont été prélevés dans la réserve:

- spécimens cultivés au départ (en provenance de Thaïlande) et introduits dans leur milieu naturel depuis 3 ans
- spécimens cultivés au départ (en provenance de Thaïlande) et introduits dans leur milieu naturel depuis moins d'un an
- spécimens sauvages, provenant d'une montagne proche de la réserve (dans les montagnes de Boulang)

Ces observations devront nous donner une indication sur la composition des spécimens vivant dans un milieu sauvage par rapport aux orchidées cultivées et de comparer des spécimens cultivés au départ avec ceux qui poussent à l'état sauvage.



Figure III:24: Réserve naturelle de Tian Zi en Chine (photographies personnelles).

Les échantillons de *Vanda teres* proviennent uniquement de la ferme d'orchidées à Chiang Mai, car leur réintroduction dans la réserve naturelle de TianZi n'a pas donné des résultats satisfaisants. Les températures nocturnes sont trop basses pour y permettre une bonne adaptation de cette espèce. Il en est de même pour la serre à Genève, où quelques spécimens ont été introduits, mais pour le moment, aucun d'entre eux n'a fleuri. Concernant cette orchidée, nous n'avons étudié que deux types d'échantillons (**Figure III:25**):

- des spécimens fleuris
- et des spécimens sans fleurs.

La comparaison de ces deux types de prélèvements nous permettra de comparer les teneurs en ses métabolites principaux en fonction du stade végétatif de *Vanda teres*.



Figure III:25: Culture de *Vanda teres* dans leur climat naturel en Thaïlande (photographies personnelles).

A. V. Stratégie de l'étude qualitative et quantitative adoptée

Nous avons utilisé la même méthode d'analyse pour l'ensemble des échantillons de *V. coerulea* et *V. teres.* Les études qualitatives et quantitatives ont été menées à l'aide de la méthode de déréplication que nous avons développée par HPLC-ESI-HRMS/MS. Dans un premier temps, la présence de tous les marqueurs a été vérifiée et les conditions chromatographiques ont été affinées pour permettre une résolution optimale entre les métabolites d'intérêt à quantifier et les autres composés présents dans les extraits. Puis, les marqueurs de qualité ont été quantifiés à l'aide des courbes de calibration préalablement établies à partir des solutions des témoins correspondants purifiés. La démarche qui nous a amené à comparer différents paramètres définis en fonction de nos objectifs, est décrite dans cette partie du chapitre.

B. Matériel et méthodes

B. I. Matières premières

Pour chacune des deux espèces travaillées, un spécimen d'herbier a été enregistré:

- pour *Vanda coerulea,* un spécimen n° HITBC128192 a été déposé à l'herbier du jardin botanique tropical de Xishuangbanna (XTBG), province de Yunnan, en Chine.
- pour *Vanda teres*: spécimen n°P-th-1004 a été déposé au bureau de quarantaine du département d'agriculture à Bangkok, en Thaïlande.

Les spécimens prélevés pour cette étude ont été authentifiés par le botaniste François Gérard.

B. II. Lieux et conditions des prélèvements

En fonction de leurs biotopes respectifs, les spécimens prélevés proviennent de trois lieux différents:

- **Milieux artificiel (serre):** Les échantillons ont été prélevés dans l'Orchidothèque située à Troinex à côté de Genève, en Suisse (coordonnées GPS E6° 09' N46°10'), à 430 m d'altitude. Elle contient une collection de plus de 2000 spécimens d'orchidées représentant plus de 800 espèces différentes. Les orchidées sont arrosées en fonction des conditions météorologiques extérieures, en été deux fois par jour (matin et soir), dans les périodes printanières quotidiennement et en hiver tous les deux jours. Elles sont cultivées dans des conditions d'humidité et de température contrôlées. Cette dernière est adaptée aux conditions du climat extérieur, de décembre à février, elle est maintenue entre 12-14°C. A partir du mois de mars, la serre a moins besoin d'être chauffée et la température est quasi égale à celle à l'extérieur. C'est également le cas en été, où elle peut dépasser 30°C. Tous les échantillons ont été prélevés en 2012 à trois périodes différentes (février, juillet et octobre). En février, la température a donc été maintenue au minimum à 12°C, de juin à août, la température extérieure minimale enregistrée à Genève était de 11°C la nuit et maximale de 34°C le jour

[http://www.incapable.fr/meteo-suisse-geneva-historique-2012]. En septembre et octobre, elle a été maintenue à environ 18°C dans la serre. L'humidité due à l'arrosage fréquent est d'environ 80% tout au long de l'année.

- **Milieu naturel, espèces cultivées (ferme d'orchidées):** ces spécimens proviennent de Joe's orchid farm à Chiang Mai, en Thaïlande (coordonnées GPS N18° 46', E98° 58'), à 316 m d'altitude. Les espèces y sont cultivées dans des conditions naturelles de climat tropical et arrosées régulièrement pendant la période sèche, sans aucun apport d'engrais. Tous les échantillons ont été prélevés en avril 2012. Janvier était le mois le plus froid de l'année, avec une moyenne journalière basse de 17°C. En mars, la température minimale était de 16°C et maximale de 37°C. En avril, le mois de prélèvement, la température maximale a atteint 40°C. Mars 2012 était le mois le moins humide de l'année avec une moyenne journalière basse de 23%. Le mois d'avril était plus humide entre 30 et 40% [http://weatherspark.com/history/33957/2012/Chiang-Mai-Thailand].

- **Milieu sauvage (réserve naturelle):** les espèces cultivées au départ à la Joe's orchid farm ont été introduites dans la réserve naturelle de 600 ha située dans les montagnes du Bulangshan, à proximité du village Banzhang, dans la province de Yunnan, en Chine (coordonnées GPS E100° 27' N21° 44'), à 1703 m d'altitude. Les orchidées introduites dans cette réserve vivent dans des conditions naturelles de climat et d'humidité. Elles ne sont ni arrosées, ni fertilisées. Tous les spécimens ont été prélevés en avril 2012. En mars 2012, il faisait en moyenne 22,5 °C avec un taux d'humidité relative de 59,3%. En avril, la température moyenne est montée à 25,9°C et l'humidité a baissé à 50% [http://www.tutiempo.net/en/Climate/JINGHONG/04-2012/569590.htm].

Nous avons prélevé de chaque spécimen environ 10 cm de tige portant des feuilles. Aucune plante n'a donc été sacrifiée dans cette étude. Les feuilles ont ensuite été séparées manuellement des tiges que nous avons étudiées par la suite.

A Genève, nous avons prélevés trois types d'échantillons de *Vanda coerulea*:

- Spécimens fleuris, portant une à plusieurs fleurs au stade de la maturation
- Spécimens ayant un ou plusieurs boutons floraux avant leur ouverture donnant des fleurs

- Spécimens ne présentant aucun signe d'une floraison proche apparente (spécimens appelés "sans fleurs")

Nous avons prélevé des lots de 1 à 3 spécimens de chaque type d'échantillons en fonction de la disponibilité des plantes fleuries. Par exemple, en juillet, aucune *Vanda coerulea* n'était au stade de la floraison et cet échantillon n'a donc pas été analysé à cette période.

En Thaïlande, nous avons prélevé seulement des spécimens portant une à plusieurs fleurs (spécimens fleuris) et ceux ne présentant aucun signe apparent d'une floraison proche apparente. Les échantillons fleuris constituent un lot de 4 spécimens et ceux sans fleurs de 10 spécimens.

En Chine, aucun spécimen prélevé n'a fleuri auparavant dans la réserve. Tous les échantillons étaient donc sans fleurs. Un lot de 10 spécimens de chaque échantillon a été analysé.

Les échantillons de *Vanda teres* ont été prélevés sur une haie avec une centaine de spécimens. Nous avons prélevé des tiges des spécimens portant une ou plusieurs fleurs (spécimens fleuris) et des tiges des spécimens ne portant aucune fleur. Les feuilles ont été séparées des tiges et ce sont ces dernières qui ont été étudiées ici. Des lots de 10 spécimens de chaque échantillon ont été analysés.

B. III. Conditions de séchage et broyage

En fonction de la provenance des échantillons, deux modes de séchage ont été employés. Les tiges d'orchidées de Genève ont été découpées et congelées dans notre laboratoire, puis lyophilisées 48 heures à l'aide d'un lyophilisateur (Labonco freezone 2.5). Les échantillons de Chine et de Thaïlande ont été découpées et réparties dans des paniers qui ont été séchées au soleil direct pendant une semaine, dans des conditions naturelles de température et du climat tropical.

Après séchage, les matières végétales (MVS) ont été broyées à l'aide d'un appareillage Retsch (ZM 200). Le broyage s'est fait en deux temps, d'abord grossier à travers un couteau de diamètre moyen (trous ronds de diamètre moyen de 5 mm), puis plus

fin (trous trapézoïdaux de diamètre de 2 mm) pour obtenir une poudre de granulométrie compatible avec une extraction optimale.

B. IV. Extraction solide/liquide

a. Extraction de Vanda coerulea

160 mg de chaque échantillon sous forme de matière première sèche pulvérisée ont été extraits par passages successifs de solvants de polarité croissante afin d'enrichir les extraits en métabolites d'intérêt et d'effectuer une extraction totale. D'abord le dichlorométhane (CH_2Cl_2) (pour enrichir en stilbénoïdes), suivi du méthanol (MeOH) (pour extraire l'acide eucomique). Le rapport masse de plante pulvérisée (g) / volume de solvant (mL) est de 1/15, donc 2,4 mL de solvant pour 160 mg de poudre de plante. Ce protocole a été mis au point par Charlotte Simmler durant sa thèse et est parfaitement reproductible.

La MVS est mise au contact avec le CH_2Cl_2 et macérée pendant une heure, puis le mélange est soniqué dans un bain à ultrasons (Fisher Scientifique FB 15060) pendant 10 minutes. L'extrait est filtré sous vide (Büchner). Le filtrat et le marc sont séparés, puis le dernier est récupéré pour refaire la manipulation une deuxième fois.

Après la deuxième extraction au CH_2Cl_2, le marc est ré-extrait avec le MeOH en suivant la même procédure deux fois. Les deux extraits, dichlorométhanique et méthanolique, sont réunis et évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Chaque échantillon a subi deux extractions indépendantes identiques. Nous avons donc obtenu deux extraits à partir de chaque échantillon afin de vérifier la répétabilité de nos résultats.

b. Extraction de Vanda teres

200 mg de chaque échantillon de *Vanda teres* sous forme de matière première sèche pulvérisée ont été extraits au MeOH afin d'enrichir les extraits en vandatérosides et l'acide eucomique. Le rapport masse de plante pulvérisée (g) / volume de solvant (mL) est de 1/15, donc 3 mL de solvant pour 200 mg de poudre de plante.

Après la deuxième extraction au MeOH, les filtrats sont réunis et évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Chaque échantillon a subi deux extractions indépendantes identiques. Nous avons donc obtenu deux extraits à partir de chaque échantillon afin de vérifier la répétabilité de nos résultats.

B. V. Analyse qualitative et quantitative par HPLC-ESI-HRMS/MS

a. Méthode et logiciel de traitement de données

L'ensemble des analyses a été effectué sur un chromatographe liquide à haute performance 1200 RRLC (Agilent technologies) couplé à un spectromètre de masse 6520 QToF (Agilent technologies).

Pour toutes les analyses, nous avons employé la méthode de déréplication préalablement développée (cf page 64). Ainsi, tous les paramètres de la méthode (phase stationnaire, gradient d'élution, paramètres du spectromètre de masse, liste des masses ciblées etc.) sont identiques.

En premier lieu, une séparation chromatographique des extraits a été effectuée. La méthode de déréplication détecte les pics correspondant aux métabolites recherchés grâce à leur temps de rétention, leurs spectres de masse et MS^2 avec une énergie de collision définie. Si tous les paramètres du métabolite recherché correspondent, la méthode intègre son pic correspondant sur le chromatogramme LC-MS^2 (également MRM) qui est en fait le résultat d'un monitoring des ions ciblés (selected ion monitoring MS^2). Sur ce dernier, la surface intégrée (aire du pic) est obtenue et sa quantité est calculée en fonction des courbes de calibrations établies à partir des témoins purifiés à l'aide du logiciel de traitement Mass Hunter quantanalysis B.05 (Agilent).

Nous avons injecté 1 µL de chaque extrait (1ère extraction suivi de la 2ème extraction du même échantillon) en triplicata précédé d'une solution de blanc (MeOH de qualité CLHP sans extrait). Nous avons ainsi obtenu 6 valeurs pour chaque type d'échantillon et pour chaque métabolite. Les extraits de *Vanda coerulea* ont été injectés à concentration de 15 mg/mL et ceux de *Vanda teres* à 5 mg/mL.

b. Courbes de calibration

Afin de construire les courbes de calibration, nous avons injecté des quantités connues de chaque métabolite purifié à partir de *Vanda coerulea* et *Vanda teres*, disponibles en interne dans notre laboratoire. En fonction des métabolites, les solutions de témoins purifiés ont été préparées aux concentrations de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL et 1,5 mg/mL et différents volumes de chaque solution ont été injectés pour obtenir des points de la courbe allant de 25 à 1500 ng, en fonction de la concentration de chaque métabolite attendue dans les échantillons. Nous avons donc obtenu 9 courbes de calibration avec une régression linéaire supérieure à R^2=0,98.

Les volumes injectés pour obtenir les différents points de la courbe de calibration sont décrits dans les tableaux pour chaque métabolite ci-dessous. Les courbes de calibration obtenues sont représentées sur les figures correspondantes.

1. **Acide eucomique** (Figure III:26 et Tableau III:16)
2. **Coelonine** (Figure III:27 et Tableau III:17)
3. **Flavidine** (Figure III:28 et Tableau III:18)
4. **Imbricatine** (Figure III:29 et Tableau III:19)
5. **Méthoxycoelonine** (Figure III:30 et Tableau III:19)
6. **Gigantol** (Figure III:31 et Tableau III:20)
7. **Vandatéroside I** (Figure III:32 et Tableau III:21)
8. **Vandatéroside II** (Figure III:33 et Tableau III:22)
9. **Vandatéroside III** (Figure III:34 et Tableau III:21)

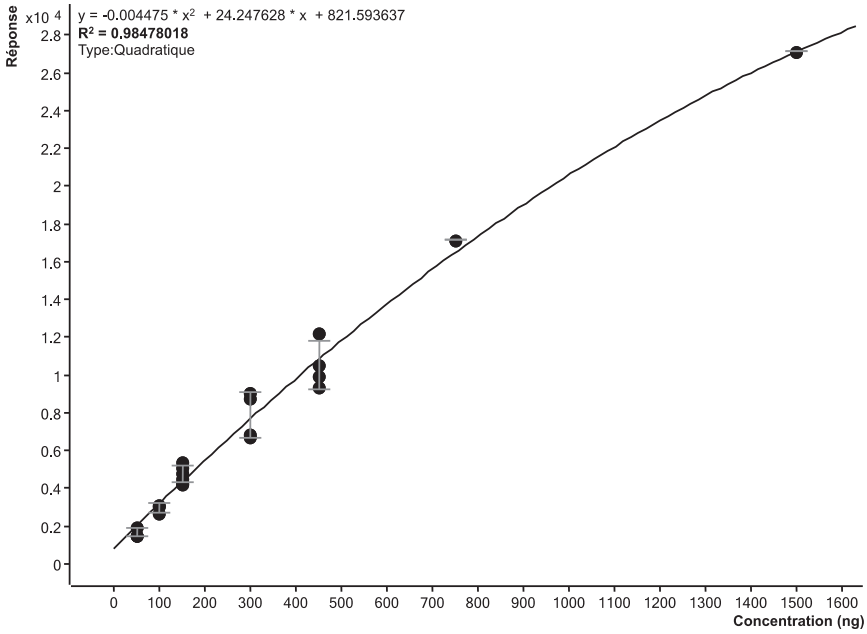


Figure III:26: Courbe de calibration de l'acide eucomique (R^2=0,98478).

Tableau III:16: Liste des injections pour obtenir la courbe de calibration de l'acide eucomique.

Quantité injectée (ng) Point de la courbe	Concentration de la solution de témoin utilisée pour injecter une concentration connue	Volume de la solution injecté (µL)
50	0,5 mg/mL	0,1
100	1 mg/mL	0,1
150	1,5 mg/mL	0,1
300	1 mg/mL	0,3
450	1,5 mg/mL	0,3
750	1,5 mg/mL	0,5
1500	1,5 mg/mL	1

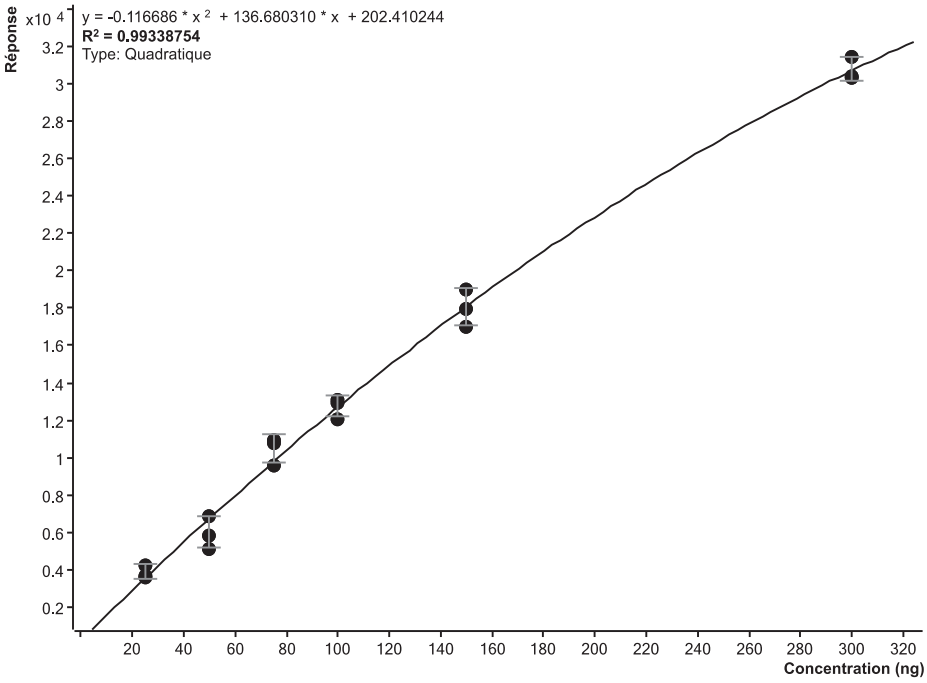


Figure III:27: Courbe de calibration de la coelonine (R^2=0,99339).

Tableau III:17: Liste des injections pour obtenir la courbe de calibration de la coelonine.

Quantité injectée (ng) Point de la courbe	Concentration de la solution de témoin utilisée pour injecter une concentration connue	Volume de la solution injecté (µL)
25	0,25 mg/mL	0,1
50	0,25 mg/mL	0,2
75	0,25 mg/mL	0,3
150	0,5 mg/mL	0,3
200	0,5 mg/mL	0,4
250	0,5 mg/mL	0,5
300	1 mg/mL	0,3
500	1 mg/mL	0,5

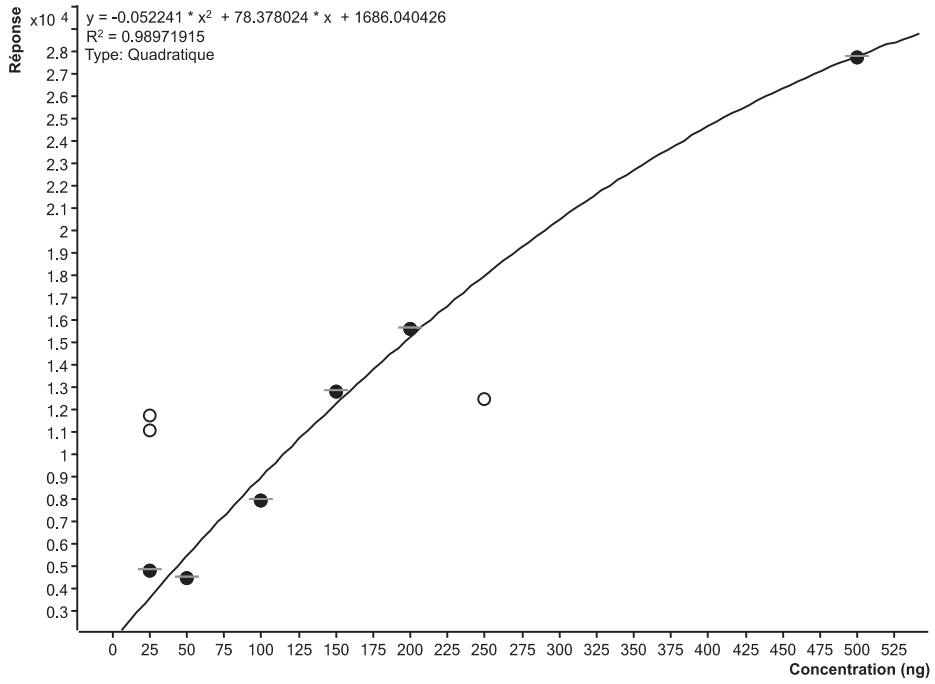


Figure III:28: Courbe de calibration de la flavidine (R^2=0,98972).

Tableau III:18: Liste des injections pour obtenir la courbe de calibration de la flavidine

Quantité injectée (ng) Point de la courbe	Concentration de la solution de témoin utilisée pour injecter une concentration connue	Volume de la solution injecté (µL)
25	0,25 mg/mL	0,1
50	0,5 mg/mL	0,1
100	0,5 mg/mL	0,2
150	0,5 mg/mL	0,3
200	0,5 mg/mL	0,4
500	0,5 mg/mL	1

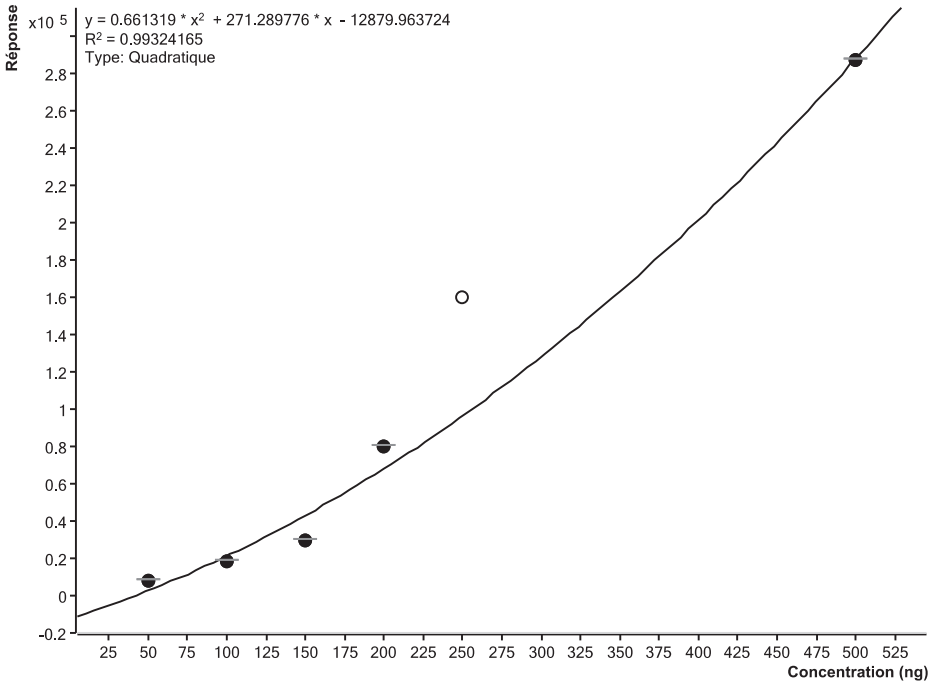


Figure III:29: Courbe de calibration de l'imbricatine (R^2=0,99324).

Tableau III:19: Liste des injections pour obtenir la courbe de calibration de l'imbricatine et de la méthoxycoelonine.

Quantité injectée (ng) Point de la courbe	Concentration de la solution de témoin utilisée pour injecter une concentration connue	Volume de la solution injecté (µL)
50	0,5 mg/mL	0,1
100	0,5 mg/mL	0,2
150	0,5 mg/mL	0,3
200	0,5 mg/mL	0,4
250	0,5 mg/mL	0,5
500	0,5 mg/mL	1

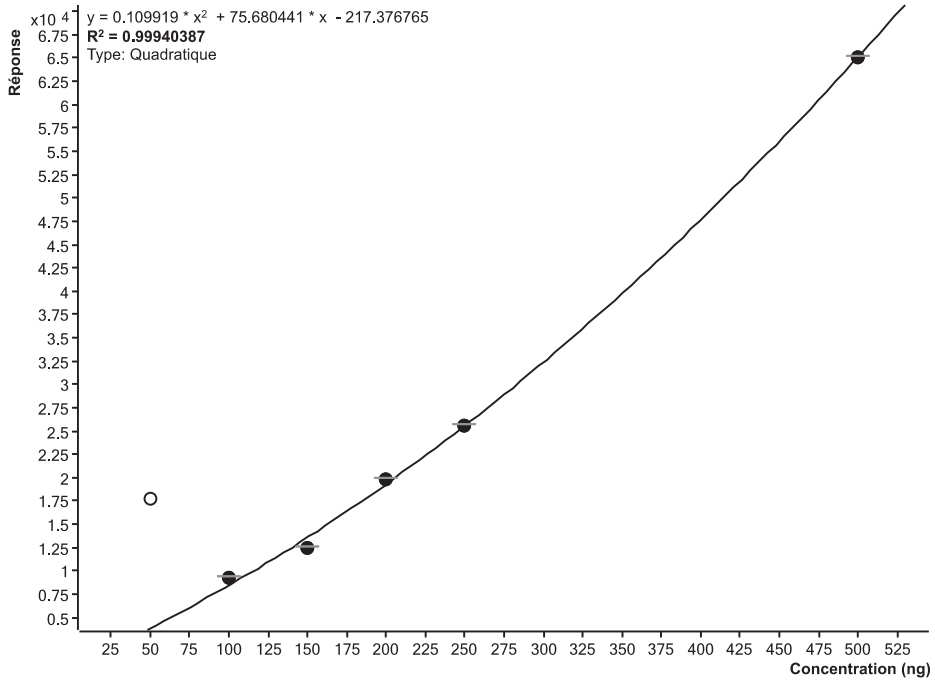


Figure III:30: Courbe de calibration de la méthoxycoelonine (R^2=0,99940).

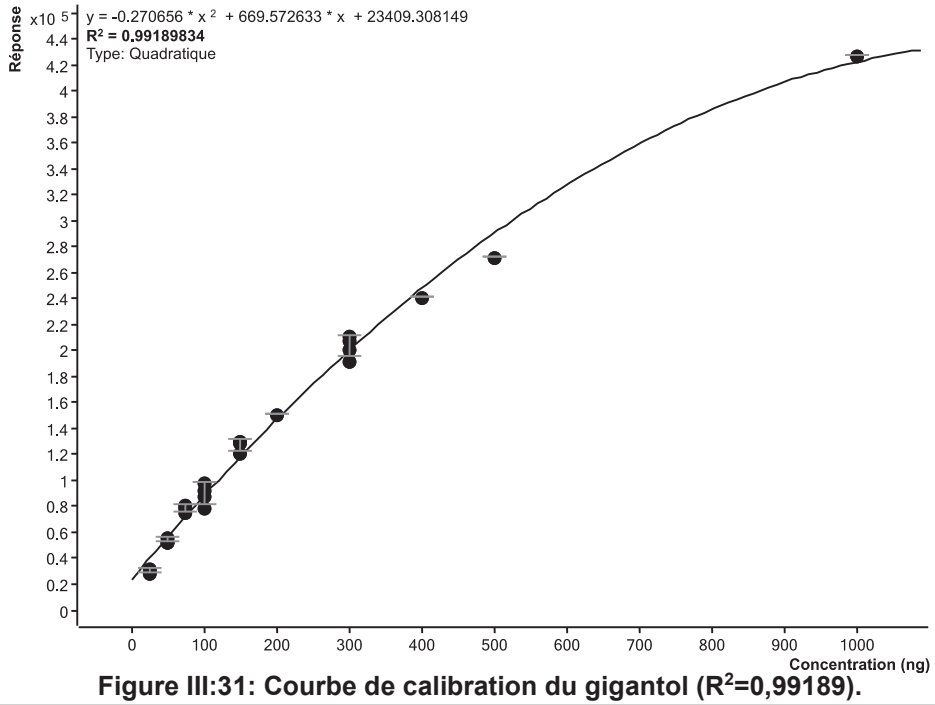


Figure III:31: Courbe de calibration du gigantol (R^2=0,99189).

Tableau III:20: Liste des injections pour obtenir la courbe de calibration du gigantol

Quantité injectée (ng) Point de la courbe	Concentration de la solution de témoin utilisée pour injecter une concentration connue	Volume de la solution injecté (µL)
25	0,25 mg/mL	0,1
50	0,5 mg/mL	0,1
75	0,25 mg/mL	0,3
100	1 mg/mL	0,1
150	0,5 mg/mL	0,3
200	1 mg/mL	0,2
300	1 mg/mL	0,3
400	1 mg/mL	0,4
500	1 mg/mL	0,5
1000	1 mg/mL	1

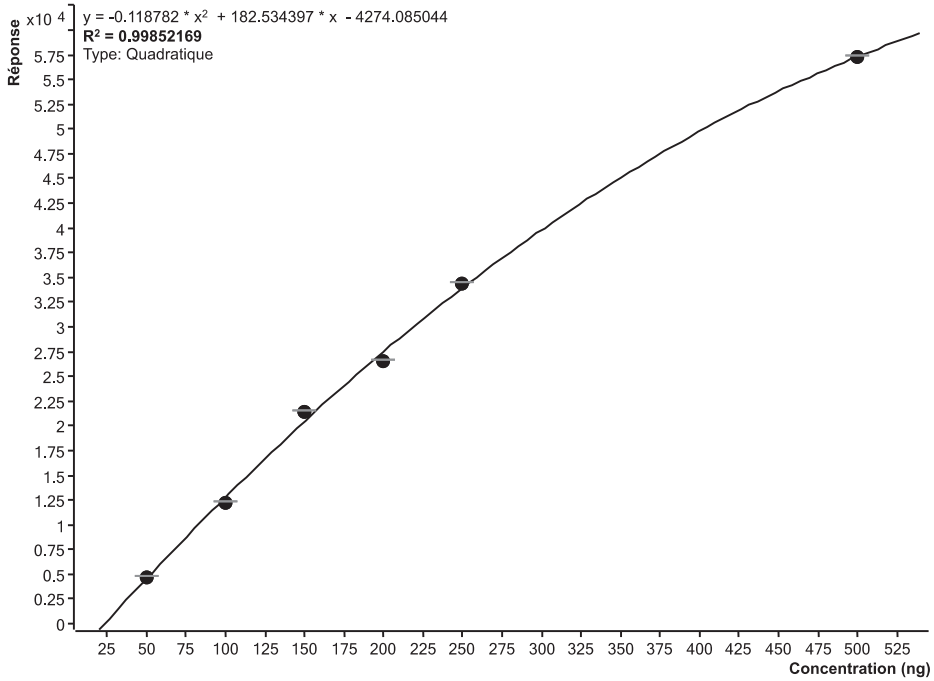


Figure III:32: Courbe de calibration du vandatéroside I (R^2=0,99852).

Tableau III:21: Liste des injections pour obtenir la courbe de calibration du vandatéroside I et III.

Quantité injectée (ng) Point de la courbe	Concentration de la solution de témoin utilisée pour injecter une concentration connue	Volume de la solution injecté (µL)
50	0,5 mg/mL	0,1
100	0,5 mg/mL	0,2
150	0,5 mg/mL	0,3
200	0,5 mg/mL	0,4
250	0,5 mg/mL	0,5
500	0,5 mg/mL	1

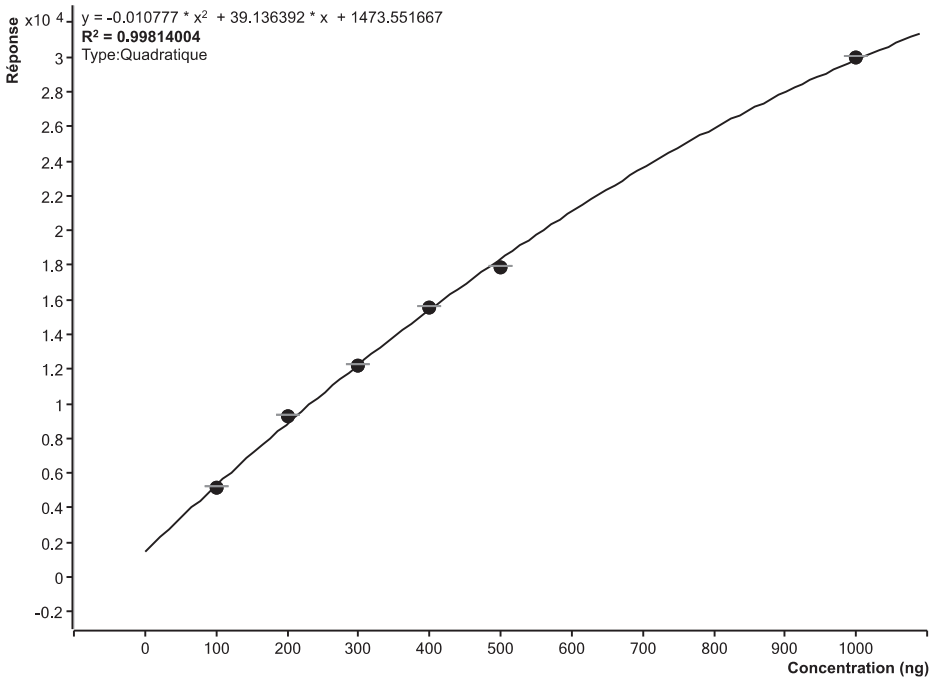


Figure III:33: Courbe de calibration du vandatéroside II (R^2=0,99814).

Tableau III:22: Liste des injections pour obtenir la courbe de calibration du vandatéroside II.

Quantité injectée (ng) Point de la courbe	Concentration de la solution de témoin utilisée pour injecter une concentration connue	Volume de la solution injecté (µL)
100	1 mg/mL	0,1
200	1 mg/mL	0,2
350	1 mg/mL	0,3
400	1 mg/mL	0,4
500	1 mg/mL	0,5
1000	1 mg/mL	1

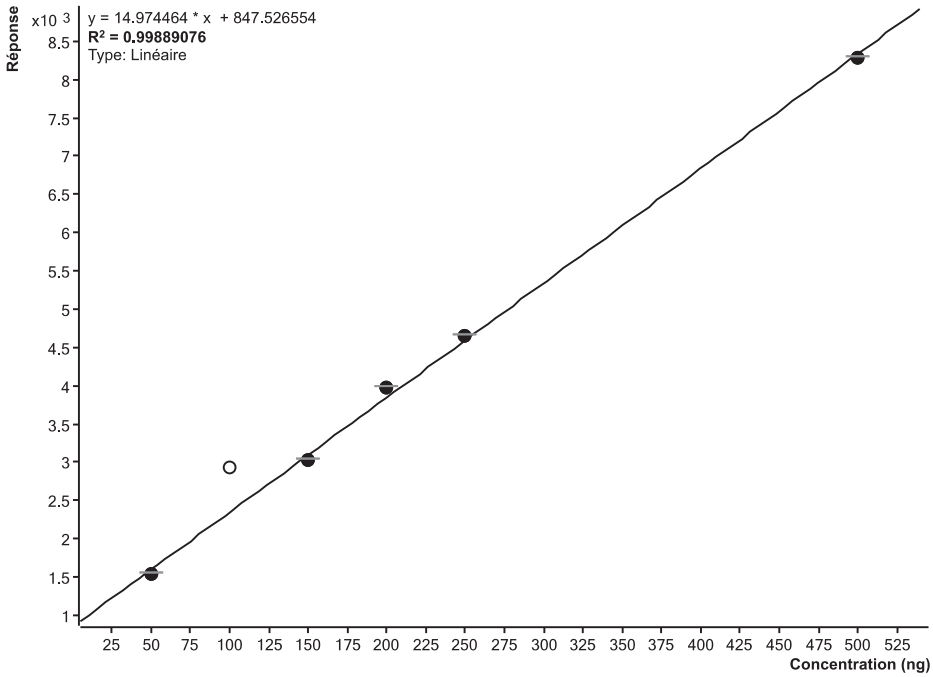


Figure III:34: Courbe de calibration du vandatéroside III (R^2=0,99889).

c. Interprétation des résultats

Les résultats obtenus pour chaque mesure donnent une valeur en nanogrammes (ng) (correspondant à la quantité de chaque métabolite calculée à partir des courbes de calibration correspondantes) contenue dans 1 µL de chaque extrait injecté. Nous obtenons donc une concentration en ng/µL. Nous avons converti ces valeurs en mg/mL en les multipliant par un facteur de 10^{-3}. Cette valeur exprime la quantité de chaque métabolite en mg dans un mL d'une solution d'extrait concentrée à 15 mg/mL pour les échantillons de *V. coerulea* et 5 mg/mL pour ceux de *V. teres*. Elle est donc divisée par 15 ou 5, respectivement, pour obtenir un résultat exprimé en mg de métabolite par mg d'extrait (mg/mg d'extrait). Les résultats seront donc exprimés dans cette unité.

La moyenne des 6 injections du premier et deuxième extrait de chaque type d'échantillon est calculée selon la formule:

$$\bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i$$

c'est-à-dire la somme des valeurs numériques (exprimées en mg/mg d'extrait) divisée par le nombre de ces valeurs numériques (ici 6 valeurs).

Pour chacune de ces valeurs, nous avons également calculé l'écart type à la moyenne selon la formule:

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}$$

d. Limite de quantification (LOQ) et limite de détection (LOD)

Les limites de quantification et de détection ont été fixées à 10 fois et 3 fois le rapport signal/bruit (S/N ratio), respectivement. Si le S/N<10, nous considérons que le métabolite contenu dans l'extrait est non quantifiable.

C. Résultats et discussion

C. I. Courbes de calibration

Toutes les courbes ont été tracées à partir d'au moins 5 points. En spectrométrie de masse, il arrive fréquemment que la réponse du détecteur ne soit pas parfaitement proportionnelle à la concentration de l'analyte cible, sur la gamme de concentration choisie. La courbe obtenue est donc de type quadratique plutôt que linéaire, comme c'est souvent le cas avec une détection UV. Cependant, la spectrométrie de masse est une technique beaucoup plus sensible avec un seuil de détection capable de doser des métabolites d'intérêt même à l'état de traces. De plus, cette sensibilité permet d'économiser des standards ainsi que des échantillons à doser, lorsqu'on en a une quantité limitée. C'est précisément pour ces raisons que nous avons décidé d'utiliser cette technique dans cette étude.

Comme nous pouvons le remarquer, sur certaines courbes, nous avons du éliminer un point afin d'obtenir une courbe avec R^2 le plus proche de 1. Pour une raison inexpliquée, nous avons rencontré le plus de problèmes avec la flavidine, car nous avons du éliminer 3 points pour construire une courbe avec un R^2>0,98.

C. II. Vérification de l'efficacité des extractions

Afin de nous assurer que nous avons extrait la totalité des métabolites présents dans nos échantillons, nous avons procédé à une extraction d'un marc épuisé selon le même protocole. Tous les métabolites dosés ont été en dessous de la limite de quantification fixée (S/N<10). Nous considérons donc que nous avons réalisé une extraction totale des composés ciblés sur l'ensemble des échantillons.

C. III. Comparaison des *Vanda coerulea* provenant du milieu artificiel (serre)

a. Rendements des extractions

Pour s'assurer de la répétabilité des extractions, nous avons extrait le même type d'échantillon deux fois selon le même protocole. Les rendements ont été calculés pour chaque extrait et sont résumés dans le **Tableau III:23**.

Tableau III:23: Rendements moyens des extractions des échantillons de *Vanda coeruela* provenant de la serre à Genève.

Période de prélèvement	Type d'échantillon	Rendement moyen de la 1ère et de la 2ème extraction
Février 2012	Fleurs	9,56%
	Sans fleurs	10,10%
	Bouton floral	8,65%
Juillet 2012	Sans fleurs	8,85%
	Bouton floral	8,38%
Octobre 2012	Fleurs	8,31%
	Sans fleurs	7,74%
	Bouton floral	11,57%

b. Comparaison des teneurs des métabolites d'intérêt

Les résultats obtenus pour chaque type d'échantillon de *Vanda coerulea* prélevé dans la serre à Genève sont résumés sous forme des tableaux. Afin de mieux visualiser les comparaisons des différentes valeurs obtenues, ces données sont représentées par des histogrammes.

Nous avons d'abord comparé les teneurs des métabolites en fonction des stades végétatifs des échantillons prélevés à la même période. En février 2012, nous avons prélevé des lots constitués de 3 spécimens pour chaque type d'échantillon. Nous pouvons observer que globalement tous les métabolites sont les plus concentrés dans les plantes en floraison, sauf pour l'acide eucomique qui est le plus concentré dans les plantes sans fleurs (**Tableau III:24** et **Figure III:35**). Les teneurs de la coelonine sont comparables dans les plantes fleuries et celles avec un bouton floral. La flavidine est non quantifiable dans les échantillons sans fleurs et en boutons. Si nous nous focalisons uniquement sur les métabolites majoritaires considérés comme marqueurs phytochimiques et biologiques de *Vanda coerulea*, à savoir l'imbricatine, la méthoxycoelonine et le gigantol, nous pouvons constater qu'au mois de février, ces trois métabolites sont presque deux fois plus concentrés dans les plantes en floraison que dans celles sans fleurs.

Tableau III:24: Moyenne des teneurs en marqueurs des *Vanda coerulea* prélevées en février 2012 à trois stades végétatifs différents.

	FEVRIER		
	Echantillon		
Métabolite (Moyenne de la teneur en mg/mg d'extrait x10^{-3})	FLEURS	SANS FLEURS	BOUTON FLORAL
ACIDE EUCOMIQUE	12,64 ± 4,84	33,85 ±4,55	21,79 ± 4,71
COELONINE	2,40 ± 0,21	0,85 ± 0,12	2,29 ± 0,25
FLAVIDINE	6,79 ± 1,37	NQ	NQ
IMBRICATINE	10,08 ± 0,73	4,31 ± 0,77	2,96 ± 0,04
METHOXYCOELONINE	10,99 ± 0,60	8,37 ± 0,81	4,48 ± 0,21
GIGANTOL	9,98 ± 1,64	3,15 ± 0,33	8,38 ± 1,50

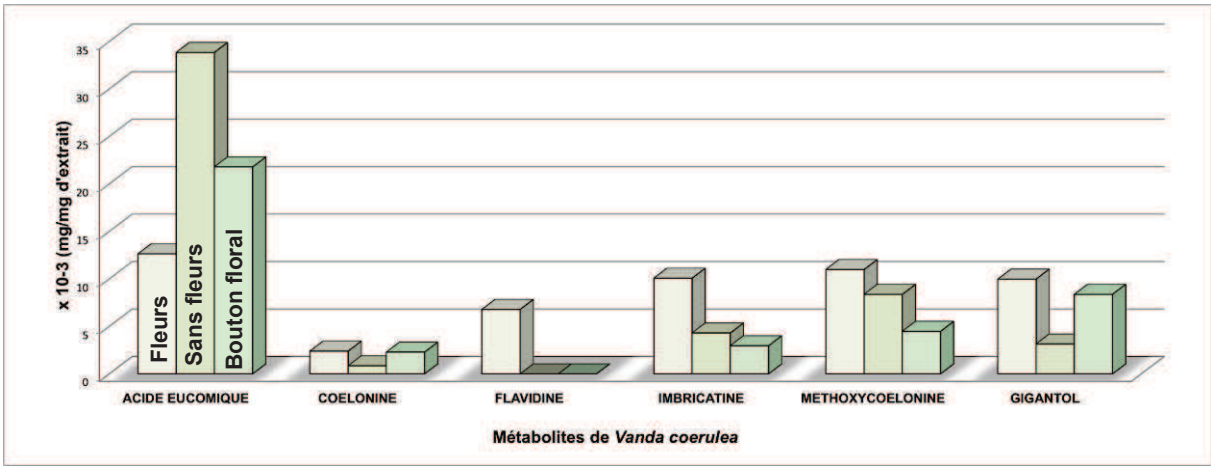


Figure III:35: Les teneurs des marqueurs en fonction du stade végétatif des échantillons de *Vanda coerulea* prélevés dans une serre en février 2012.

En **juillet 2012**, nous ne disposions que de deux types d'échantillon (**Tableau III:25**). En effet, aucun spécimen n'a été en pleine floraison à cette période, mais nous avons pu prélever des spécimens avec des boutons floraux. Nous avons également constitué des lots de 3 spécimens par type d'échantillon. Nous ne pourrons donc en comparer que deux types du mois de juillet. Comme on peut observer sur la **Figure III:36**, tous les métabolites sont au minimum deux fois plus concentrés dans les échantillons sans fleurs, sauf pour l'acide eucomique qui est 1,5 fois plus concentré dans les plantes avec un bouton floral.

Tableau III:25: Moyenne des teneurs en marqueurs des *Vanda coerulea* prélevées en juillet 2012 à trois stades végétatifs différents.

	JUILLET	
	Echantillon	
Métabolite (Moyenne de la teneur en mg/mg d'extrait x10^{-3})	SANS FLEURS	BOUTON FLORAL
ACIDE EUCOMIQUE	13,77 ± 2,44	21,86 ± 2,13
COELONINE	5,68 ± 1,78	2,69 ± 0,15
FLAVIDINE	6,95 ± 2,26	2,25 ± 0,26
IMBRICATINE	13,09 ± 2,22	6,37 ± 0,23
METHOXYCOELONINE	26,82 ± 5,66	9,04 ± 0,94
GIGANTOL	14,69 ± 4,63	5,50 ± 0,68

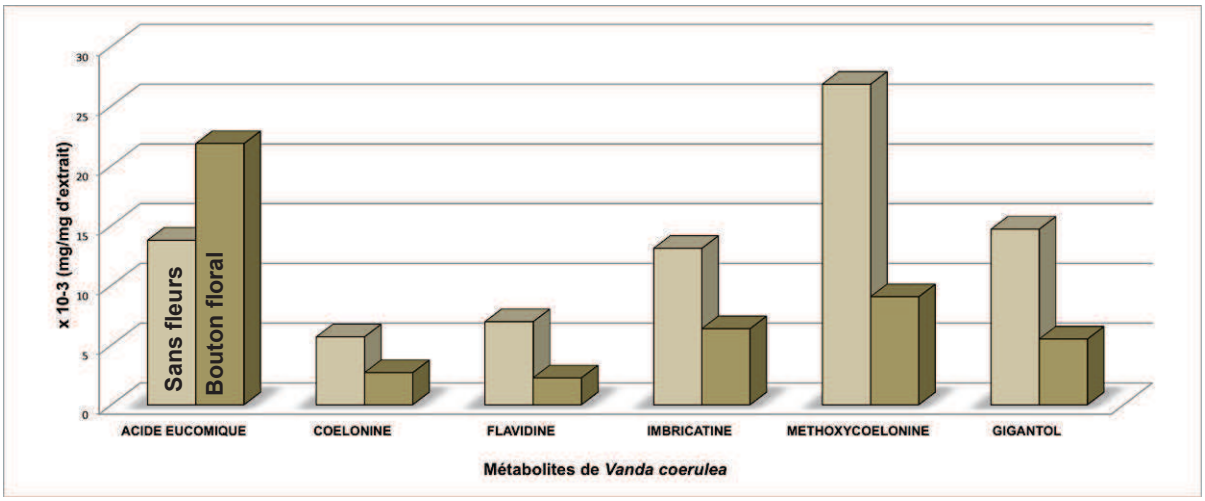


Figure III:36: Les teneurs des marqueurs en fonction du stade végétatif des échantillons de *Vanda coerulea* prélevés dans une serre en juillet 2012.

En **octobre 2012**, seulement un spécimen fleuri a pu être prélevé. Les autres types d'échantillons sont des lots constitués de 3 spécimens. Nous pouvons observer, qu'à cette période de l'année, la tendance s'inverse complètement par rapport au mois de février de la même année. Ce sont les spécimens sans fleurs qui concentrent le plus de métabolites, sauf pour l'acide eucomique qui est le plus présent dans les plantes en boutons (**Tableau III:26** et **Figure III:37**). Les trois marqueurs sont jusqu'à 2 fois plus concentrés dans les spécimens sans fleurs que dans ceux en floraison. Les teneurs de la flavidine sont comparables dans

les trois types d'échantillons. Ce sont les plantes avec des boutons floraux qui sont les moins concentrés en métabolites d'intérêt. En revanche de façon générale, ce sont eux qui contiennent le plus d'acide eucomique.

Tableau III:26: Moyenne des teneurs en marqueurs des *Vanda coerulea* prélevées en février 2012 à trois stades végétatifs différents.

	OCTOBRE		
	Echantillon		
Métabolite (Moyenne de la teneur en mg/mg d'extrait x10^{-3})	FLEURS	SANS FLEURS	BOUTON FLORAL
ACIDE EUCOMIQUE	17,56 ± 0,97	13,28 ± 4,46	32,99 ± 5,76
COELONINE	3,86 ± 1,01	4,16 ± 0,63	1,53 ± 0,81
FLAVIDINE	0,93 ± 0,05	2,29 ± 0,21	1,79 ± 0,02
IMBRICATINE	9,92 ± 1,67	27,02 ± 2,78	8,60 ± 1,18
METHOXYCOELONINE	33,55 ± 5,59	54,27 ± 7,21	13,18 ± 3,88
GIGANTOL	13,13 ± 3,71	22,38 ± 1,91	3,18 ± 1,78

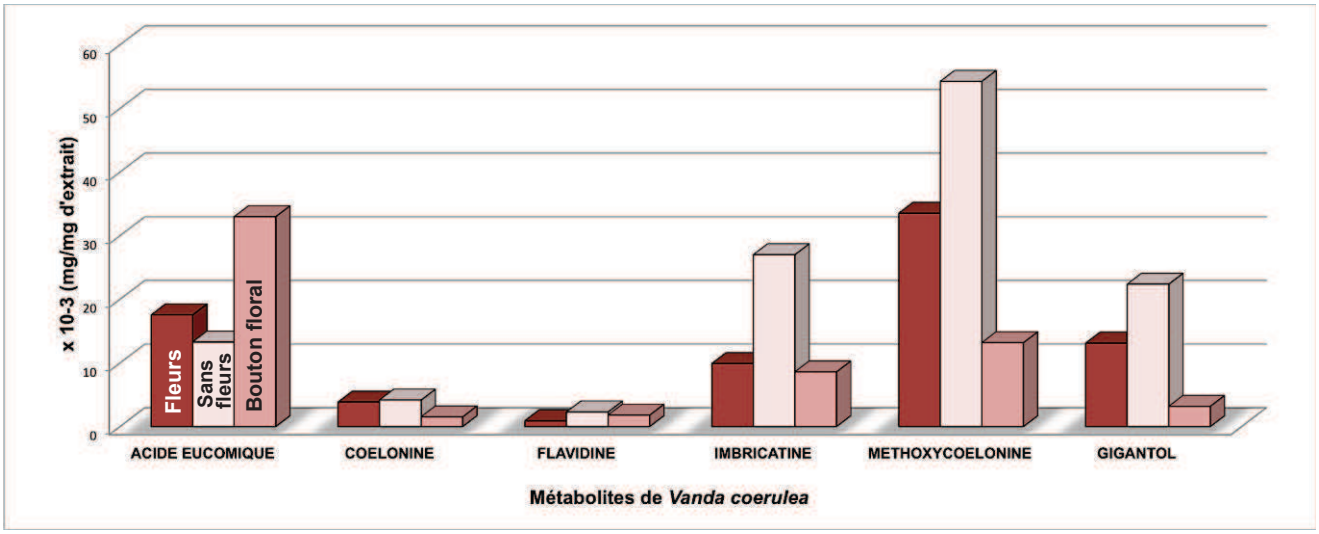


Figure III:37: Les teneurs des marqueurs en fonction du stade végétatif des échantillons de *Vanda coerulea* prélevés dans une serre en octobre 2012.

Si nous nous focalisons uniquement sur le stade végétatif de *Vanda coerulea,* il est impossible de conclure que les spécimens fleuris contiennent le plus de métabolites. C'est en effet le cas en février 2012, mais en octobre de la même année, l'hypothèse de départ ne peut pas être confirmée.

Nous avons également comparé les teneurs des marqueurs principaux en fonction de la période de prélèvement. Nous observons que la concentration des métabolites augmente de février à octobre 2012 (**Figure III:38**). En effet, la teneur des métabolites est de façon générale plus grande en fin qu'en début d'année. Sur cette comparaison, nous pouvons constater que l'échantillon le plus concentré est celui sans fleurs prélevé en octobre 2012.

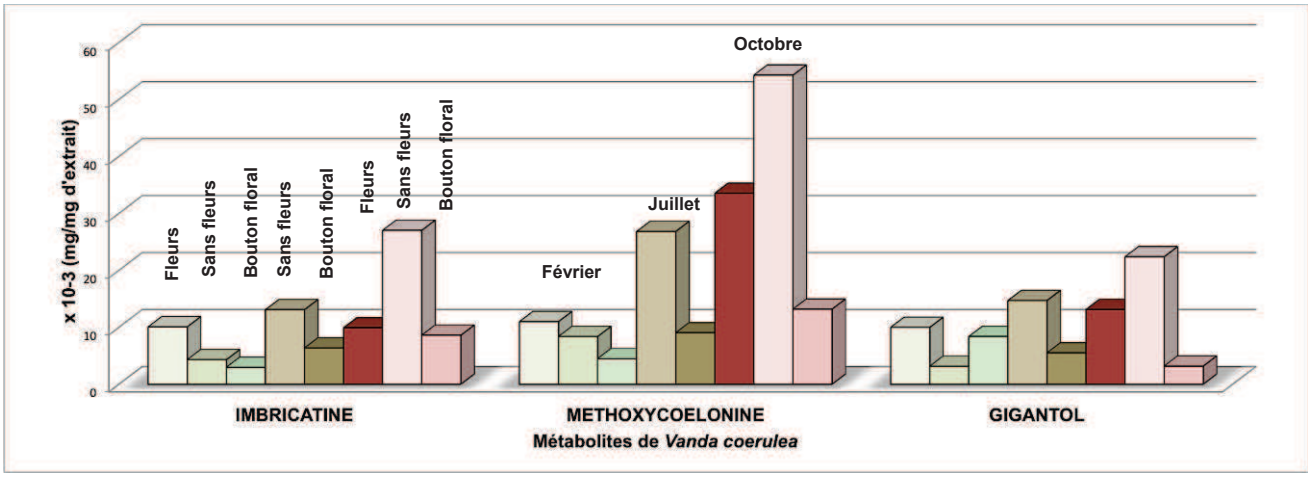


Figure III:38: Les teneurs des marqueurs en fonction du stade végétatif et de la période de prélèvement.

C. IV. Comparaison des spécimens de *Vanda coerulea* cultivées dans un milieu naturel (ferme d'orchidées en Thaïlande)

a. Rendements des extractions

Pour s'assurer de la répétabilité des extractions, nous avons extrait le même type d'échantillon deux fois selon le même protocole. Les rendements ont été calculés pour chaque et sont résumés dans le **Tableau III:27**.

Tableau III:27: Rendements moyens des extractions des échantillons de *Vanda coerulea* provenant de Thaïlande, cultivés dans leur climat naturel.

Période de prélèvement	Type d'échantillon	Rendement moyen de la 1ère et de la 2ème extraction
Avril 2012	Fleurs	8,68%
	Sans fleurs	8,41%
	Jeunes plantes âgés de moins d'un an	9,99%

b. Comparaison des teneurs des métabolites d'intérêt

Les résultats obtenus pour chaque type d'échantillon de *Vanda coerulea* prélevé dans la ferme d'orchidées en Thailande sont également résumés sous forme des tableaux et d'histogrammes. Seuls deux stades végétatifs ont été comparés: les plantes en floraison et les plantes sans fleurs. Nous avons constitué des lots de 10 spécimens sans fleurs, mais seulement 4 spécimens fleuris étaient disponibles à cette période de l'année en Thaïlande. De plus, nous avons voulu observer, si les métabolites d'intérêt sont présents uniquement dans des spécimens adultes ou si les jeunes plantules en contiennent déjà. Pour cela, nous avons prélevé une trentaine de petites pousses avec une tige d'environ un centimètre et portant 3 à 4 feuilles.

En se focalisant sur le stade végétatif de la plante, nous pouvons observer que tous les métabolites sauf l'acide eucomique sont plus concentrés dans les plantes sans fleurs (**Figure III:39** et **Tableau III:28**). Les teneurs de tous les marqueurs dosés sont comparables entre les plantes en floraison et les jeunes spécimens. Cette observation est très intéressante, puisque si les jeunes plantules sont quasi aussi riches en composés d'intérêt que les plantes adultes, il ne sera pas nécessaire d'attendre leur pleine maturation pour bénéficier de matières premières concentrés en marqueurs pour la recherche comme pour un approvisionnement industriel.

Tableau III:28: Moyenne des teneurs en marqueurs des *Vanda coerulea* cultivées dans leur climat naturel et prélevées en avril 2012.

	THAILANDE		
	Echantillon		
Métabolite (Moyenne de la teneur en mg/mg d'extrait x10^{-3})	FLEURS	SANS FLEURS	JEUNES SPECIMENS
ACIDE EUCOMIQUE	13,28 ± 5,37	9,49 ± 2,22	12,36 ± 2,99
COELONINE	4,17 ± 0,30	9,22 ± 1,28	5,78 ± 2,03
FLAVIDINE	4,18 ± 0,15	5,77 ± 0,34	3,79 ± 0,59
IMBRICATINE	11,80 ± 0,24	15,00 ± 0,49	11,41 ± 0,81
METHOXYCOELONINE	27,69 ± 0,52	52,41 ± 0,54	31,59 ± 4,79
GIGANTOL	9,96 ± 0,33	18,14 ± 0,92	10,60 ± 0,97

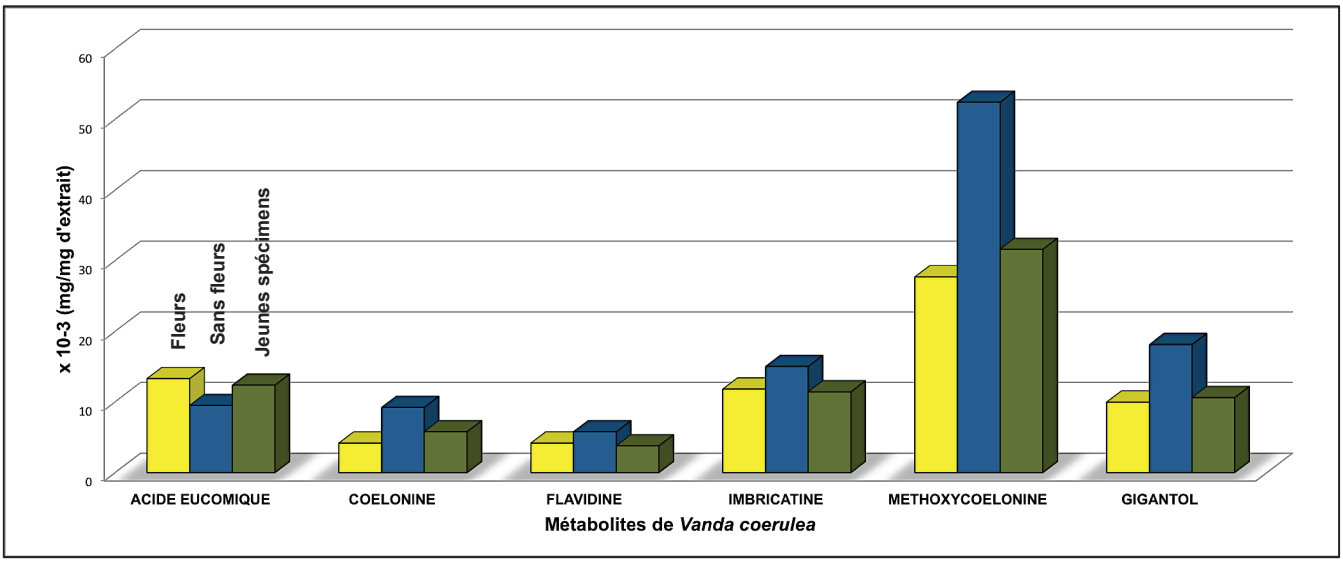


Figure III:39: Les teneurs des marqueurs en fonction du stade végétatif des échantillons de *Vanda coerulea* cultivées dans leur climat naturel en Thaïlande.

C. V. Comparaison des *Vanda coerulea* d'un milieu sauvage (réserve naturelle en Chine)

a. Rendements des extractions

Pour s'assurer de la répétabilité des extractions, nous avons extrait le même type d'échantillon deux fois selon le même protocole. Les rendements ont été calculés pour chaque et sont résumés dans le **Tableau III:29**.

Tableau III:29: Rendements moyens des extractions des échantillons de *Vanda coerulea* provenant de Chine, prélevés dans un milieu sauvage (réserve naturelle).

Période de prélèvement	Type d'échantillon	Rendement moyen de la 1ère et de la 2ème extraction
Avril 2012	Spécimens introduits depuis 3 ans	6,37%
	Spécimens introduits depuis moins d'un an	9,52%
	Spécimens sauvages	9,44%

b. Comparaison des teneurs des métabolites d'intérêt

L'objectif de l'étude sur les échantillons prélevés dans leur milieu sauvage était différent des autres. En effet, nous n'avons pas voulu observer les variations en fonction du stade végétatif des plantes. Deux types d'échantillons proviennent d'orchidées cultivées au départ en Thaïlande puis ré-introduites dans la réserve en Chine dans le but d'augmenter la biodiversité de la réserve et contribuer à la protection des orchidées dans leur milieu naturel. Une hypothèse a été émise que les orchidées vivant à l'état sauvage produisent plus de métabolites secondaires que lorsqu'elles sont cultivées, car elles en ont besoin pour se défendre des stress biotiques et abiotiques qu'elles subissent dans leur environnement. Nous avons ainsi évalué leur concentration en métabolites d'intérêt et avons comparé ces résultats avec ceux obtenus pour des spécimens sauvages, jamais cultivés auparavant. Pour cela, nous avons prélevé des lots de 10 spécimens pour chaque type d'échantillon: des spécimens ayant été introduits dans le milieu sauvage depuis moins d'un an, depuis 3 ans et des spécimens croissant à l'état sauvage.

En comparant ces différents lots entre eux, nous pouvons constater que la teneur des métabolites est très variable d'un échantillon à l'autre (**Tableau III:30** et **Figure III:40**). Il est donc délicat de tirer des conclusions tranchées. On peut tout de même constater que, pour tous les lots, l'acide eucomique est le métabolite majoritaire. Les spécimens sauvages sont en moyenne plus concentrés en composés d'intérêt que les spécimens cultivés au départ. Les teneurs en flavidine et coelonine sont très faibles, néanmoins, tous les métabolites sont présents et quantifiables.

Tableau III:30: Moyenne des teneurs en marqueurs des *Vanda coerulea* prélevées dans leur milieu sauvage (réserve naturelle en Chine).

	CHINE		
	Echantillon		
Métabolite (Moyenne de la teneur en mg/mg d'extrait x10^{-3})	SPECIMENS INTRODUITS DEPUIS UN AN	SPECIMENS INTRODUITS DEPUIS TROIS ANS	SPECIMENS SAUVAGES
ACIDE EUCOMIQUE	39,01 ± 4,92	25,98 ± 2,18	28,40 ± 2,67
COELONINE	2,04 ± 0,82	0,71 ± 0,46	4,77 ± 1,15
FLAVIDINE	0,69 ± 0,49	2,28 ± 0,22	2,56 ± 1,15
IMBRICATINE	6,05 ± 2,05	10,09 ± 2,26	6,95 ± 0,80
METHOXYCOELONINE	13,29 ± 5,97	8,34 ± 3,12	26,18 ± 2,52
GIGANTOL	4,59 ± 1,82	5,89 ± 0,13	11,88 ± 3,31

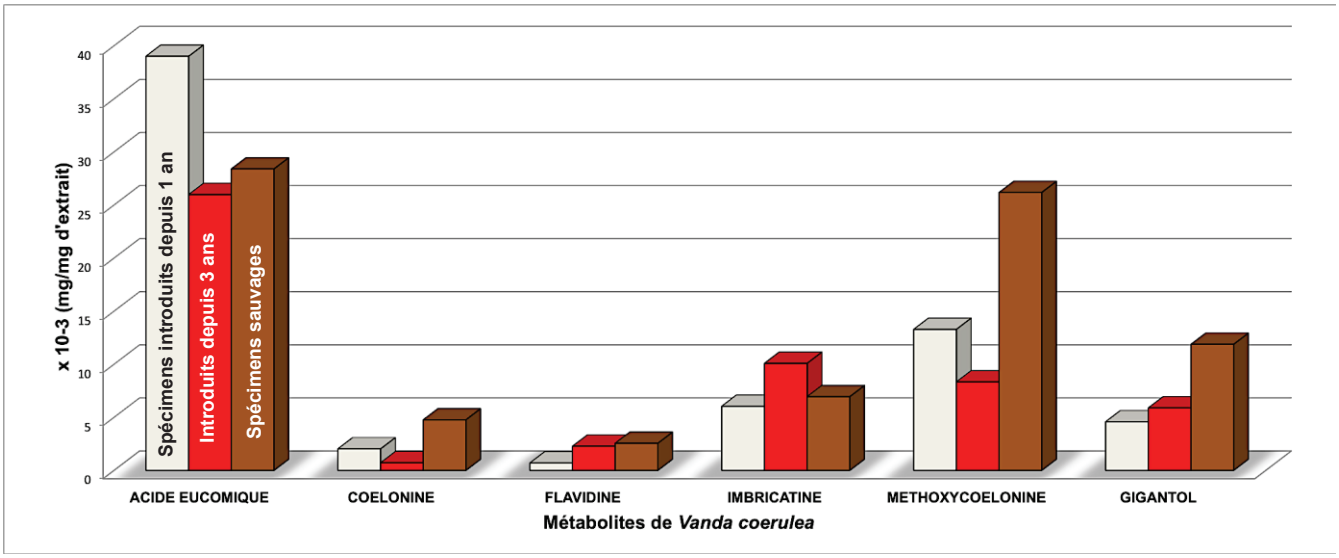


Figure III:40: Les teneurs des marqueurs dans les échantillons de *Vanda coerulea* prélevées dans leur milieu sauvage en Chine.

Les teneurs en métabolites sont quasi égales dans les orchidées cultivées au départ que dans celles prélevées à l'état sauvage. Les spécimens prélevés en Chine n'ont jamais fleuri depuis qu'ils ont été réintroduits dans la réserve. Compte tenu de leur stade végétatif au moment du prélèvement (plantes sans fleurs), nous les avons comparés avec les spécimens sans fleurs de Thaïlande. Les échantillons ont été prélevés à la même période et séchés de la même manière (une semaine au soleil dans des conditions naturelles du climat tropical) ce qui nous permet de comparer leurs teneurs en métabolites. En revanche, nous ne pouvons le faire avec les spécimens du milieu artificiel à Genève, car ils n'ont pas été prélevés à la même période et les plantes ont été congelées, puis lyophilisées.

Pour ce type de comparaison, nous nous sommes focalisés uniquement sur les marqueurs phytochimiques et biologiques de *Vanda coerulea:* (imbricatine, méthoxycoelonine, gigantol). En observant la **Figure III:41**, nous pouvons constater que les métabolites principaux de *Vanda coerulea* sont au moins deux fois plus concentrés dans les spécimens cultivés que dans ceux du milieu sauvage. Comme évoqué précédemment, les spécimens de Chine n'ont jamais fleuri dans la réserve. Il est donc possible que cette faible concentration de leurs métabolites soit due à leur adaptation insuffisante à leur nouveau biotope. Cependant, d'autres facteurs de variation comme le climat et l'altitude peuvent également influencer la capacité de biosynthèse des orchidées étudiées.

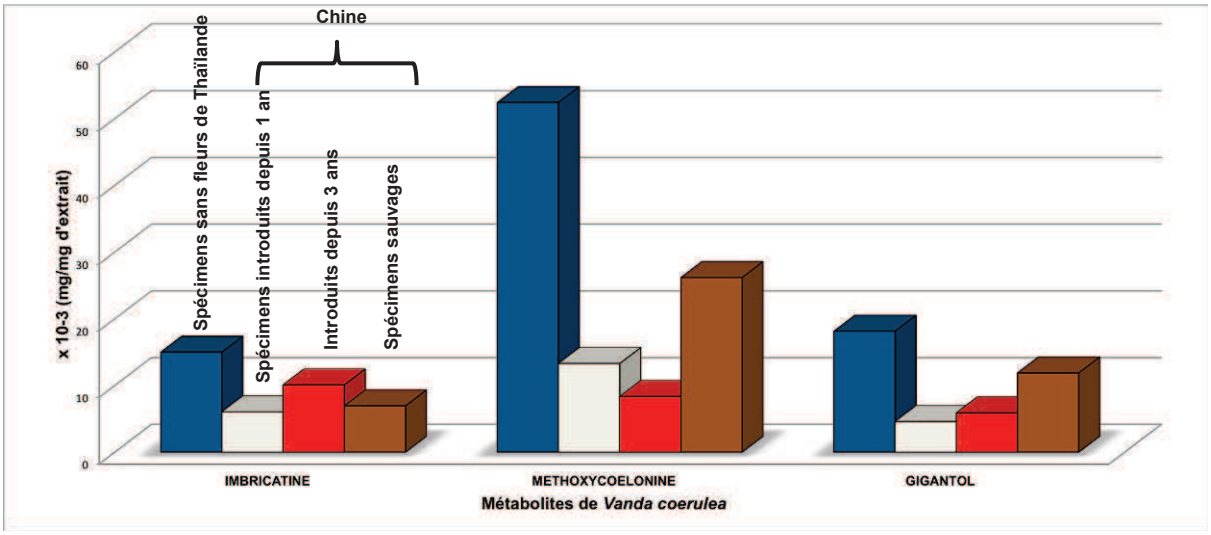


Figure III:41: Les teneurs des marqueurs dans les échantillons de *Vanda coerulea* prélevées dans leur milieu sauvage en Chine comparées aux spécimens sans fleurs de Thaïlande.

C. VI. Comparaison d'échantillons de *Vanda teres* cultivées dans un milieu naturel (ferme d'orchidées en Thaïlande)

a. Rendements des extractions

Pour s'assurer de la répétabilité des extractions, nous avons extrait le même type d'échantillon deux fois selon le même protocole. Les rendements ont été calculés pour chaque et sont résumés dans le **Tableau III:31**.

Tableau III:31: Rendements des extractions des échantillons de *Vanda teres,* cultivées dans le climat naturel.

Période de prélèvement	Type d'échantillon	Rendement moyen de la 1ère et de la 2ème extraction
Avril 2012	Fleurs	12,88%
	Sans fleurs	14,89%

c. Comparaison des teneurs des métabolites d'intérêt

Pour *Vanda teres*, nous avons pu observer seulement deux types d'échantillons cultivés dans leur climat naturel tropical en Thaïlande. Les teneurs de leurs métabolites principaux, l'acide eucomique et les vandatérosides I à III, ont été comparés uniquement en

fonction du stade végétatif de la plante. Les résultats ont été obtenus à partir des analyses des lots de 10 spécimens pour chaque type d'échantillon: spécimens fleuris et spécimens sans fleurs.

Les principaux biomarqueurs de *Vanda teres* sont les vandatérosides I et II. C'est donc surtout sur ces deux composés que nous nous sommes focalisés. Cependant, les résultats obtenus pour les 4 métabolites sont résumés dans le **Tableau III:32** et représentés sous forme d'histogrammes sur la **Figure III:42**.

Tableau III:32: Moyenne des teneurs en marqueurs de *Vanda teres* cultivées dans leur climat naturel en Thaïlande et prélevées en avril 2012.

Vanda teres	Acide eucomique ($x10^{-3}$ mg/mg d'extrait)	Vandatéroside I (x10-3 mg/mg d'extrait)	Vandatéroside II (x10-3 mg/mg d'extrait)	Vandatéroside III (x10-3 mg/mg d'extrait)
Sans fleurs	22,12 ± 1,00	6,93 ± 0,35	36,03 ± 1,86	4,71 ± 0,48
Fleurs	8,85 ± 1,98	6,28 ± 0,22	31,56 ± 2,06	1,63 ± 0,38

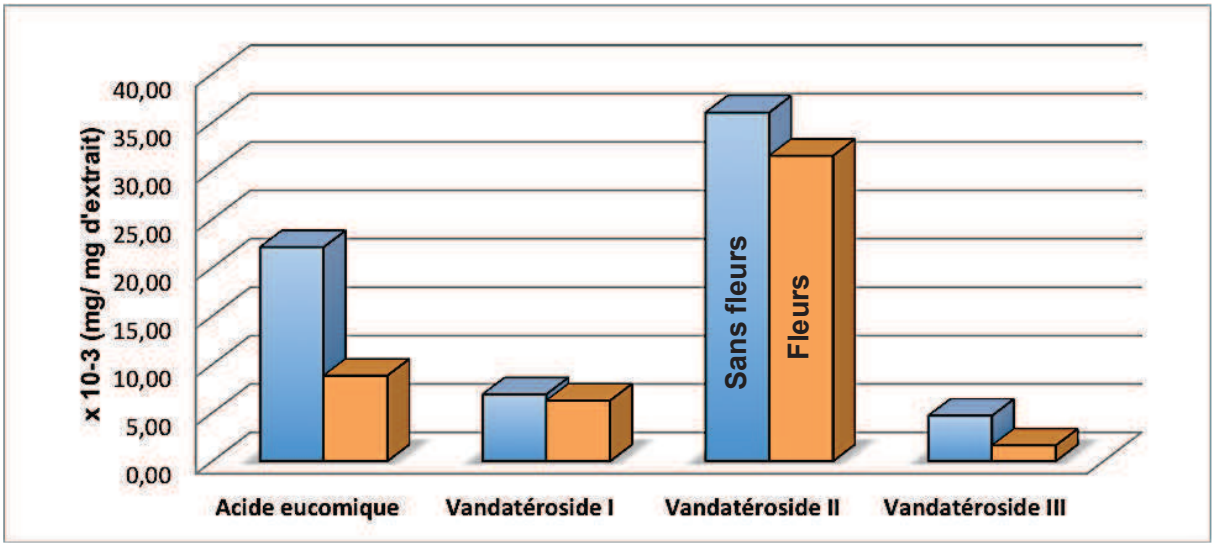


Figure III:42: Les teneurs des marqueurs dans les échantillons de *Vanda teres* prélevés dans leur milieu sauvage en Chine.

Globalement, les métabolites de *Vanda teres* sont les plus concentrés dans les échantillons sans fleurs. Néanmoins, si nous ne focalisons seulement aux vandatérosides I et II, nous constatons que leurs teneurs sont comparables dans les deux types de plantes. Il semble donc que pour *Vanda teres,* le stade végétatif n'influence pas les teneurs de ces marqueurs.

C. VI. Bilan

Nous avons quantifié l'ensemble des métabolites d'intérêt définis dans cette étude dans les différents lots d'échantillons analysés. Cependant, nous n'avions pas la prétention de donner des quantités exactes de chaque composé dans chaque type d'échantillon, mais plutôt d'évaluer des tendances, en fonction des différents paramètres définis. L'objectif premier de cette étude était de vérifier l'hypothèse que *Vanda coerulea* et *Vanda teres* concentrent leur métabolites principaux au stade de la floraison. Avec les prélèvements effectués sur une année, nous ne pouvons pas confirmer cette hypothèse : sur l'ensemble des échantillons analysés, il semblerait au contraire que c'est hors floraison que la concentration de ces marqueurs soit la plus importante, même si la période de prélèvement semble également intervenir dans la capacité biosynthétique des plantes étudiées. En revanche, nous avons observé que les teneurs en métabolites d'intérêt des spécimens cultivés en serre sont les plus basses dans les plantes portant des boutons floraux.

Concernant *Vanda teres,* le stade végétatif semble ne pas influencer les teneurs en marqueurs. Il ne semble donc pas impératif de prélever seulement des plantes fleuries pour s'approvisionner des matières premières plus concentrées en métabolites d'intérêt.

Ces travaux ont enrichi nos connaissances sur deux espèces de *Vanda.* L'ensemble des analyses nous a fourni plusieurs types de nouvelles informations. En effet, nous n'avions pas d'idée précise sur la capacité biosynthétique des spécimens cultivés dans la serre à Genève. Nos résultats montrent que tous les métabolites identifiés auparavant dans *Vanda coerulea* sont présents en quantité comparable avec les espèces cultivées en Thaïlande. En revanche, leur réintroduction dans leur milieu sauvage ne semble pas (ou pas encore) induire d'augmentation de la teneur de ces métabolites, comme nous avions supposé. Une autre information intéressante nous a été apportée par l'étude des jeunes spécimens dont les teneurs en métabolites d'intérêt sont comparables à celles de spécimens adultes. Il ne serait donc pas nécessaire d'attendre la maturation de la plante pour l'étudier et la valoriser.

Nous avons analysé une dizaine de types d'échantillons de différentes provenances et de différentes caractéristiques. Nous avons parfaitement conscience des limites de cette étude, réalisée avec les moyens mis à notre disposition. Il était par exemple difficile de faire plusieurs prélèvements en Asie. De plus, le mois d'avril (période de ma mission en Asie), ne correspond pas à la période de floraison naturelle des *Vandas.* Nous ne disposions donc que

de 4 échantillons fleuris de *Vanda coerulea,* ce qui n'est pas suffisant pour pouvoir généraliser des conclusions sur la base de nos données expérimentales. Afin de confirmer ces résultats, il faudrait idéalement prévoir d'autres prélèvements pour pouvoir comparer le même nombre de spécimens fleuris et sans fleurs avec un échantillonnage plus large. Les travaux réalisés sur les échantillons de Genève devraient également être refaits plusieurs années consécutives pour vérifier l'influence de la période de l'année sur la teneur des composés recherchés. A certaines périodes, nous n'avons pas pu avoir suffisamment d'échantillons fleuris pour pouvoir comparer toujours le même nombre de spécimens par lot. Enfin, pour les échantillons de *Vanda teres*, le même prélèvement devrait également être réalisé plusieurs fois dans l'année ou au moins une fois par an pour vérifier nos résultats. Globalement, nous sommes parfaitement conscients que l'échantillonnage effectué est limité et ne permet pas de généraliser nos conclusions sur l'ensemble des plantes, qu'elles soient fleuries ou non.

Malgré ces limites, nous avons essayé de dégager des tendances en comparant les différents biotopes des orchidées à notre disposition. Les informations recueillies restent précieuses et nous permettent d'approfondir nos connaissances actuelles sur les deux espèces de *Vanda.*

Chapitre IV
Conclusions et perspectives

A. Rappel des objectifs

Ces trois années de recherche se sont articulées autour de deux objectifs principaux:

- les objectifs généraux qui concernent l'exploration phytochimique de deux nouvelles espèces d'orchidées sélectionnées sur la base de plusieurs critères définis, *Aerides rosea* et *Acampe rigida*

- les objectifs spécifiques qui nous ont amenés à approfondir nos connaissances sur deux espèces déjà étudiées dans notre laboratoire d'accueil, *Vanda coerulea* et *Vanda teres*

Remarque : hormis les travaux décrits dans ce manuscrit, nous avons également initié l'exploration d'*Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr., de *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. et de *Brassocattleya marcella* Koss. Certains de ces résultats ont été présentés sous forme de communications écrites à l'occasion de congrès internationaux (cf chapitre Annexes), mais n'ont pas été détaillés dans ce mémoire.

Pour chacun de nos objectifs, nous avons utilisé des stratégies différentes en fonction des problématiques posées. En plus d'une démarche classique en phytochimie qui fait appel à des outils analytiques et préparatifs traditionnels (CCM, CLHP, CLHP semi-préparative, chromatographie d'exclusion…), nous avons développé des méthodes d'analyse en utilisant des techniques couplées de dernière génération, comme l'HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN et l'HPLC-ESI-HRMS/MS. Dans cette étude, nous avons eu recours également à la CPC, un outil préparatif performant, qui a fait ses preuves dans le domaine de la purification de produits naturels à partir de matrices complexes comme des extraits végétaux.

Ayant utilisé l'ensemble de ces technologies, nous pouvons constater qu'elles ne sont pas universelles ni applicables pour résoudre tout type de problématique en pharmacognosie, mais qu'elles sont complémentaires les unes aux autres. Chacun de ces outils a ses avantages et ses limites :

- **L'HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN** permet de travailler avec une quantité infime d'échantillon, mais exige une mise au point rigoureuse et parfois fastidieuse de chaque étape du couplage. La composition de chaque échantillon étant différente,

nous ne pouvons pas développer une seule et même méthode applicable à tous les extraits végétaux.

- **L'HPLC-ESI-HRMS/MS** est un outil de pointe qui permet d'obtenir rapidement une information structurale des composés contenus dans un mélange. Cependant, le mode d'ionisation ESI ne permet pas d'employer une base de données suffisamment riche, qui permettrait d'identifier rapidement des composés connus et déjà décrits dans la littérature. Elle ne permet pas de donner une position exacte de chaque atome sur le squelette global, une analyse RMN est donc nécessaire pour confirmer sans équivoque la structure d'un métabolite.

- **La CPG-SM** avec une ionisation à impact électronique est également un outil nécessaire et complémentaire en phytochimie, car grâce à la base de données du NIST, elle permet d'identifier un grand nombre de molécules. Cependant, son utilisation est restreinte aux composés volatils.

- **La CPC** a pour avantage une haute capacité de charge à l'injection de l'échantillon et permet de séparer des composés structurellement proches qui co-éluent sur une colonne CLHP. La séparation des molécules par CPC emploie des critères de sélectivité différente par rapport à une séparation par CLHP, SPE ou sur des colonnes ouvertes. Ces techniques restent tout de même complémentaires, permettant une pré-purification et un fractionnement de l'échantillon par l'une ou l'autre. Son inconvénient est la recherche d'un système de solvant adapté qui peut s'avérer parfois fastidieuse et le type de solvants utilisés qui sont à manipuler avec précautions.

B. Exploration phytochimique de deux nouvelles espèces d'orchidées tropicales

B. I. Développement d'une méthode de déréplication par HPLC-ESI-HRMS/MS

Afin de nous focaliser sur l'identification des métabolites originaux au sein des espèces choisies et éviter l'isolement de composés déjà isolés à partir des orchidées étudiées auparavant dans notre laboratoire d'accueil, nous avons développé une base de données interne à partir des résultats antérieurs. Ainsi, neuf composés isolés à partir de

Vanda coerulea et *Vanda teres* (cinq stilbénoïdes, trois hydroxyoxybenzyle malates et l'acide eucomique) ont été intégrés dans une méthode de déréplication afin de comparer rapidement le profil chromatographique d'extraits hydro-alcooliques d'orchidées et ainsi obtenir rapidement une idée de leur composition, de manière plus fiable et plus précise que les classiques criblages phytochimiques par HPTLC, voire un outil plus récent comme le couplage HPTLC-SM, que nous avons également utilisé pendant nos travaux (cf Communications écrites à des congrès internationaux présentées en Annexes). Les paramètres intégrés dans cette méthode (temps de rétention, spectre de masse et MS^2) restent néanmoins complémentaires aux comparaisons de profils chromatographiques par CCM et CLHP-DAD. L'utilisation de la spectrométrie de masse, une méthode très sensible et qui ne nécessite par conséquent que des quantités minimes d'échantillon, nous a permis de repérer sans ambigüité des métabolites communs entre *Vanda coerulea* et deux espèces nouvellement étudiées, *Aerides rosea* et *Acampe rigida*. Les résultats obtenus nous ont aidé à établir des stratégies adaptées dans l'exploration de chacune de ces deux orchidées.

Pour le moment, notre méthode ne contient qu'une dizaine de composés et n'a donc pas la prétention d'être exhaustive sur tous les stilbénoïdes ou hydroxyoxybenzyle malates isolés d'orchidées. Cependant, l'objectif à terme est de l'enrichir par chacun des métabolites identifiés durant nos trois années de recherche afin de développer un outil performant qui nous permettra d'avancer plus rapidement dans nos futures investigations en nous focalisant sur des constituants présentant des originalités structurales au sein de la famille des Orchidacées.

B. II. La sous-tribu des Aeridinae

Dans notre objectif d'apporter des connaissances fondamentales sur la phytochimie des orchidées, nous avons sélectionné deux espèces jamais explorées auparavant, *Aerides rosea* et *Acampe rigida*. Ces deux orchidées appartiennent d'un point de vue taxonomique à la tribu des Vandeae et la sous-tribu des Aeridinae. Quatre espèces au total de la même sous-tribu ont donc été étudiées dans notre laboratoire d'accueil. Cependant, environ 70 autres genres que *Vanda, Aerides* ou *Acampe* sont également classés dans cette sous-tribu. Ainsi, la complexité phytochimique que nous avons mis en évidence n'a été qu'à peine effleurée.

Entre les quatre espèces étudiées, certaines présentent des caractéristiques morphologiques et physiologiques proches, d'autres très différentes. La diversité de deux

orchidées classées dans le genre *Vanda* se traduit par la présence de métabolites secondaires appartenant à des classes chimiques différentes: stilbénoïdes pour *Vanda coerulea* et hydroxy-benzyle esters d'acide eucomique pour *Vanda teres.* Cette dernière est nouvellement classée dans le genre *Papilionanthe*, qui compte 13 espèces [http://www.theplantlist.org/browse/A/Orchidaceae/Papilionanthe/]. Ce sont surtout ses feuilles courtes, étroites et cylindriques qui la différencient d'autres orchidées, même sans fleurs. Au vu de ses caractéristiques morphologiques et de sa composition phytochimique toutes deux très différentes des autres espèces du genre *Vanda*, la nouvelle taxonomie de *V. teres* semble être plus appropriée. A ce jour, aucune étude phytochimique concernant le genre *Papilionanthe* n'a été publiée. Il serait donc pertinent d'explorer la composition chimique d'une autre espèce, comme par exemple *Papilionanthe hookeriana* ou *P. vandarum* (**Figure IV :1**) afin de rechercher la présence des structures similaires aux vandatérosides. Ainsi, la classification de *Vanda teres* pourrait être argumentée non seulement d'un point de vue anatomique, mais également chimiotaxonomique.



Figure IV:1: Des espèces du genre *Papilionanthe : P. hookeriana* (gauche) et *P. vandarum.* Sources : www.eol.org et http://orchid.unibas.ch.

En revanche, les trois autres espèces, *V. coerulea, Aerides rosea* et *Acampe rigida*, sont morphologiquement très proches. Il est par exemple difficile de différencier une *Vanda* d'une *Aerides* sans fleurs. En effet, elles possèdent des feuilles plates et engainantes et une tige centrale ligneuse. *Acampe rigida* présente la même morphologie des feuilles, mais elle est beaucoup plus imposante, ce qui représente plus de biomasse. En plus de ces similitudes anatomiques, nous constatons des similitudes dans la composition des tiges avec

présence commune de certains stilbénoïdes. Ces métabolites secondaires ne sont pas spécifiques à la sous-tribu des Aeridinae, car les dérivés phénanthréniques sont très fréquemment retrouvés dans la famille des Orchidacées (cf chapitre "Introduction"). Beaucoup de ces composés ont été isolés à partir des tiges, or d'autres organes semblent avoir une composition phytochimique très différente même au sein d'une même espèce. C'est le cas de *Vanda coerulea* dont les tiges contiennent des stilbénoïdes alors que les feuilles renferment des flavonoïdes (hétérosides de la lutéoline) [Simmler C. 2010]. Nous avons remarqué également ce type de différence chez *Acampe rigida* dont les tiges renferment également des stilbénoïdes, certains communs de ceux biosynthétisés par *V. coerulea*, mais dont les feuilles renferment des composés phénoliques et des esters d'acide cinnamique glycosylés. Ces observations nous encouragent à continuer à travailler séparément différents organes d'une même espèce (feuilles, tiges, racines ou fleurs) afin de rechercher des spécificités de synthèse ou de stockage de métabolites secondaires.

La phytochimie de la **sous-tribu des Aeridinae** n'a pas encore été suffisamment explorée. Cependant, quelques données sont disponibles dans la littérature, concernant notamment d'autres dérivés phénanthréniques dans le genre *Vanda*. En effet, deux autres phénanthropyranes, la parviflorine et la tesselatine, ont été identifiés respectivement dans *Vanda parviflora* et *Vanda tessellata* [Anuradha V. *et al.* 1998]. Concernant d'autres classes chimiques, les données de la littérature sont plus rares, mais certaines études plus anciennes ont tout de même été publiées. Un dérivé de l'acide citrique, nommé parishine, a été identifié dans *Vanda parishii* [Dahmén *et al.* 1976] et la laburnine, un alcaloïde, a été répertorié dans *Vanda cristata* [Lüning B. *et al.* 1974]. La présence d'alcaloïdes a été décrite dans le genre *Phalaenopsis*, classé également dans la sous-tribu des Aeridinae [Lüning B. *et al.* 1966 et Frölich C. *et al.* 2006]. Ces données suggèrent une réelle diversité chimique qui reste à explorer au sein de cette sous-tribu.

B. III. Identification des constituants d'*Aerides rosea*

Nous avons identifié onze métabolites dans les tiges d'*Aerides rosea (***Figure II:34**, Chapitre II):

- un **dérivé d'acide *p*-coumarique**: l'acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique,
- deux **bibenzyles**: le gigantol et la batatasine III,
- deux **phénanthrènes**: l'aerosanthrène et le 3,5-diméthoxyphénanthrène-2,7-diol,

- quatre **9,10-dihydrophénanthrènes**: l'aérosine, la coelonine, la méthoxycoelonine et le 5-méthoxy-9,10-dihydro2,3,7-phénanthrènetriol,
- un **phénanthropyrane:** le 3-méthoxy-2,7-dihydroxy-5H-phénanthro[4,5-*bcd*]pyrane
- et un **9,10-dihydrophénanthropyrane**: l'imbricatine.

Ils ont été identifiés pour la première fois au sein d'une même espèce, jamais étudiée auparavant. La coelonine, la méthoxycoelonine, l'imbricatine et le gigantol sont des métabolites communs avec *Vanda coerulea.* Malgré les similarités dans la composition phytochimique de ces deux espèces, celle d'*Aerides rosea* est beaucoup plus complexe et les 4 stilbénoïdes communs à *V. coerulea* y sont plus concentrés. Deux nouveaux dérivés phénanthréniques, que nous avons nommés l'**aérosanthrène** et l'**aérosine**, ont été identifiés dans les tiges d'*Aerides rosea.*

Nous avons donc contribué à la connaissance de la chimie du genre *Aerides*, car à ce jour une seule espèce de ce genre a fait l'objet d'une étude phytochimique répertoriée dans la littérature. En effet, seule *A. crispum* a déjà été travaillée [Anuradha V. *et al.* 1998]: elle renferme un phénanthropyrane, l'aéridine, de structure proche à l'imbricatine que nous identifiée dans l'espèce *A. rosea*.

B. IV. Identification des constituants d'*Acampe rigida*

Les tiges d'*Acampe rigida* contiennent quatre stilbénoïdes communs à *Vanda coerulea*, à savoir la flavidine, la coelonine, l'imbricatine et le gigantol. L'observation du profil CLHP d'un extrait de tiges *d'A. rigida* nous a indiqué une complexité de composition, mais globalement des constituants présents à des concentrations plus faibles que dans les tiges de *V. coerulea*. La présence de stilbénoïdes était également fortement probable, mais nous ne disposions pas de matière première végétale en quantité suffisante donc nous nous sommes focalisés sur les feuilles de cette espèce.

En effet, le profil chromatographique d'un extrait de feuilles est différent d'un extrait de tiges et aucune molécule commune aux deux espèces de *Vanda* n'a été détectée dans les feuilles d'*Acampe rigida.* En utilisant des techniques phytochimiques classiques, telles que l'extraction liquide/liquide et la CLHP semi-préparative, nous avons identifié trois composés phénoliques (**Figure II:45**, Chapitre II)

- l'acide 4-hydroxybenzoïque,

- le 4-hydroxy-benzaldéhyde,
- et le 4-méthoxyméthyl-phénol.

La poursuite de l'exploration phytochimique d'un extrait de feuilles nous a conduit à faire des hypothèses de structures pour quatre autres métabolites : il s'agit probablement d'esters d'acide cinnamique glycosylés, non encore décrits dans la famille des Orchidacées donc potentiellement intéressants dans une optique de sélection de marqueurs taxonomiques. A ce jour, aucune étude phytochimique concernant le genre *Acampe* n'a été répertoriée.

B. V. Perspectives

a. Identification des métabolites des feuilles d'Acampe rigida

Même si nous avons contribué à l'exploration phytochimique de cette espèce et que nous avons apporté de nouvelles connaissances, notre travail doit être poursuivi. L'identité des 4 métabolites majoritaires dans les profils HPLC-DAD reste en effet à confirmer. Ce travail nécessitera une optimisation des conditions chromatographiques, notamment sur le couplage HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN. Ces conditions chromatographiques devront être modifiées afin de pouvoir injecter des fractions plus concentrées tout en maintenant une bonne résolution. Cette étape nous permettra par la suite de piéger plus efficacement chacun des métabolites sur les cartouches SPE et d'obtenir des concentrations plus élevées de manière à augmenter le rapport signal sur bruit dans l'acquisition des spectres RMN mono- et bidimensionnels. Le remplacement de la sonde actuelle de 60 μL (volume actif de 30 μL) par une sonde capillaire capNMR de 10 μL (volume actif de seulement 5 μL) devra également nous permettre d'obtenir des mesures plus sensibles avec seulement quelques microgrammes de chaque composé.

b. Evaluation biologique des métabolites identifiés dans les tiges d'Aerides rosea

Neuf composés sur onze ont été identifiés *on-line*, sans la nécessité de les isoler, grâce aux technologies dernière génération auxquelles nous avons eu accès seulement à partir de ma deuxième année de thèse. Afin de les intégrer dans notre base de données interne et enrichir notre méthode de déréplication, il sera utile de les isoler pour disposer de témoins pour nos recherches futures. De plus, il sera également intéressant d'approfondir les activités biologiques des composés déjà connus et en attribuer aux métabolites nouvellement identifiés.

Un criblage *in silico* est actuellement en cours de réalisation en collaboration avec le Dr. Patrick Trouillas de l'Université de Limoges, spécialisé dans la modélisation moléculaire des propriétés anti-oxydantes et des mécanismes d'action de polyphénols. Cette approche nous permettra peut-être d'identifier des cibles potentielles des métabolites identifiés, qui pourront être confirmées expérimentalement par la suite. Dans ce cas, nous développerons une méthode de purification adaptée, par exemple par CPC, afin d'obtenir des quantités suffisantes de chaque molécule identifiée et explorer tout le potentiel biologique des constituants présents dans les tiges d'*Aerides rosea*.

Dans cette optique, l'objectif appliqué de nos travaux de recherche est de repérer des matières premières à potentialité cosmétique. Les évaluations biologiques déjà réalisées antérieurement sur les deux espèces de *Vanda* ont cherché à identifier des substances naturelles bioactives capables de ralentir le vieillissement cutané. Comme tout organe, la peau humaine est soumise au vieillissement. Plusieurs facteurs interviennent dans ce processus, qui est d'une part chronobiologique et qui est influencé par le potentiel génétique, les mécanismes métaboliques ou encore des variations hormonales, et d'autre part ces phénomènes naturels peuvent être accélérés par des facteurs environnementaux, tels que le tabagisme, la consommation de l'alcool, une alimentation déséquilibrée ou encore une exposition excessive aux rayonnements solaires [Lahmann C. *et al.* 2001; Quan T. *et al.* 2009]. L'exposition solaire chronique (photo-vieillissement) et le tabagisme sont les facteurs environnementaux majeurs et les plus délétères pour la peau [Yaar M. *et al.* 2007; Zouboulis C. C. *et al*. 2011]. Les signes de l'âge se traduisent le plus souvent par un changement de l'apparence de la peau, de sa structure et de sa fonction. On peut observer une hyperpigmentation avec apparition de taches cutanées, des rides et ridules. Plusieurs mécanismes interviennent dans le processus du vieillissement cutané, mais ce sont surtout l'oxydation, l'inflammation, la dégradation de la matrice extracellulaire par des métalloprotéinases et la diminution de la capacité de renouvellement de l'épiderme qui y participent activement.

Les stilbénoïdes majeurs de *Vanda coerulea* ont été testés sur un ensemble de cibles biologiques associées à ces processus. Les tests effectués par Charlotte Simmler ont été focalisés sur des activités anti-oxydante (neutralisation des espèces réactives d'oxygène, EOR, intracellulaires), anti-inflammatoire cutanée (inhibition de la production de prostaglandine de type 2, PGE-2, et de l'expression de la cyclo-oxygénase 2, COX-2) et inhibitrice de l'expression de matrices métalloprotéinases (MMPs-1,2 et 9) impliquées dans la dégradation de la matrice dermique.

Tout d'abord, l'activité anti-radicalaire des extraits de *Vanda coerulea* et d'*Aerides rosea* devra être comparée. Nous avons observé que la composition d'un extrait de tiges d'*A. rosea* est plus complexe et plus riche qu'un extrait de tiges de *V. coerulea*. L'activité anti-radicalaire de différents extraits de tiges de *V. coerulea* étant globalement proportionnelle à la concentration en stilbénoïdes [Simmler C. 2010], il est probable qu'un extrait d'*A.rosea* s'avère plus actif qu'un extrait de *V. coerulea.* Cette hypothèse reste à confirmer par des données expérimentales.

Dans cette optique, nous soulevons ici l'appartenance de ces métabolites à la classe chimique des stilbénoïdes, qui sont eux même au sens large des polyphénols. La molécule phare de cette classe chimique est sans doute le *trans*-resvératrol. Il serait intéressant d'évaluer les stilbénoïdes d'*Aerides rosea* et de comparer leurs activités liées au vieillissement. Parmi ses nombreuses propriétés, on peut citer ici par exemple:

- l'activité **anti-inflammatoire** en inhibant directement l'activité de la COX-2 [Athar M. *et al.* 2009] et en inhibant l'expression des biomarqueurs inflammatoires (TNF ou tumor necrosis factor; iNOS ou inducible nitric oxide synthase, CRP ou C-reactive protein, COX-2) [Harikumar K. B. *et al.* 2008],
- l'activité **anti-oxydante** en piégeant directement les radicaux libres [Kasiotis K. M. *et al.* 2013],
- la capacité de mimer la **restriction calorique**, un phénomène biologique permettant la réduction du processus de l'inflammation et les effets du vieillissement [Harikumar K. B. *et al.* 2008 et Chung J. H. *et al.* 2012],
- l'**activation de la sirtuine SIRT1** qui permet de réguler la restriction calorique, le stress oxydant, l'inflammation, ainsi que la sénescence cellulaire et l'apoptose [Chung S. *et al.* 2010].

Plusieurs chercheurs se sont intéressés aux propriétés biologiques du resvératrol et exploré son mécanisme d'action. La **Figure IV:2** montre la variété des mécanismes dans lesquels ce métabolite est impliqué en régulant l'expression des gènes, des protéines, des marqueurs d'inflammation, la production d'enzymes etc.

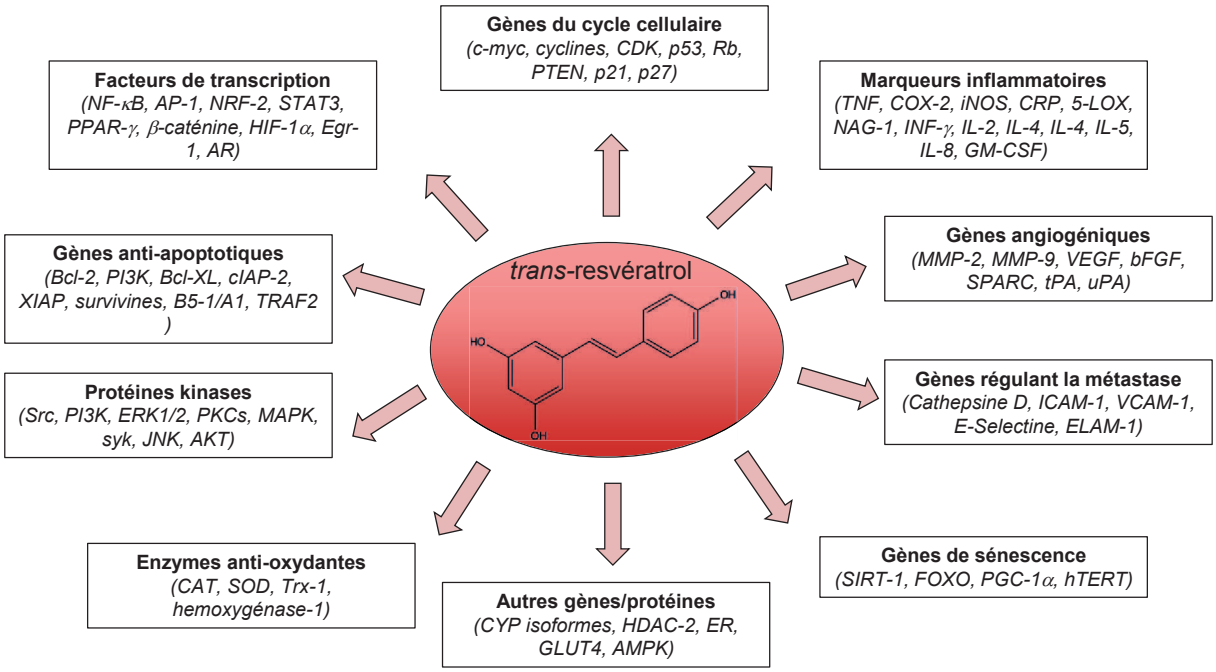


Figure IV:2: Différents produits de gènes régulés par le resvératrol (Schéma adapté de Harikumar K. B. et al. 2008]. Abbréviations: AP-1, activator protein 1; CAT, catalase; CDK, cyclin dependent kinase; COX, cyclooxygenase; CRP, C-reactive protein; CYP, cychlochrome p450; ER, estrogen receptor; ERK, extra cellularly regulated kinase; GPx, glutathione peroxidase; HIF, hypoxia inducing factor; hTERT, human telomerase reverse transcriptase; ICAM, intracellular adhesion molecule; IAP, inhibitor of apoptosis proteins; iNOS, inducible nitric oxide; MAPK, mitogen activated protein kinase; MMP, matrix metalloproteinase; NFκB, nuclear factor kappa B; PI3K, Phosphoinositide-3 kinase; Rb, retinoblastoma; SOD, superoxide dismutase, STAT, signal transducer and activator of transcription; SPARC, secreted protein acidic and rich in cysteine; TNF, tumor necrosis factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Après l'isolement des quantités suffisantes des métabolites *d'Aerides rosea,* nous envisageons de comparer leurs activités à celles de l'imbricatine, de la méthoxycoelonine et du gigantol. Cependant, leur évaluation sur les mêmes cibles n'apporterait pas de nouvelles connaissances en termes de compréhension de leur mécanisme d'action. Nous souhaitons donc orienter les évaluations biologiques vers d'autres cibles plus précises, inspirées par les activités décrites pour le resvératrol.

Ainsi, dans le cadre de la lutte contre le vieillissement cellulaire et cutané, notre cible de choix dans l'évaluation des métabolites d'*Aerides rosea,* serait **l'activation des sirtuines**. SIRT1 est la version mammalienne du gène SIR2 (**S**ilent mating type **I**nformation **R**egulation 2) de levure qui code pour la protéine Sirt1. Celle-ci agit comme une déacétylase des histones (HDAC) ou d'autres protéines dans le noyau cellulaire ou dans le cytoplasme, impliquées dans la survie et la différenciation cellulaire, l'inflammation et le métabolisme. Les situines sont considérées comme des **agents potentiels de longévité** [Wang J. *et al.* 2010; Chung S. *et al.* 2010]. La Sirt1 est capable de déacétyler des protéines clés, comme par exemple le facteur nucléaire NF-κB, le facteur de transcription FOXO3 (Forkhead box class

O) ou p53 (régulant par exemple la mitose ou la mort programmée) ou le PPAR-γ (peroxisome proliferator-activated receptor) (**Figure IV:3**).

Certains polyphénols comme le resvératrol sont en effet capables d'activer SIRT1 de façon directe ou indirecte, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* [Chung S. *et al.* 2010]. De plus, SIRT1 régule négativement la production des métalloprotéinases MMP-1 et MMP-3, jouant un rôle majeur dans le photo-vieillissement cutané, mis en évidence sur un modèle de fibroblastes humains [Ohguchi K. *et al.* 2010].

Il serait donc intéressant d'évaluer l'ensemble des métabolites des orchidées étudiées contenant les stilbénoïdes sur l'activation du gène SIRT1 dans la mesure où, à l'instar du resvératrol, les stilbénoïdes de *Vanda coerulea* ont des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et inhibitrices de l'expression des MMPs [Simmler C. 2010] et donc susceptible d'être régulées par l'activation de ce gène.

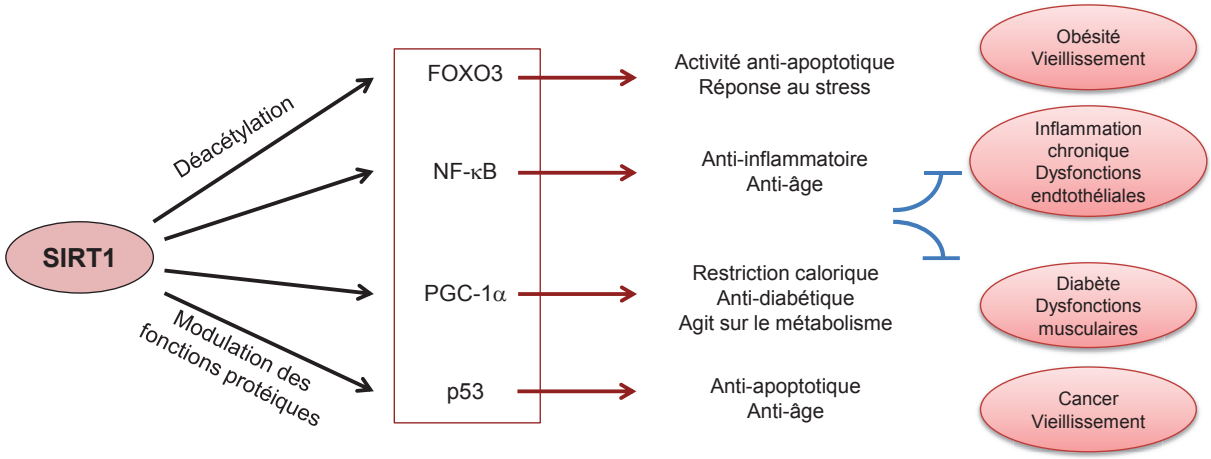


Figure IV:3: Représentation schématique du rôle de SIRT1 dans les fonctions cellulaires. SIRT1 régule une variété de processus cellulaires via la déacétylation des facteurs de transcription et des protéines contrôlant ainsi la progression des maladies métaboliques et inflammatoires chroniques aussi bien que le cancer. Schéma adapté de Chung S. *et al.* 2010.

c. Quantification des métabolites communs

Nous avons réalisé tout au long de notre travail des études semi-quantitatives. Une quantification en utilisant des techniques chromatographiques couplées aux méthodes spectroscopiques, devrait être réalisée pour l'ensemble des métabolites identifiés afin d'assurer la traçabilité des matières premières pour des recherches futures et/ou pour suivre la qualité des extraits destinés à une valorisation industrielle.

d. Exploration des orchidées taxonomiquement et géographiquement éloignées

A ce jour, nous nous sommes intéressés principalement à 4 espèces de la sous-famille des Epidendroïdées et la sous-tribu des Aeridinae. Des analyses phytochimiques comparatives d'autres orchidées du genre *Vanda* ont été initiées par Charlotte Simmler. Ses résultats montrent d'une part la présence de stilbénoïdes dans les tiges de *Vanda brunnea* (identiques à ceux présents dans *V. coerulea,* et par conséquent *Aerides rosea*), et d'autre part la présence de composés de type hydroxy-benzyles et l'acide eucomique dans les tiges de *Vanda denisoniana.* Ses observations, combinées aux données de la littérature précédemment discutées, suggèrent une éventuelle spécificité de ces métabolites dans les genres *Vanda* et *Aerides*. Il est donc fortement probable qu'en étudiant d'autres espèces taxonomiquement voisines, des structures similaires ou proches de celles déjà identifiés seront trouvées et constitueront des marqueurs taxonomiques potentiels.

En quête des molécules structurellement originales et dans un but d'approfondissement des connaissances fondamentales sur les orchidées, d'autres espèces appartenant à des tribus et sous-tribus très éloignées devront être explorées. Par conséquent, nous devrions dans le futur étendre notre recherche sur des espèces taxonomiquement, voire géographiquement éloignées. Ainsi nous pourrons à terme évaluer si cette stratégie apporte ou non des différences significatives en termes d'originalité et de spécificité de composition phytochimique.

C. Purification des marqueurs de *Vanda teres* par CPC-Exploration de nouvelles cibles biologiques

Dans le chapitre III, partie I, nous avons décrit la purification des marqueurs biologiques de *Vanda teres* (vandatérosides I à III et l'acide eucomique) par CPC. Nous avons isolé quelques dizaines à centaines de molécules purifiées dans l'optique d'élargir les explorations biologiques de cette orchidée.

Un certain nombre de propriétés biologiques a déjà été évalué par Charlotte Simmler. Dans un premier temps, les extraits de *Vanda teres* ont été comparés sur les mêmes cibles biologiques associées aux processus d'oxydation (neutralisation des radicaux DPPH et •OH), d'inflammation (inhibition de la production de PGE-2 et d'interleukine 8 par les kératinocytes) et de dégradation de la matrice dermique (inhibition de la production de MMP-

1, 2 et 9 par les fibroblastes et les kératinocytes). Cependant, les résultats obtenus se sont montrés décevants et de nouvelles cibles biologiques des vandatérosides ont été sélectionnées. Entre autres, une des caractéristiques du vieillissement est une diminution du fonctionnement mitochondrial et par conséquent de l'apport énergétique cellulaire. Au vu du haut poids moléculaire des vandatérosides, il est peu probable qu'ils pénètrent dans le derme. Les évaluations biologiques ont donc été orientées sur les cellules de l'épiderme, et focalisées notamment sur le ralentissement de la différenciation des kératinocytes et sur l'affaiblissement de la barrière cutanée due à l'âge.

Sur l'ensemble des résultats obtenus, il a été montré que le vandatéroside II et, dans une moindre mesure, le vandatéroside I stimulent l'activité enzymatique des complexes I et II et de la cytrochrome C oxydase de la chaîne respiratoire mitochondriale. De plus, ces deux composés favorisent l'expression de trois protéines de différenciation des kératinocytes (l'involucrine, la desmogléine I et la transglutaminase I), contribuant au renouvellement de l'épiderme.

Ces résultats à la fois positifs et négatifs (effet décevant sur les cibles de *V. coerulea*), permettent de nous guider dans la suite de l'exploration future des propriétés biologiques des marqueurs de *Vanda teres.* Il a été démontré qu'aucune de ces molécules n'induit de biogénèse mitochondriale. Leurs activités biologiques sont directement liées à une stimulation du fonctionnement basal des systèmes enzymatiques de la chaîne respiratoire, et non à une augmentation du nombre de mitochondries intracellulaires [Simmler C. 2010]. Afin d'évaluer sans équivoque le maintien du métabolisme énergétique des kératinocytes et mieux comprendre le mécanisme d'action des vandatérosides et de l'acide eucomique, Charlotte Simmler a proposé un approfondissement de leurs investigations biologiques qui nécessite des quantités importantes de molécules purifiées. Nous avons isolé des dizaines à centaines de milligrammes de ces biomarqueurs à partir d'un extrait standard de *Vanda teres*. Nous pourrons donc poursuivre son travail en se basant sur les résulats obtenus et les suggestions des expérimentations futures en mesurant :

- la production d'ATP,
- la concentration en calcium libre intracellulaire,
- leurs effets sur l'induction de l'apoptose.

Les processus de différenciation cellulaire ou tissulaire sont exigeants en termes d'énergie qui est fournie par l'adénosine triposphate (ATP). Dans la matrice mitochondriale, les protons sont pompés via une phosphorylation oxydative dans l'espace intermembranaire,

créant ainsi un potentiel électrique membranaire (delta psi $\Delta\Psi$) qui joue un rôle moteur pour la production d'ATP. Une étude récente a démontré que la microscopie à fluorescence est un outil capable de quantifier le potentiel $\Delta\Psi$ mitochondrial dans des cultures de fibroblastes et ainsi découvrir des défaillances potentielles [De Paepe B. *et al.* 2012]. Dans notre cas, cette quantification du potentiel électrochimique membranaire utilisé pour la conversion d'ADP (adénosine diphopsphate) en ATP, permettrait de relier l'effet des vandatérosides et de l'acide eucomique à la stimulation du métabolisme énergétique.

Partant du principe que les biomarqueurs de *Vanda teres* favorisent l'expression des protéines de différenciation de kératinocytes, il serait intéressant de mieux comprendre leur mode d'action. Il est connu que les ions calcium (Ca^{2+}) régulent le processus de différenciation des kératinocytes en impliquant un certain nombre de voies de signalisation qui incluent l'activation des protéines kinases C et des phospholipases C [Bikle D.D. *et al.* 2001]. Une augmentation des teneurs en calcium libre cytosolique $[Ca^{2+}]_i$ est en effet indispensable à l'expression de protéines calcium-dépendantes qui jouent un rôle dans la différenciation des kératinocytes. Une augmentation du calcium intracellulaire mitochondrial active également les enzymes de la chaîne respiratoire, dont l'ATP synthase [Brookes P. S. *et al.* 2004]. Si les vandatérosides et l'acide eucomique induisent une augmentation en calcium intracellulaire au sein des mitochondries, cette action serait liée à la stimulation des enzymes de la chaîne respiratoire et la différenciation des kératinocytes, observée dans les travaux antérieurs de notre laboratoire. Cette concentration du calcium libre intracellulaire pourrait être mesurée par spectrofluorimétrie, grâce à une sonde fluorescente sensible au calcium (sonde Indo-1). Elle pénètre facilement dans la cellule où elle subit une hydrolyse et la forme acide ainsi libérée se lie aux ions calcium [Bordat P. *et al.* 2003].

Afin de réguler un cycle cellulaire et maintenir un équilibre, tout renouvellement ou différenciation est étroitement lié à l'apoptose, une mort cellulaire programmée qui permet un remodelage des organes et des tissus. Elle sert aussi à éliminer les cellules qui présentent des dommages irréparables. Ainsi, dans le cas du photo-vieillissement, l'apoptose est nécessaire à l'élimination de cellules altérées par les rayonnements UV et ainsi prévenir une inflammation. La mort cellulaire programmée est étroitement liée au processus de différenciation de l'épiderme. Dans ce processus, elle est initiée au niveau de la couche basale, tandis que l'expression des protéines de différenciation se déroule au niveau des couches supérieures [Candi E. *et al.* 2005]. Plusieurs signaux peuvent induire l'apoptose, les mitochondries interviennent dans cette signalisation par voie intrinsèque. En effet, suite à un stimuli apoptotique, les mitochondries relarguent le cytochrome C qui forme ainsi des apoptosomes, des complexes protéiques cytoplasmiques activant des protéines pro-

apoptotiques [Steller H. 2004]. De plus, une forte augmentation de la concentration en calcium intracellulaire mitochondrial provoque le stress oxydant qui induit la mort cellulaire [Brookes P. S. *et al.* 2004]. Ainsi, si les vandatérosides et l'acide eucomique agissent sur le flux calcique, ils pourraient également réguler le cycle cellulaire en favorisant ou en retardant l'induction de l'apoptose. Ils pourraient agir également au niveau de l'expression des marqueurs impliqués dans la régulation de la mort cellulaire programmée, comme par exemple les caspases (pro-apoptotiques) ou des familles de protéines Bcl-2 (anti-apoptotiques). Leur quantification pourrait être effectuée par une expérience impliquant des interactions protéine-protéine par le principe d'immunofluorescence (observation par des méthodes de microscopie) [Wong C. *et al.* 2012].

D. Optimisation des conditions de culture et teneurs en métabolites d'intérêt

Nous avons décrit dans le Chapitre III (Partie II) l'étude de *Vanda coerulea* et *Vanda teres* à différents stades de maturation et différentes périodes de prélèvement des échantillons provenant d'une serre. Cependant, en raison d'un échantillonnage limité et de la logistique difficile à mettre en place pour les spécimens en provenance d'Asie, nous avons dégagé des tendances bien plutôt que des règles. En effet, nous ne pouvons pas généraliser nos résultats et affirmer avec certitude le lien entre ces facteurs et la teneur en leurs marqueurs phytochimiques. Afin de bénéficier de matières premières de qualité constante, elles sont actuellement récoltées toujours à la même période de l'année et au même stade végétatif.

Idéalement, la quantification des métabolites d'intérêt devrait être effectuée une à plusieurs fois par an, toujours à la même période de l'année, en comparant des spécimens fleuris et sans fleurs pour établir avec certitude une corrélation entre ces facteurs et la teneur en marqueurs phytochimiques et biologiques de ces deux espèces.

La biosynthèse des métabolites secondaires peut être stimulée par plusieurs facteurs environnementaux biotiques ou abiotiques. Ainsi, pour augmenter les teneurs des métabolites d'intérêt, des essais impliquant le principe d'élicitation pourraient être envisagés dans la serre à Genève. Les éliciteurs peuvent être des molécules ou des microorganismes stimulant la défense naturelle des plantes. Des expérimentations induisant volontairement un stress biotique ou abiotique pourraient ainsi augmenter la biosynthèse des principales

molécules d'intérêt chez les orchidées étudiées, que ce soit des stilbénoïdes ou des vandatérosides.

E. Conclusion générale

Pendant ses trois années de recherche, nous avons été plongés dans un monde passionnant des orchidées, des plantes éblouissantes par la beauté de leurs fleurs. Nous avons pu admirer leurs formes et couleurs très variées et les résultats présentés dans ce travail de thèse montre leur diversité non seulement morphologique, mais aussi leur complexité chimique qui ne cesse de nous surprendre. Même si l'on trouve des similarités chimiques au sein des espèces sélectionnées, chaque orchidée explorée dans cette étude semble avoir son métabolisme propre. Ce travail a soulevé certaines questions auxquelles nous n'avons pas encore de réponses :

- Pourquoi *Aerides rosea* contient les mêmes métabolites que *Vanda coerulea*, mais en plus forte concentration?
- Pourquoi contient-elle encore plus de molécules différentes que *V. coerulea* ?
- Quel est le rôle exact de ces métabolites au sein de la plante ?
- Pourquoi la composition des tiges d'*Acampe rigida* est-elle si différente des feuilles ?

Nous ne pouvons que constater que leur métabolisme mérite d'être plus profondément exploré afin d'approfondir encore plus nos connaissances actuelles. Avec presque 30 000 orchidées répertoriées, le travail qui s'articule autour des 4 espèces étudiées, n'est qu'une infime contribution à un univers bien complexe.

Enfin, toute avancée scientifique est accompagnée d'innovations technologiques et nous avons eu la chance de pouvoir manipuler des technologies de dernière génération, très variées. Grâce à nos différents travaux, nous avons avancé non seulement dans la connaissance fondamentale sur la famille des Orchidacées, mais avons également eu l'opportunité d'appliquer des technologies de pointe et illustrer tout leur intérêt dans le domaine de la pharmacognosie.

Annexes

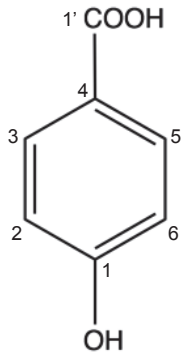
Veronika Cakova 2013

A. Caractéristiques physico-chimiques et spectrales des composés identifiés

A. I. Composés identifiés dans les feuilles d'*Acampe rigida*

Acide 4-hydroxybenzoïque

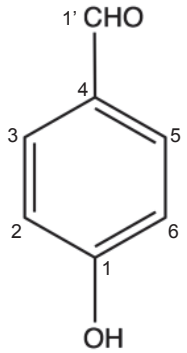
Structure



Nom chimique :	Acide 4-hydroxybenzoïque ou acide *para*-hydroxybenzoïque
Numéro CAS :	99-96-7
Aspect :	solide blanc
UV (MeOH/H_2O) λ_{max} :	207, 255 nm
Formule moléculaire:	$C_7H_6O_3$
Poids moléculaire :	138.1214 Da
Masse exacte :	138.0317 Da
GC-EI-MS : *m/z*	138
RMN ^1H (400 MHz) CD_3OD :	δ 7.87 (2H, *d*, *J* = 8.8 Hz, H-2 et H-6), 6.82 (2H, *d, J* = 8.8 Hz, H-3 et H-5).

4-hydroxybenzaldéhyde

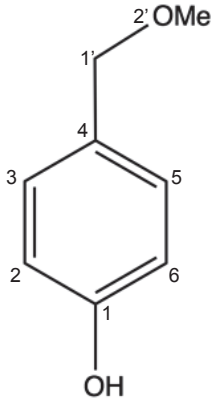
Structure



Nom chimique :	4-hydroxybenzaldéhyde ou *para*-hydroxybenzaldéhyde
Numéro CAS :	123-08-0
Aspect :	poudre brune rougeâtre
UV (MeOH/H_2O) λ_{max} :	220, 280 nm
Formule moléculaire:	$C_7H_6O_2$
Poids moléculaire :	122.1220 Da
Masse exacte :	122.0368 Da
GC-EI-MS : *m/z*	122
RMN ^1H (400 MHz) CD_3OD :	δ 9.67 (1H, *s,* 1'-CHO), 7.68 (2H, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-2 et H-6), 6.82 (2H, *d, J* = 8.6 Hz, H-3 et H-5).

4-méthoxyméthyl-phénol

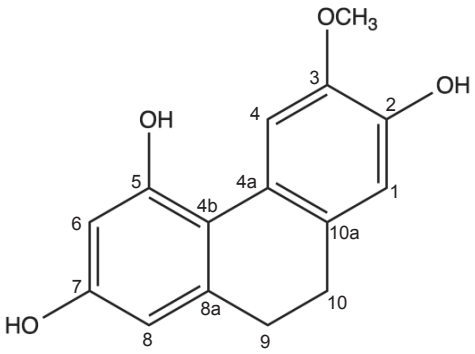
Structure



Nom chimique :	4-méthoxyméthyl phénol
Numéro CAS :	5355-17-9
Aspect :	Poudre brunâtre
UV (MeOH/H_2O) λ_{max} :	227, 275 nm
Formule moléculaire:	$C_8H_{10}O_2$
Poids moléculaire :	138.1646 Da
Masse exacte :	138.0681 Da
GC-EI-MS : *m/z*	138
RMN ^1H (400 MHz) CD_3OD :	δ 7.05 (2H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-2 et H-6), 6.65 (2H, *d, J* = 8.5 Hz, H-3 et H-5), 4.24 (2H, *s,* 1'-CH_2), 3.22 (3H, *s,* 2'-O-CH_3).

A. II. Dérivés phénanthréniques identifiés *on-line* par HPLC-DAD-MS-SPE-UV/RMN dans les tiges d'*Aerides rosea*

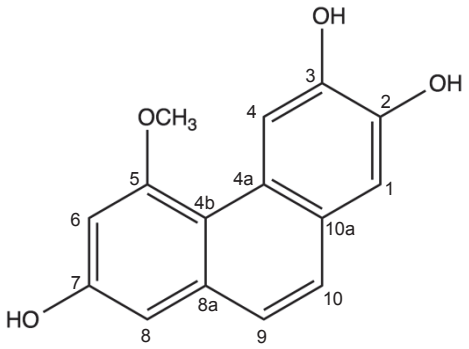
Aérosine



Structure

Nom chimique :	3-méthoxy-9,10-dihydro-2,5,7-phénanthrènetriol
UV (ACN/H_2O) λ_{max} :	219, 276, 303 nm
Formule moléculaire:	$C_{15}H_{14}O_4$
Poids moléculaire :	258.2707 Da
Masse exacte :	258.0892 Da
ESI-QToF-MS : *m/z*	259.0970 $[M+H]^+$
RMN ^1H (500 MHz) CD_3OD :	δ 8.00 (1H, *s*, H-4), 6.62 (1H, *s*, H-1), 6.26 (1H, *d, J* = 2.4 Hz, H-6), 6.21 (1H, *d, J* = 2.4 Hz, H-8), 3.84 (3H, *s,* 3-O-CH_3), 2.59 (4H, *m*, H_2-9 et H_2-10).
RMN ^{13}C(données HSQC et HMBC) (500 MHz) CD_3OD :	δ 157.4 (C-7), 156.8 (C-5), 146.3 (C-3), 145.0 (C-2), 141.6 (C-8a), 131.7 (C-10a), 126.9 (C-4a), 115.4 (C-1), 115.3 (C-4b), 113.7 (C-4), 108.1 (C-8), 102.9 (C-6), 56.4 (-O-CH_3), 31.4 (C-9 et C-10).

Aérosanthrène



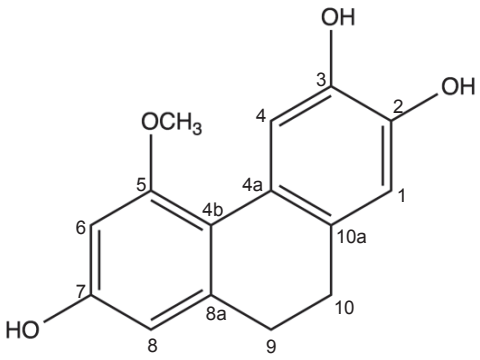
Structure

Nom chimique :	5-méthoxyphénanthrène-2,3,7-triol
UV (ACN/H_2O) λ_{max} :	260 nm
Formule moléculaire:	$C_{15}H_{12}O_4$
Poids moléculaire :	256.2548 Da
Masse exacte :	256.0736 Da
ESI-QToF-MS : *m/z*	257.0806 $[M+H]^+$
RMN ^1H (500 MHz) CD_3OD :	δ 8.95 (1H, *s*, H-4), 7.43 (1H, *d*, *J* = 8.8 Hz, H-10), 7.30 (1H, *d*, *J* = 8.8 Hz, H-9), 7.12 (1H, *s,* H-1), 6.77 (1H, *d, J* = 2.4 Hz, H-8), 6.70 (1H, *d, J* = 2.4 Hz, H-6), 4.07 (3H, *s,* 5-O-CH_3).

RMN ^{13}C(données HSQC et HMBC) (500 MHz) CD_3OD :

δ 161.1 (C-5), 157.2 (C-7), 146.9 (C-3), 145.6 (C-2), 136.5 (C-8a), 128.4 (C-10), 127.9 (C-4a), 125.8 (C-10a), 124.9 (C-9), 115.9 (C-4b), 113.7 (C-4), 113.3 (C-1), 105.5 (C-8), 99.9 (C-6), 56.5 (-O-CH_3).

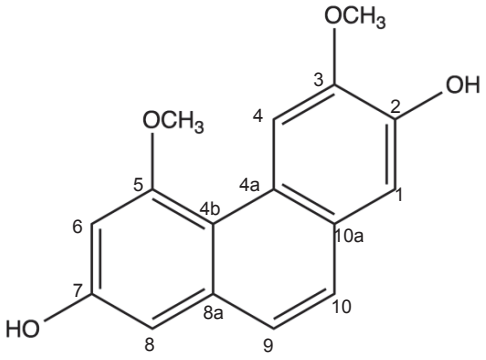
5-méthoxy-9,10-dihydro-2,3,7-phénanthrènetriol



Structure

Nom chimique :	5-méthoxy-9,10-dihydro-2,3,7-phénanthrènetriol
UV (ACN/H_2O) λ_{max} :	217, 276, 303 nm
Formule moléculaire:	$C_{15}H_{14}O_4$
Poids moléculaire :	258.2707 Da
Masse exacte :	258.0892 Da
ESI-QToF-MS : *m/z*	259.0972 $[M+H]^+$
RMN ^1H (500 MHz) CD_3OD :	δ 7.73 (1H, *s*, H-4), 6.60 (1H, *s*, H-1), 6.38 (1H, *d*, *J* = 2.4 Hz, H-6), 6.29 (1H, *d, J* = 2.4 Hz, H-8), 3.83 (3H, *s,* 5-O-CH_3), 2.61 (2H, *br s*, H_2-9), 2.55 (2H, *br s*, H_2-10).

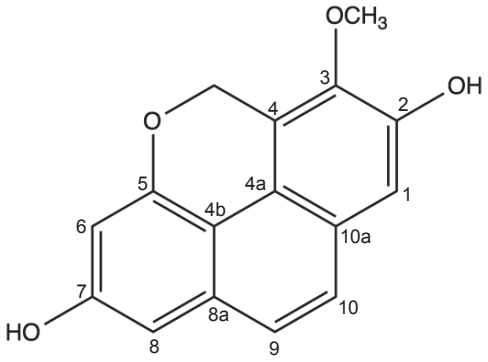
3,5-diméthoxyphénanthrène-2,7-diol



Structure

Nom chimique :	3,5-diméthoxyphénanthrène-2,7-diol
UV (ACN/H_2O) λ_{max} :	262 nm
Formule moléculaire:	$C_{16}H_{14}O_4$
Poids moléculaire :	270.2815 Da
Masse exacte :	270.0892 Da
ESI-QToF-MS : *m/z*	271.0955 $[M+H]^+$
RMN ^1H (500 MHz) CD_3OD :	δ 9.07 (1H, *s*, H-4), 7.47 (1H, *d*, *J* = 8.8 Hz, H-10), 7.37 (1H, *d*, *J* = 8.8 Hz, H-9), 7.16 (1H, *s*, H-1), 6.80 (1H, *d*, *J* = 2.4 Hz, H-8), 6.74 (1H, *d, J* = 2.4 Hz, H-6), 4.10 (3H, *s,* 5-O-CH_3), 4.04 (3H, *s,* 3-O-CH_3).

3-méthoxy-2,7-dihydro-5H-phénanthro[4,5-bcd]pyrane



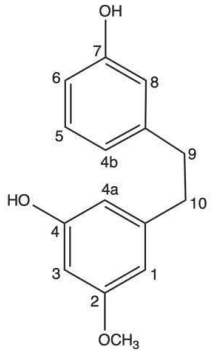
Structure

Nom chimique :	3-méthoxy-2,7-dihydro-5H-phénanthro[4,5-bcd]pyrane
UV (ACN/H_2O) λ_{max} :	224, 267, 297 nm
Formule moléculaire:	$C_{16}H_{12}O_4$
Poids moléculaire :	268.2656 Da
Masse exacte :	268.0736 Da
ESI-QToF-MS : *m/z*	269.0792 $[M+H]^+$
RMN ^1H (500 MHz) CD_3OD :	δ 7.48 (1H, *d*, *J* = 9.0 Hz, H-10), 7.45 (1H, *d*, *J* = 9.0 Hz, H-9), 7.15 (1H, *s*, H-1), 6.76 (1H, *d*, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.54 (1H, *d, J* = 2.1 Hz, H-6), 5.58 (2H, *s,* 5-O-CH_2-Ar), 3.91 (3H, *s,* 3-O-CH_3).

A. III. Composés isolés à partir des tiges d'*Aerides rosea*

Batatasine III

Structure :



Nom chimique : 3,3'-dihydroxy-5-méthoxybibenzyl

Numéro CAS : 56684-87-8

Aspect : poudre amorphe

UV (MeOH/H_2O) λ_{max} : 202, 280 nm

Formule moléculaire: $C_{15}H_{16}O_3$

Poids moléculaire : 244.2871 Da

Masse exacte : 244.1099 Da

ESI-QToF-MS : *m/z* 245.1170 $[M+H]^+$

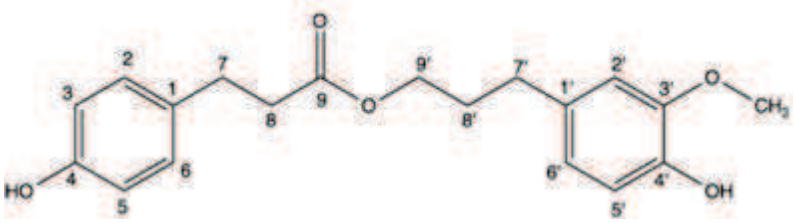
RMN ^1H (400 MHz) CD_3COCD_3 : δ 7.08 (1H, *t*, *J* = 7.8 Hz, H-5), 6.72 (1H, *t*, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.70 (1H, *ddd*, *J* = 7.8, 2.1, 0.8 Hz, H-4b), 6.65 (1H, *ddd*, *J* = 7.8, 2.1, 0.8 Hz, H-6), 6.33 (1H, *t, J* = 2.3, H-4a), 6.31 (1H, *t, J* = 2.3 Hz, H-1), 6.24 (1H, *t, J* = 2.3 Hz, H-3), 3.71 (3H, *s,* 2-O-CH_3), 2.80 (4H, *br s,* H_2-9 et H_2-10).

RMN ^{13}C (données HSQC et HMBC) (400 MHz) CD_3OD :

δ 161.5 (C-2), 154.1 (C-4), 154.0 (C-7), 144.1 (C-10a et C-8a), 130.1 (C-5), 120.7 (C-4b), 166.3 (C-

8), 113.8 (C-6), 109.3 (C-4a), 106.2 (C-1), 100.1 (C-3), 55.5 (2-O-CH_3), 38.7 (C-9 et C-10).

Acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique

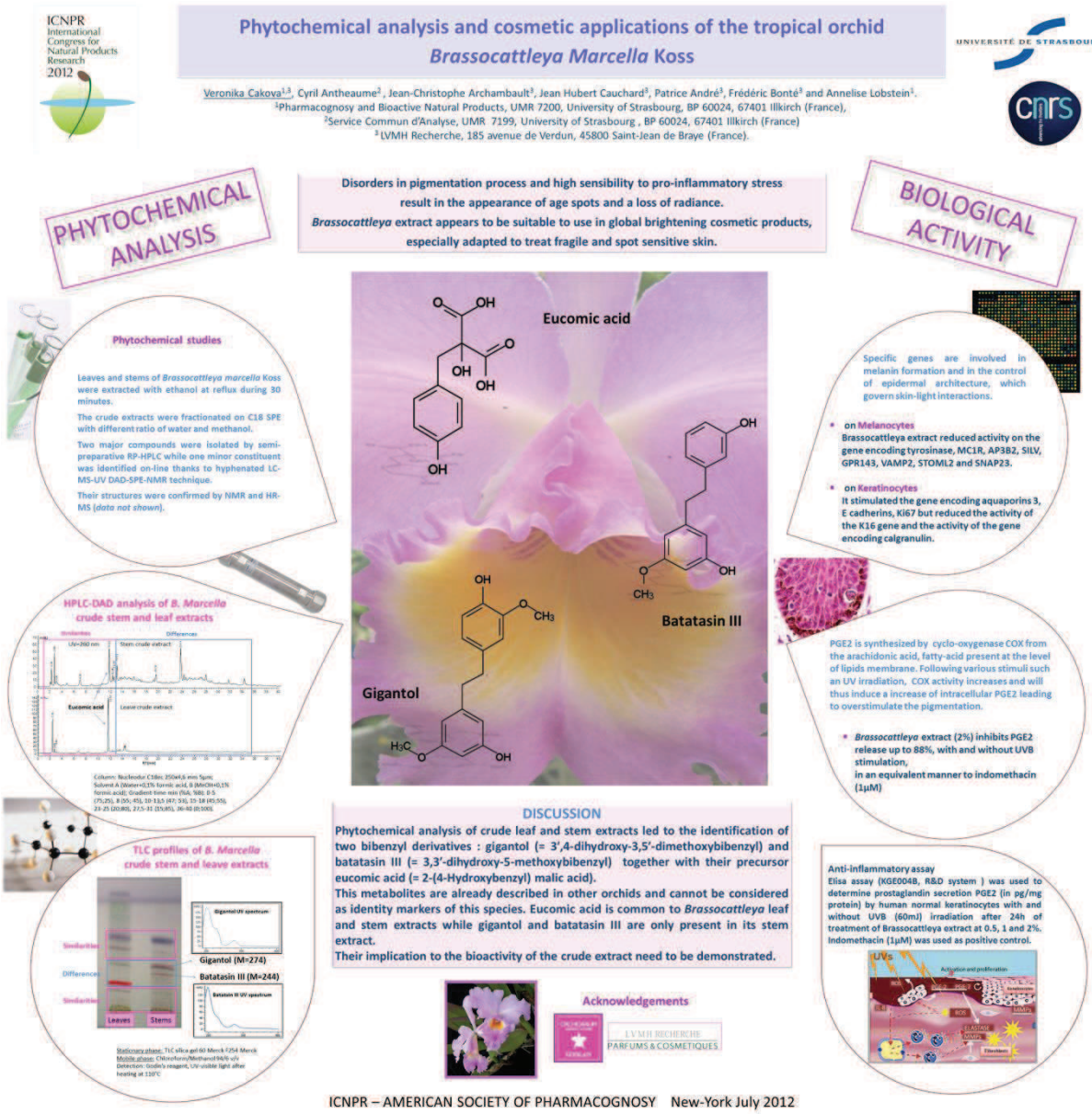


Structure :

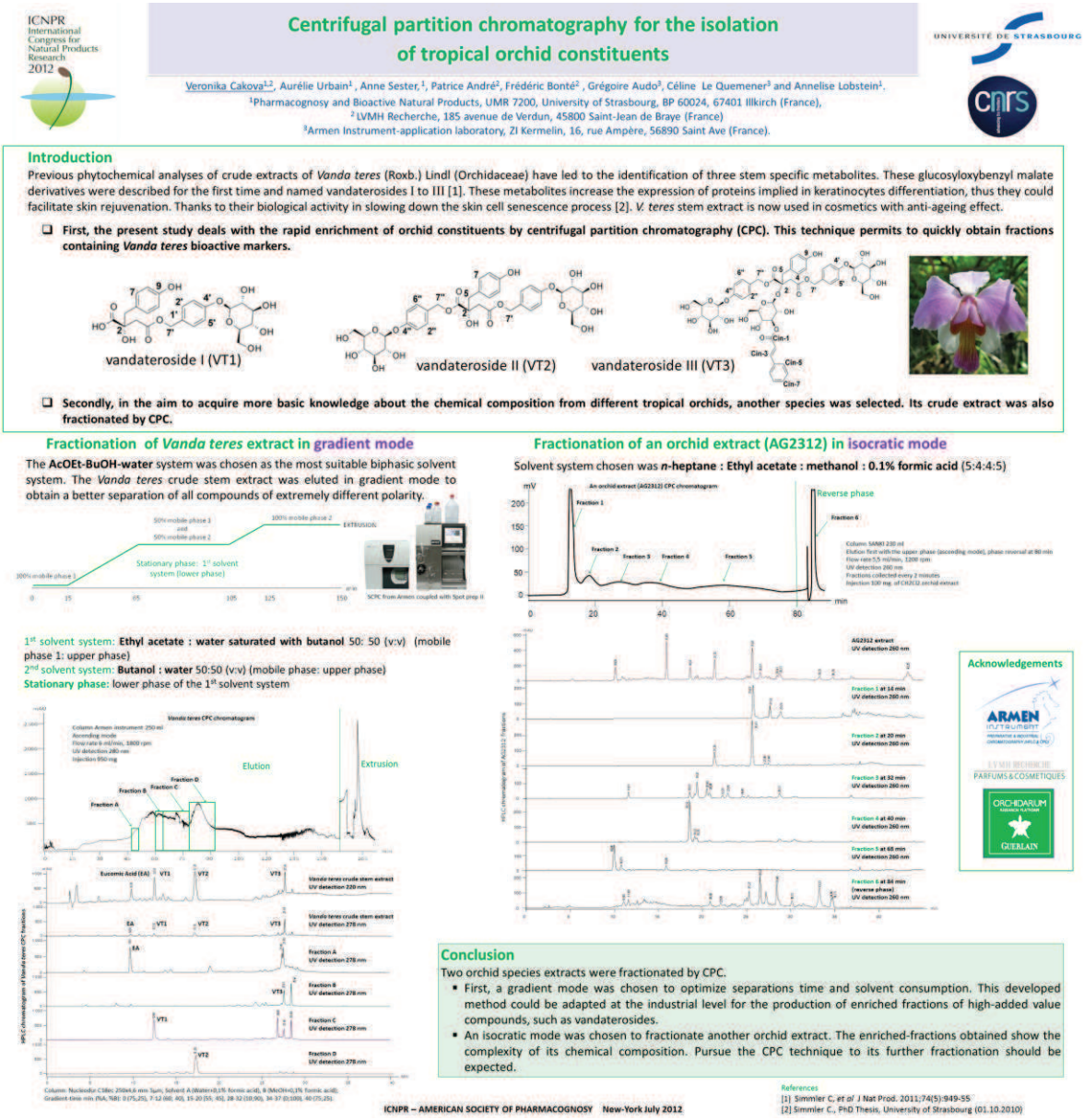
Nom chimique :	Acide dihydroconiféryl dihydro-*p*-coumarique
Aspect :	poudre amorphe incolore
UV (MeOH/H_2O) λ_{max} :	225, 280 nm
Formule moléculaire:	$C_{19}H_{22}O_5$
Poids moléculaire :	330.3768 Da
Masse exacte :	330.1467 Da
ESI-QToF-MS : *m/z*	331.1541 $[M+H]^+$
RMN ^1H (400 MHz) CD_3OD :	δ 7.03 (2H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-2 et H-6), 6.72 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-2'), 6.70 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.68 (2H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-3 et H-5), 6.57 (1H, *dd, J* = 8.0, 2.0, H-6'), 4.03 (1H, *t, J* = 6.5 Hz, H-9'), 3.81 (3H, *s,* 3'-O-CH_3), 2.81 (1H, *t, J* = 7.5 Hz, H-7), 2.58 (1H, *t, J* = 7.5 Hz, H-8), 2.53 (1H, *t, J* = 6.5 Hz, H-7'), 1.85 (1H, *q*, *J* = 6.5 Hz, H-8').
RMN ^{13}C (400 MHz) CD_3OD :	δ 175.18 (C-9), 157.03 (C-4), 149.09 (C-3'), 145.88 (C-4'), 134.37 (C-1'), 132.88 (C-1), 130.46 (C-2 et C-6), 122.05 (C-6'), 116.42 (C-3 et C-5), 116.35 (C-5'), 113.37 (C-2'), 65.09 (C-9'), 56.59 (3'-O-CH_3), 37.42 (C-8), 32.86 (C-7'), 31.82 (C-8'), 31.42 (C-7).

B. Communications écrites (posters) présentés à des congrès internationaux

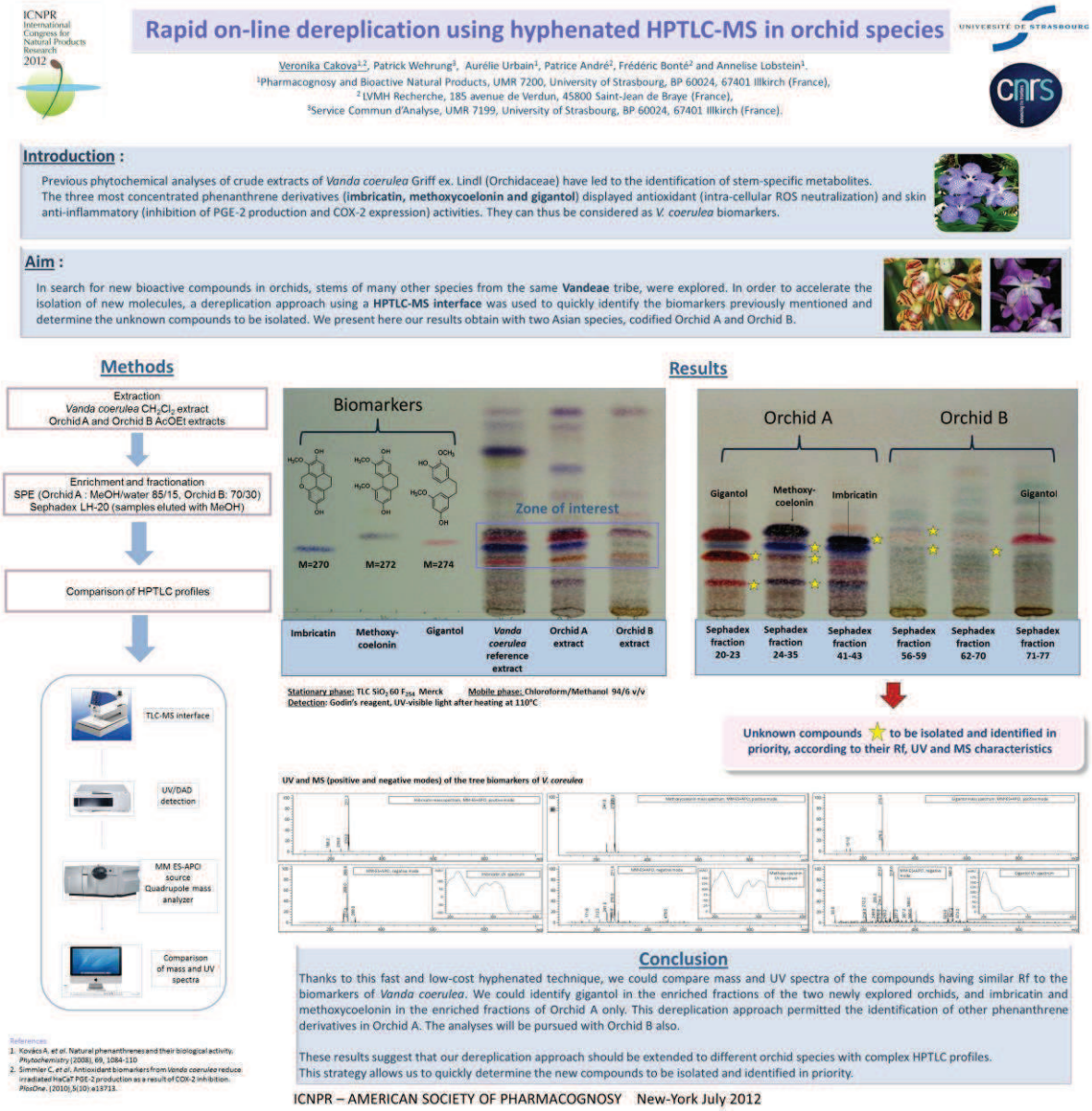
Cakova V., Antheaume C., Archambault J.C., Cauchard J.H., André P., Bonté F. et Lobstein, A. (2012) Phytochemical analysis and cosmetic applications of the tropical orchid Brassocattleya marcella Koss. *International Congress on Natural Products Research on Global Change, Natural Products and Human Health/8th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE and SIF, New York, Etats-Unis* (27 juillet-1 août 2012), Planta Medica, Vol. 78 (11): 1248-1248.



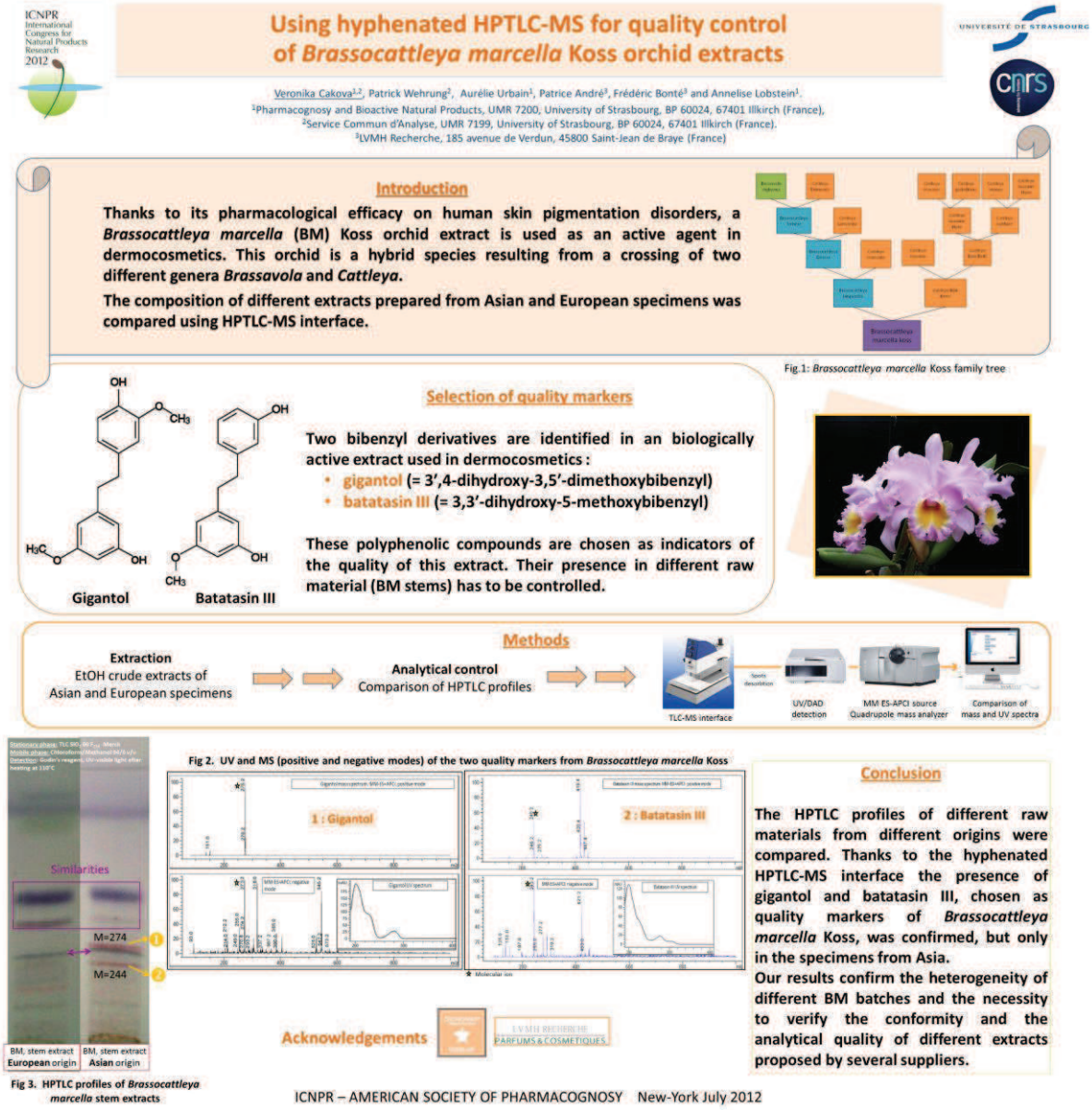
Cakova V., Urbain A., Sester A., André, P., Bonté, F. et Lobstein A. (2012) Centrifugal partition chromatography for the isolation of tropical orchid constituents. *International Congress on Natural Products Research on Global Change, Natural Products and Human Health/8th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE and SIF, New York, Etats-Unis* (27 juillet-1 août 2012), Planta Medica, Vol. 78 (11): 1271-1271.



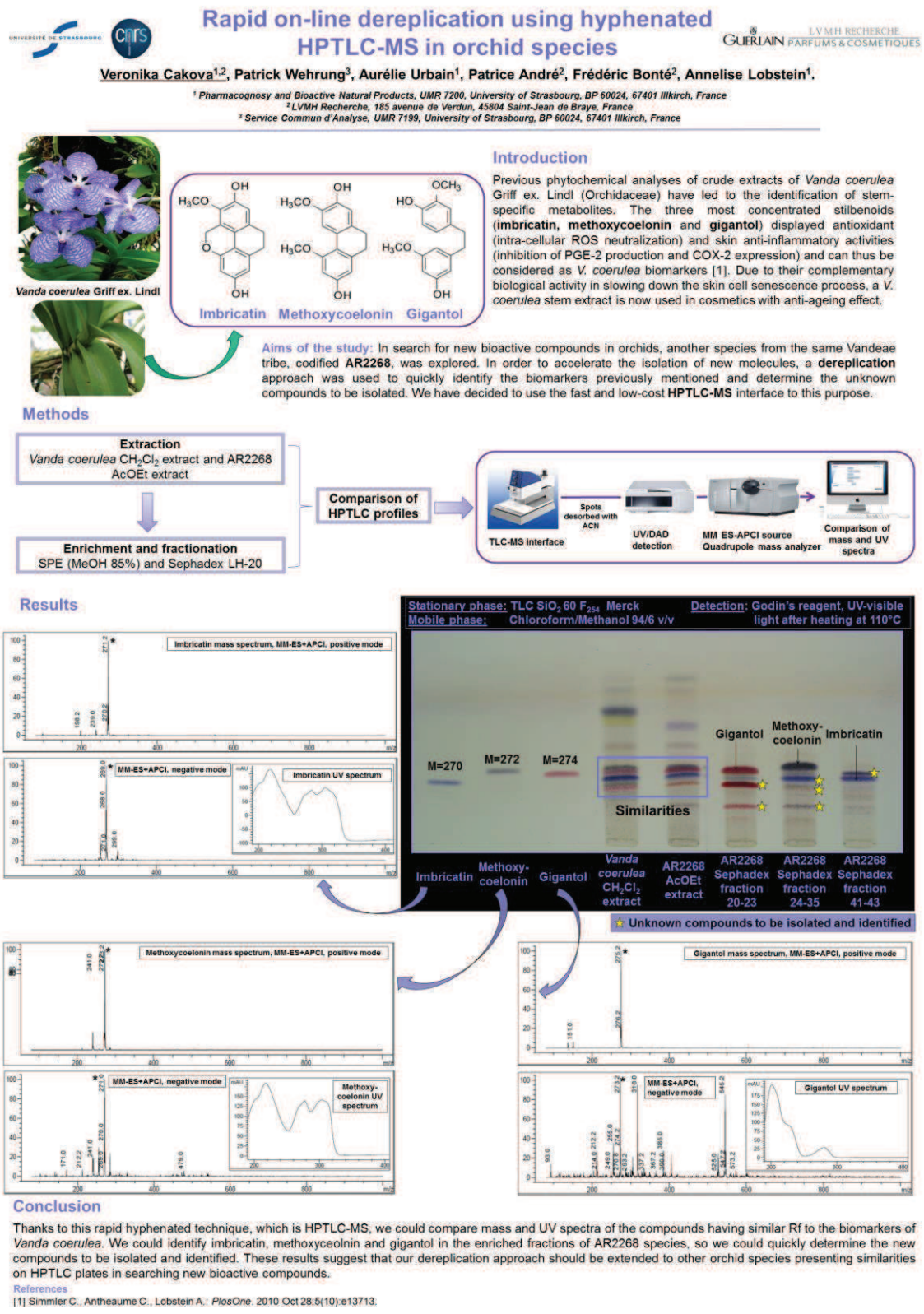
Cakova V., Wehrung P, Urbain A., André P., Bonté F. et Lobstein A. (2012) Rapid on-line dereplication by HPTLC-MS interface in orchid extracts. *International Congress on Natural Products Research on Global Change, Natural Products and Human Health/8th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE and SIF, New York, Etats-Unis* (27 juillet-1 août 2012), Planta Medica, Vol. 78 (11): 1271-1272.



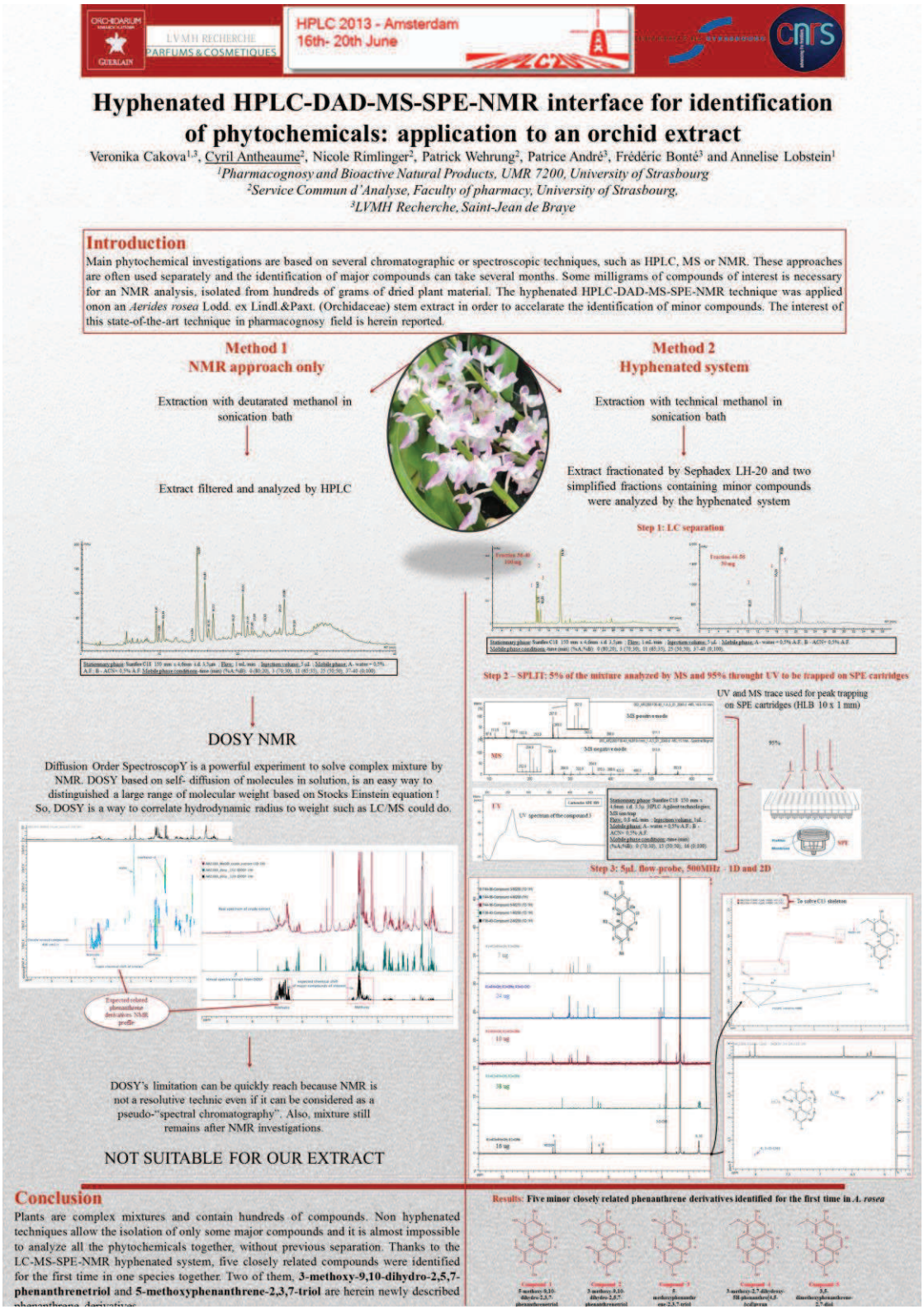
Cakova V., Wehrung P, Urbain A., André P., Bonté F. et Lobstein A. (2012) Using hyphenated HPTLC-MS for quality control of *Brassocattleya marcella* Koss orchid extracts. *International Congress on Natural Products Research on Global Change, Natural Products and Human Health/8th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE and SIF, New York, Etats-Unis* (27 juillet-1 août 2012), Planta Medica, Vol. 78 (11): 1272-1272.



Cakova V., Wehrung P, Urbain A., André P., Bonté F., Lobstein A. (2012) Rapid on-line dereplication using hyphenated HPTLC-MS in orchid species. *8th international symposium on chromatography of natural products, Lublin, Pologne* (17-20 mai 2012) et *Journées du campus d'Illkirch (JCI), Illkirch Graffenstaden, France* (avril 2012).



Cakova V., Antheaume C., Rimlinger N., Wehrung P., André P., Bonté F. et Lobstein A. (2013) Hyphenated HPLC-DAD-MS-SPE-NMR interface for identification of phytochemicals: application to an orchid extract. *HPLC2013: 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques*, Amsterdam, Pays-Bas (16-20 juin 2013).



Cakova V., Wehrung P., André P., Bonté F. et Lobstein A. (2013) Simultaneous qualitative and quantitative analysis of phenanthrene derivatives in *Vanda coerulea* by LC-ESI-HR-MS/MS. *61st International congress and annual meeting of the society for medicinal plant and natural product research (GA), Münster, Allemagne* (1-5 septembre 2013).

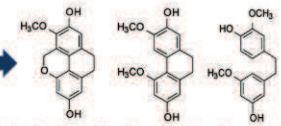
Simultaneous qualitative and quantitative analysis of phenanthrene derivatives in *Vanda coerulea* by LC-ESI-HR-MS/MS

Veronika Cakova[1,3], Patrick Wehrung[2], Patrice André[3], Frédéric Bonté[3] and Annelise Lobstein[1].
[1]Pharmacognosy and Bioactive Natural Products, UMR 7200, University of Strasbourg, BP 60024, 67401 Illkirch (France),
[2]Service Commun d'Analyse, UMR 7199, University of Strasbourg, BP 60024, 67401 Illkirch (France),
[3]LVMH Recherche, 185 avenue de Verdun, 45800 Saint-Jean de Braye (France).

State of art

Previous phytochemical analyses of crude extracts of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl (Orchidaceae) have led to the identification of stem-specific metabolites. The three most concentrated phenanthrene derivatives, **imbricatin, methoxycoelonin and gigantol**, displayed antioxidant (intra-cellular ROS neutralization) and skin anti-inflammatory (inhibition of PGE-2 production and COX-2 expression) activities. They are considered as *V. coerulea* biomarkers [1].





Imbricatin Methoxycoelonin Gigantol

Objectives

To examine qualitative and quantitative variations of these biomarkers on a population of *V. coerulea* at different vegetative stages : plants with buds, and before or during flowering.

Methodology

Collecting samples



Green house in Geneva (Switzerland)

Three types of samples:
- Specimens with buds
- Specimens without flowers, no buds
- Flowering specimens

Three different periods:
- February 2012
- July 2012
- October 2012

Collecting 1 to 3 specimens of each vegetative stage, depending on the availability of plant material

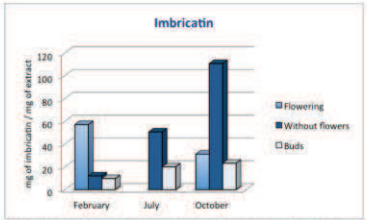
Extraction

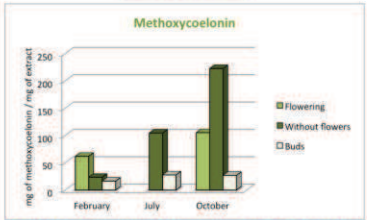
- Freeze-dried samples are extracted with CH_2Cl_2 and MeOH successively by sonication.
- A known quantity of an internal standard (rutin) was added into each solution before extraction.
- For each sample, two repeated extractions were realized.

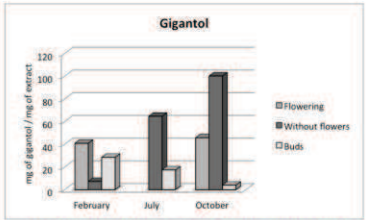
Simultaneous qualitative and quantitative analysis by LC-UV-HRMS/MS using Q-TOF mass analyzer

Pure imbricatin, methoxycoelonin and gigantol (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 and 1 µL of 1 mg/mL solution) were individually injected to construct the calibration curves for quantitative analysis. Their retention behavior and their UV, MS and MS/MS spectra allows us to create a qualitative targeted method in order to determine the content of the three metabolites of interest in each sample. 1 µL of 15 mg/mL solution of each extract was injected (LC-MS system, Agilent technologies 1200 RRLC, Agilent 6520 QTOF) and the amount of the compounds of interest was estimated following the established calibration curves. All the curves showed good linear regression (r^2>0.993). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were fixed as a signal to noise ratio with a signal three and ten times higher than that of the baseline noise, respectively, in comparison to each metabolite measured in a blank solution before each series. Each sample of the two extraction procedures was injected in triplicate.

Results







Notable differences were observed among the different vegetative stages. In February, the three metabolites are three times more concentrated in flowering plants that in those without flowers. In July, the specimens had no flowers but contained a higher amount of methoxycoelonin and gigantol than in February. In October, the quantity of the three biomarkers increased ; the results exhibit a two times higher concentration in plants without flowers. In every case, *V. coerulea* specimens in buds contained the lowest amount of the targeted metabolites.

Perspectives

This validated and sensitive method allows to better control a cultivated population of orchids in an artificial environment. If our results are confirmed on wild population growing in natural Asian biotopes, we will be able to determine the optimal conditions for collecting the high-value added plant material in order to optimize industrial valorization.

[1] Simmler C., Antheaume C., Lobstein A.: PlosOne. 2010 Oct 28;5(10):e13713.

September 2013 Münster, Germany

Acknowledgements

LVMH RECHERCHE PARFUMS & COSMETIQUES

Bibliographie
Veronika Cakova 2013

Bibliographie :

Aasen A., Behr D., Leander K. Studies on Orchidaceae glycosides 2: Structures of loroglossine and militarine, 2 glucosides from *Orchis militaris* L. *Acta chemica scandinavica series B-Organic chemistry and biochemistry*. 1975, vol. 29: 1002-1004.

Ahn E. K., Jeon H. J., Lim E. J., Jung H. J., Park E. H. Anti-inflammatory and anti-angiogenic activities of *Gastrodia elata* Blume. *Journal of ethnopharmacology,* 2007, vol. 110: 476-482.

Anuradha V., Prakasa Rao N. S., Bhaskar M. U. Orchrolic acid, a precursor to phenanthropyrones, from *Coelogyne ochracea. Phytochemistry,* 1994, vol. 36: 1515-1517.

Anuradha V., Prakasa Rao N. S. Tesselatin a phenanthropyran from *Vanda tesselata. Phytochemistry,* 1998, vol. 48: 183-184.

Anuradha V., Prakasa Rao N. S. Parviflorin a phenanthropyran from *Vanda parviflora. Phytochemistry,* 1998, vol. 48: 181-182.

Anuradha V., Prakasa Rao N. S. Aeridin: a phenanthropyran from *Aerides crispum. Phytochemistry*, 1998, vol. 48: 185-186.

Armen instrument. *Introduction to centrifugal partition chromatography*. Brochure fournie par le fabricant.

Asakawa Y., Ludwiczuk A., Nagashima F. *Chemical constituents of Bryophytes.* Editions Springer, 2013.

Athar M., Back J. H., Kopelovich L., Bickers D. R., Kim A. L. Multiple molecular targets of resveratrol: anti-carcinogenic machanisms. *Archives of biochemistry and biophysics,* 2009, vol. 486: 95-102.

Badjakov I., Nikolova M., Gevrenova R., Kondakova V., Todorovska E., Atanassov A. Bioactive compounds in small fruits and their influence on human health. *Biotechnology & biotechnological equipment,* 2008, vol. 22: 581-587.

Bai L., Kato T., Inoue K., Yamaki M., Takagi S. Blestrianol A, B and C, biphenanthrenes from *Bletilla triata. Phytochemistry,* 1991, vol. 30: 2733-2735.

Bai L., Yamaki M., Takagi S. Lignans and bichroman from *Pleione bulbocodioides. Phytochemistry*, 1996, vol. 44: 341-343.

Baller A., Corrodi H., Gaumann E., Hardegger E., Kern H., Winterhalter-Wild N. Induced defensive substances in the Orchidaceae. *Helvetica chemica acta,* 1957, vol. 40: 1062-1066.

Barreto D. W., Parente J. P. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum. Carbohydrate polymers,* 2006, vol. 64: 287-291.

Barua A. K., Ghosh B. B., Ray S., Patra A. Cymbinodin A, a phenanthroquinone from *Cymbidium aloifolium. Phytochemistry,* 1990, vol. 29: 3046-3047.

Baumann L. Skin ageing and its treatment. *Journal of pathology,* 2007, vol. 211: 241-251.

Behr D., Leander K. Three steroid glucosides of the stigmastane type from *Dendrobium ochreatum. Phytochemistry,* 1976, vol. 15: 1403-1406.

Berthod A., Ruiz-Angel M. J., Carda-Broch S. Countercurrent chromatography: People and applications. *Journal of chromatography A,* 2009, vol. 1216: 4206-4217.

Bhaskar M. U., Rao L. J. M., Prakasa Rao N. S., Rao P. R. M. Ochrone A, a novel 9,10-phenanthroquinone from *Coelogyne ochracea. Journal of natural products,* 1991, vol. 54: 386-389.

Bhoyroo V., Puchooa D., Sanmukhiya V. M., Rababakonandrianina. An assessment of factors leading to the decline of *Beclardia macrostachya* (Orchidaceae) population in Mauritius. *Advances in bioscience and biotechnology,* 2013, vol. 4 : 317-330.

Bi Z. M., Wang Z. T., Xu L. S. Two new terpenes from the orchid *Pholidota yunnanensis* Rolfe. *Journal of integrative plant biology,* 2005, vol. 47: 116-119.

Bikle D. D., Ng D., Tu C-L., Oda Y., Xie Z. Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. *Molecular and cellular endocrinology,* 2001, vol. 177: 161-171.

Birch A. J., Donovan F. W. Studies in relation to Biosynthesis. I. Some possible routes to derivatives of Orcinol and Phloroglucinol. *Australian journal of chemistry,* 1953, vol. 6: 360-368.

Blomqvist L., Leander K., Lüning B., Rosenblom J. Studies on Orchidaceae alkaloids XXIX. The absolute configuration of dendroprimine, an alkaloid from *Dendrobium primulinum* Lindl. *Acta chemica scandinavica.* 1972, vol. 26: 3203-3206.

Boerjan W., Ralph J., Baucher M. Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology,* 2003, vol. 54: 519-546.

Bordat P., Toulmé E., Savignan F., Neuzil E. Dufy B. Régulation du calcium intracellulaire dans le kératinocyte. *Bulletin de la société de pharmacie de Bordeaux,* 2003, vol. 142: 7-24.

Bringmann G., Ochse M., Herderich M., Günther C., Wolf K., Teltschik F. Isolation and structural elucidation of naphthylisoquinoline alkaloids. *Pharmaceutical and pharmacological letters,* 1998a, vol. 8: 1-4.

Bringmann G., Günther C., Schlauer J., Rückert M. HPLC-NMR on-line coupling including the ROESY technique direct characterization of naphthylisoquinoline alkaloids in crude plant extract. *Analytical chemistry,* 1998b, vol. 70: 2805-11.

Bringmann G., Rückert M., Messer K., Schupp O., Louis A. M. Acetogenic isoquinoline alkaloids. CXXI. Use of on-line high-performance liquid chromtography-nuclear magnetic resonance spectrometry coupling in phytochemical screening sudies : rapid identification of metabolites in *Dioncophyllum thollonii. Journal of chromatography A,* 1999a, vol. 837: 267-272.

Bringmann G., Messer K.,Wohlfarth M., Kraus J., Dumbuya L., Rückert M. HPLC-CD on-line coupling in combination with HPLC-NMR and HPLC-MS/MS for the determination of the full absolute stereostructure of new metabolites in plant extracts. *Analytical chemistry,* 1999b, vol. 71: 2678-2686.

Bringmann G., Rückert M., Saeb W., Mudogo V. Characterization of metabolites in plant extracts of *Ancistrocladus likoko* by high-performance liquid chromatography coupled on-line with ^{1}H NMR spectroscopy. *Magnetic resonance in chemistry*, 1999c, vol. 37: 98-102.

Bringmann G., Wohlfarth M., Rischer H., Heubes M., Saeb W., Diem S. A photometric screening method for dimeric naphthylisoquinoline alkaloids and complete on-line structural elucidation of a dimer in crude plant extracts, by the LC-MS/LC-NMR/LC-CD triad. *Analytical chemistry,* 2001, vol. 73: 2571-2577.

Bringmann G., Wohlfarth M., Rischer H., Schlauer J., Brun R. Extract screening by HPLC coupled to MS-MS, NMR, and CD : a dimeric and three monomeric naphthylisoquinoline alkaloids from *Anistrocladus griffithi. Phytochemistry,* 2002, vol. 61: 195-204.

Brookes P. S., Yoon Y., Robotham J. L., Anders M. W., Sheu S-S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American journal of physiology - cell physiology,* 2004, vol. 287: 817-833.

Bruneton J. *Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales.* Editions TEC&DOC, *4^{e} édition* 2009.

Bulpitt J. C., Li Y., Bulpitt P. F., Wang J. The use of orchids in Chinese medicine. *Journal of the royal society of medicine*, vol. 100: 558-563.

Caius J. F. The medicinal and poisonous plants of India. *Scientific publishers*, 1986.

Candi E., Schmitt R., Melino G. The cornified envelope: a model of celle death in the skin. *Nature reviews - Molecular cell biology,* 2005, vol.6: 328-340.

Cao X., Tian Y., Zhang T., Shen P., Zhu L., Ito Y. HSCCC separation of a stilbene glucoside from *Polygonum multiflorum*. *Journal of liquid chromatography and related techniques*. 1998, vol. 21 : 2897-2904.

Cavin A., Potterat O., Wolfender J-L., Hostettmann K., Dyatmyko W. Use of on-flow LC/^{1}H NMR for the study of an antioxidant fraction from *Orophea enneandra* and isolation of a polyacetylene, lignans, and a tocopherol derivative. *Journal of natural products.* 1998**,** vol. 61: 1497-501.

Chen K. K., Ling Chen A. The pharmacological action of dendrobine, the alkaloid of Chin-shin-hu. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics,* 1935, vol. 55: 319-325.

Chen CC., Huang YL., Teng CM. Antiplatelet aggregation principles from *Ephemerantha lonchophylla. Planta medica,* 2000, vol. 66: 372-374.

Chen CC., Wu LG., Ko FN., Teng CM. Antiplatelet aggregation principles of *Dendrobium loddigesii. Journal of natural products,* 1994, vol. 57: 1271-1274.

Chen X-J., Mei W-L., Zuo W-J., Zeng Y-B., Guo Z-K., Song X-Q., Dai H-F. A new antibacterial phenanthrenequinone from *Dendrobium sinense. Journal of Asian natural products research,* 2013, vol. 15: 67-70.

Chen Y., Liu Y., Jiang J., Zhang Y., Yin B. Dendronone, a new phenanthrenequinone from *Dendrobium cariniferum. Food chemistry,* 2008, vol. 111: 11-12.

Chen Y., Li J., Wang L., Liu Y. Aromatic compounds from *Dendrobium aphyllum. Biochemical systematics and ecology,* 2008a, vol. 36: 458-460.

Chen Y., Xu J., Yu H., Qing C., Zhang Y., Wang L., Liu Y., Wang J. Cytotoxic phenolics from *Bulbophyllum odoratissimum. Food chemistry,* 2008b, vol. 107: 169-173.

Chopra R. N., Nayar S. L., Chopra I. C. Glossary of Indian medicinal plants. *New Dehli : Council of Scientific and Industrial Research*. 3^{e} édition 1992.

Chung J. H., Manganiello V., Dyck J. R. B. Resveratrol as a calorie restriction mimetic: therapeutic implications. *Trends in cell biology,* 2012, vol. 22: 546-554.

Chung S., Yao H., Caito S., Hwang J-W., Arunachalam G., Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2010, vol. 501: 79-90.

Christophoridou S., Dais P., Tseng L. H., Spraul M. Separation and identification of phenolic compounds in olive oil by coupling high-performance liquid chromatography with postcolumn solid-phase extraction to nuclear magnetic resonance spectroscopy (LC-SPE-NMR) *Journal of agricultural and food chemistry,* 2005, vol. 53: 4667-4679.

Clarkson C., Staerk D., Hansen S. H., Sairafianpour M., Jaroszewski J. W. Hyphenation of solid-phase extraction and nuclear magnetic resonance: application of HPLC-DAD-SPE-NMR to identification of constituents of *Kanahia laniflora. Analytical chemistry,* 2005, vol. 77: 3547-3553.

Clarkson C., Sibum M., Mensen R., Jaroszewski J. W. Evaluation of on-line solid-phase extraction parameters for hyphenated, high-performance liquid chromatography-solid-phase extraction-nuclear magnetic resonance applications. *Journal of chromatography A.* 2007, vol. 1165: 1-9.

Coval S. J., Scheuer P. J. An intriguing C16-alkadienone substituted 2-pyridine from a marine mollusk. *Journal of organic chemistry,* 1985, vol. 50 : 3024-3025.

Dahmén J., Leander K. The structure of parishin, a glucoside from *Vanda parishii. Phytochemistry,* 1976, vol. 15: 1986-1987.

Dash P.K, Sahoo S., Bal S. Ethnobotanical studies on orchids of Niyamgiri hill Ranges, Orissa, India. *Ethnobotanical leaflets,* 2008, vol. 12: 70-78.

De Paepe B., Smet J., Vanlander A., Seneca S., Lissens W., De Meirleir L., Vandewoestyne M., Deforce D., Rodenburg R. J., Van Coster R. Fluorescence imaging of mitochondria in cultured skin fibroblasts: a useful method for the detection of oxidative phosphorylation defects. *Pediatric research,* 2012, vol. 72: 232-240.

De Rijke E., de Kandet F., Ariese F., Brinkman U. A. T., Gooijer C. Liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy for the identification of isoflavone glucoside malonates in *T. pratense* L. leaves. *Journal of separation science,* 2004, vol. 27: 1061-70.

Delannay E., Toribio A., Boudesocque L., Nuzillard J-M., Zèches-Hanrot M., Daedennes E., Le Dour G., Sapi J., Renault J-H. Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, a semi-continuous development mode for routine laboratory-scale purifications. *Journal of chromatography A,* 2006 vol. 1127: 45-51.

Dressler R. L. *The orchids: Natural history and classification.* Harvard University Press, 1990.

Dressler R. L. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland, OR, 1993.

Duarte I. F., Godejohann M., Braumann U., Spraul M., Gil A. M. Application of NMR spectroscopy and LC-NMR-MS to the identification of carbohydrates in beer. *Journal of agricultural and food chemistry,* 2003, vol. 51: 4847-52.

Elander M., Leander K., Rosenblom J., Ruusa E. Studies on Orchidaceae alkaloids XXXII. Crepidine, crepidamine and dendrocrepine, three alkaloids from *Dendrobium crepidatum* Lindl. *Acta chemica scandinavica,* 1973, vol. 27: 1907-1913.

Exarchou V., Godejohann M., van Beek T. A., Gerothanassis I. P., Vervoort J. LC-UV-solid-phase extraction-NMR-MS combined with a cryogenic flow probe and its application to the identification of compounds present in Greek oregano. *Analytical chemistry,* 2003, vol. 75: 6288-6294.

Fan C., Wang W., Wang Y., Qin G., Zhao W. Chemical constituents from *Dendrobium densiflorum. Phyrochemistry,* 2001, vol. 57 : 1255-1258.

Ferreira J., Floriani A. E. O., Filho V. C., Monache F. D., Yunes R. A., Calixto J. B., Santos A. R. S. Antinociceptive properties of the methanolic extract and two triterpenes isolated from *Epidendrum mosenii* stems (Orchidaceae). *Life Sciences,* 2000, vol. 66 : 791-802.

Fisch M. H., Flick B. H., Arditti J. Structure and antifungal activity of hircinol, loroglossol and orchinol. *Phytochemistry,* 1973, vol. 12 : 437-441.

Flach A., Dondon R. C., Singer R. B., Koehler S., Amaral M.C., Marsaioli A. J. The chemistry of pollination in selected Brazilian Maxillariinae orchids : foral rewards and fragrance. *Journal of chemical ecology,* 2004, vol. 30 : 1045-1056.

Foucault A. P., Chevolot L. Counter-current chromatography : instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *Journal of chromatography A,* 1998 vol. 808: 3-22.

Fritzemeier K. H., Kindl H. 9,10-dihydrophenanthrenes as phytoalexines of Orchidaceae: Biosynthetic studies *in vitro* and *in vivo* providing the route from L-phenylalanine to dihydro-*m*-coumaric acid, dihydrostilbene and dihydrophenanthrenes. *European journal of biochemistry,* 1983, vol. 133: 545-550.

Frölich C., Hartmann T., Ober D. Tissue distribution and biosynthesis of 1,2-saturated pyrrolizidine alkaloids in *Phalaenopsis* hybrids (Orchidaceae). *Phytochemistry,* 2006, vol. 67 : 1493-1502.

Ghanaksh A., Kaushik P. Antibacterial effect of *Aerides multiflora* Roxb. A study *in vitro. Journal of the orchid society of India*, 1999, vol. 13: 65-68.

Gill A. M., Duarte I. F., Godejohann M., Braumann U., Maraschin M., Spraul M. Characterization of the aromatic composition of some liquid food by nuclear magnetic resonance spectrometry and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection. *Analytical chimica acta,* 2003, vol. 488: 35-51.

Glish G. L., Burinsky D. J. Hybrid mass spectrometers for tandem mass spectrometry. *Journal of the American society of mass spectrometry,* 2008, vol. 19 : 161-172.

Gong Y-Q., Fan Y., Wu D-Z., Yang H., Hu Z-B., Wang Z-T. In vivo and in vitro evaluation of erianin, a novel anti-angiogenic agent. *European journal of cancer,* 2004, vol. 40: 1554-1565.

Gorham J. Effect of lunularic acid analogues on liverwort growth and IAA oxidation. *Phytochemistry,* 1978, vol. 17: 99-105.

Gorham J. Chapitre 5. Stilbenes and phenanthrenes, p. 159-196. Dans **Harborne J. B.** et **Dey P. M.**: Methods in plant biochemistry, vol. 1 Plant phenolics, *Academic press*, 1989.

Gutiérrez Pérez R. M. Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology. *Journal of medicinal plants research,* 2010, vol. 4: 592-638.

Ha J-H., Lee D-U., Lee J-T., Kim J-S., Yong C-S., Kim J-A., Ha J-S., Huh K. 4-hydroxybenzaldehyde from *Gastrodia elata* Bl is active in the antioxidation and GABAergic neuromodulation of the rat brain. *Journal of ethnopharmacology*, 2000, vol. 73: 329-333.

Hakala S. H., Heinonen I. M. Chromatographic purification of natural lycopene. *Journal of food and agricultural chemistry*, 1994, vol. 42: 1314-1316.

Harikumar K. B., Aggarwal B. B. Resveratrol, a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell cycle,* 2008, vol. 7: 1020-1035.

Hashimito T., Tajima M. Structures and synthesis of the growth inhibitors batatasins IV and V, and their physiological activities. *Phytochemistry,* 1978, vol. 17: 1179-1184.

Hayashi J., Sekine T., Deguchi S., Lin Q., Horie S., Tsuchiya S., Yano S., Watanabe K., Ikegami F. Phenolic compounds from Gastrodia rhizome and relaxant effects of related compounds on isolated smooth muscle preparation. *Phytochemistry*, 2002, vol. 59 : 513-519.

Hernandez-Romero Y., Acevedo L., de Los Angeles Sanchez M., Shier T. W., Abbas H. K., Mata R. Phytotoxic activity of bibenzyl derivatives from the orchid *Epidendrum rigidum. Journal of agricultural and food chemistry,* 2005, vol. 53: 6276-6280.

Hinfray J., Baudimant G. La chromatographie de partage centrifuge. *Biofutur,* 1998, n°179, cahier n°179: 1-11.

Ho C.K., Chen C.C. Moscatillin from the orchid *Dendrobium loddigesii* is a potential anticancer agent. *Cancer invest*, 2003, vol. 21: 729-36.

Ho C. S., Lam C. W. K., Chan M. H. M., Cheung R. C. K., Law L. K., Lit L. C. W., Ng K. F., Suen M. W. M., Tai H. L. Electrospray ionisation mass spectrometry : Principles and clinical applications. *Clinical biochemical review,* 2003, vol. 24: 3-12.

Hossain M. M. Therapeutic orchids : traditional uses and recent advances – An overview. *Fitoterapia,* 2011, vol. 82: 102-140.

Hostettmann K., Marston A., Hostettmann M. *Preparative chromatography techniques : Application in natural product isolation.* Springer, 2e édition, 1997.

Huang L., Cao Y., Xu H., Chen G. Separation and purification of ergosterol and stigmasterol in *Aneoctochilus roxburghii* (Wall) Lindl. by high-speed counter-current chromatography. *Journal of separation science,* 2011, vol. 34: 385-392.

Huang S., Zhou X-L., Wang C-J., Wang Y-S., Xiao F., Shan L-H., Guo Z-Y., Weng J. Pyrrolizidine alkaloids from *Liparis nervosa* with inhibitory activities against LPS-induced NO production in RAW264.7 macrophages. *Phytochemistry,* 2013, vol. 93: 154-161.

Huang S-Y., Li G-Q., Shi J-G., Mo S-Y., Wang S-J., Yang Y-C. Chemical constituents of the rhizomes of *Coeloglossum viride* var*. bracteatum*. *Journal of Asian natural product research*, 2004, vol. 6: 49-61.

Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of chromatography A,* 2005, vol. 1065 : 145-168.

Islam M. T., Ahn S-Y., Cho S. M., Yun H. K. Isolation of antibacterial compounds from hairy vetch (*Vicia villosa*) against grapevine croxn gall pathogen. *Horticulture, environment and biotechnology*, 2013, vol. 54: 338-345.

Jalal J. S., Rawat J. S., Kumar P. Abundance and habitat types of orchids in Gori valley, eastern Uttarakhand. *Journal of the Orchid society of India,* 2008, vol. 22: 63-67.

Jalal J. S., Kumar P., Pangtey Y. P. S. Ethnomedicinal orchids of Uttarakhand, Western Himalaya. *Ethnobotanical leaflets*, 2008, vol. 12 : 1227-30.

Jang Y. W., Lee J. Y., Kim C. J. Anti-asthmatic activity of phenolic compounds from the roots of *Gastrodia elata* Bl. *International immunopharmacology,* 2010, vol. 10: 147-154.

Janthasoot W., Ratanabanangkoon K., Chudapongse P. Inhibition of mitochondrial ATPase by 2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene. *Chemico-biological interactions,* 1977, vol.18: 355-364.

Jaroszewski J. W. Hyphenated NMR methods in natural products research, Part I : direct hyphenation. *Planta medica,* 2005a, vol. 71: 691-700.

Jaroszewski J. W. Hyphenated NMR methods in natural products research, Part II : HPLC-SPE-NMR and other new trends in NMR hyphenation. *Planta medica,* 2005b, vol. 71: 795-802.

Jayaprakasha G. K., Rao L. J., Sakariah K. K. Antioxidant activities of flavidin in different *in vitro* model systems. *Bioorganic and medicinal chemistry,* 2004, vol. 12: 5141-5146.

Johnson M. K., Alexander K. E., Lindquist N., Loo G. A phenolic antioxidant from the freshwater orchid, *Habenaria repens*. *Comparative biochemistry and physiology* Part C, 1999, vol. 122: 211-214.

Johnson S., Morgan E. D., Wilson I. D., Spraul M., Hofmann M. Photo-isomerization of azadirachtin studied by high performance liquid chromatography coupled to high field proton NMR spectroscopy. *Journal of the chemical society, Perkin transactions 1,* 1994, vol. 1: 1499-1502.

Ju J., Zou Z., Yang J. Studies on chemical constituents of *Cypripedium smithii*. *Zhongcaoyao*, 2004, vol. 35 : 134-136.

Juneja R. K., Sharma S. C., Tandon J. S. Two substituted bibenzyls and a dihydrophenanthrene from *Cymbidium aloifolium. Phytochemistry,* 1987, vol. 24: 1123-1125.

Junka N., Wongs-Aree C., Kanlayanarat S. Predominance of cyanidin found in flower from two species of *Aerides* orchids. *Acta horticulturae*, 2007, vol. 755: 549-556.

Kasiotis K. M., Pratsinis H., Kletsas D., Haroutounian S. A. Resveratrol and related stilbènes: their anti-aging and anti-angiogenic properties. *Food and chemical toxicology,* 2013, *article in press*, http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.038.

Kim H. J., Hwang I. K., Won M. H. Vanillin, 4-hydroxybenzyl aldehyde and 4-hydroxybenzyl alcohol prevent hippocampal CA1 cell death following gobal ischemia. *Brain research,* 2007, vol. 1181: 130-141.

Klouda P. *Moderni analyticke metody*. Pavel Klouda éditions, 2003.

Kocyan A, Vogel de E. F., Conti E., Gravendeel B. Molecular phylogeny of *Aerides* (Orchidaceae) based on one nuclear and two plastid markers: A step forward in understanding the evolution of the Aeridinae. *Molecular phylogenetics and evolution,* 2008, vol. 48: 422-443.

Kong J-M., Goh N-K., Chia L-S., Chia T-F. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta pharmacologica sinica*, 2003, vol. 24: 7-21.

Konishi Y., Kiyota T., Draghici C., Qao J-M., Yeboah F., Acoca S., Jarussophon S., Purisima E. Molecular formula analysis by an MS/MS/MS technique to expedite dereplication of natural products. *Analytical chemistry,* 2007, vol. 79: 1187-1197.

Korfmacher W. A. Foundation review : Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug discovery today,* 2005, vol. 10: 1357-1367.

Kovacs A. Isolation and structure elucidation of compounds with antitumor activity from *Tamus communis* and *Xanthium italicum*. Thèse de doctorat, 2009.

Kudo Y., Tanaka A., Yamada K. Dendrobine, an antagonist of β-alanine, taurine and of presynaptic inhibition in the frog spinal cord. *British journal of pharmacology,* 1983, vol. 78: 709-715.

Kumar P., Pandey A.K., Rawat G.S., Jalal J.S. Diversity and conservation of orchids in state of Jharkhand. *Plant taxonomy : Advances and relevance,* 2005 : 345-353.

Kumar S. The medicinal plants of North-East India. *Scientific publishers*, 2002.

Lahmann C., Bergemann J., Harrison G. Young A. R. Matrix metalloproteinase-1 and skin ageing in smokers. *The Lancet,* 2001, vol. 357: 935-936.

Lambert M., Staerk D., Hansen S. H., Jaroszewski J. W. HPLC-SPE-NMR hyphenation in natural products research: optimization of analysis of *Croton membranaceus* extract. *Magnetic resonance in chemistry,* 2005, vol. 43: 771-777.

Lawler LJ., Slaytor M. Uses of Australian orchids by aborigines and early settlers. *Medicinal journal of Australia*, 1970, vol. 2: 1259-1261.

Leander K., Lüning B. Studies on orchidaceae alkaloids VII structure of a glucosidic alkaloid from *Malaxis congesta* comb. Nov. (Rchb. F.). *Tetrahedron letters,* 1967, vol. 8 : 3477-8.

Lecoufle M. *Le traité des Orchidées*. Artemis Editions, 2004.

Lee J. Y., Jang Y., W., Kang H. S., Moon H., Sim S. S., Kim C. J. Anti-inflammatory action of phenolic compounds from *Gastrodia elata* root. *Archives of pharmacal research,* 2006, vol. 29: 849-858.

Lei L., Yang F., Zhang T., Tu P., Wu L., Chen F., Ito Y. Preparative isolation and purification of phenylethanoid glycosides from the extract of faeces of beagle dogs by high-speed countercurrent chromatography. *Journal of liquid chromatography and related techniques*, 2001, vol. 24 : 2187-2195.

Lei L., Yang F., Zhang T., Tu P., Wu L., Ito Y. Preparative isolation and purification of acteoside and 2'-acetyl acteoside from *Cistanches salsa* (C. A. Mey.) G. Beck by high-speed coutercurrent chromatography. *Journal of chromatography A,* 2001, vol. 912 : 181-185.

Leong Y-W., Kang C-C., Harrison L. J., Powell A., D. Phenanthrenes, dihydrophenanthrenes and bibenzyls from the orchid *Bulbophyllum vaginatum. Phytochemistry,* 1997, vol. 44: 157-165.

Leong Y-W., Harrison L. J., Powel A. D. Phenanthrene and other aromatic constituents of *Bulbophyllum vaginatum. Phytochemistry,* 1999, vol. 50: 1237-1241.

Li A., Zhang Y., Sun A., Liu R. Preparative isolation and purification of phenolic acids from the dried buds of *Lonicera japonica Thunb* by high-speed counter-current chromatography in gradient elution mode. *Journal of liquid chromatography and related techniques,* 2012, vol. 35: 1933-1944.

Li H. B., Chen F. Preparative isolation and purification of gastrodin from the Chinese medicinal plant *Gastrodia elata* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of chromatography A,* 2004, vol. 1052: 229-232.

Li M. F., Hirata Y., Xu G. J., Niwa M., Wu H. M. Studies on the chemical constituents of *Dendrobium loddigesii* Rolfe. *Yao Xue Bao,* 1991, vol. 26: 307-310.

Li S., Xue Z., Wang S-J., Yang Y-C., Shi J-G. Terpenoids from the tuber of *Cremastra appendiculata. Journal of Asian natural products research,* 2008, vol. 10: 677-683.

Li S. C., He S., Zhong S., Duan X., Ye H., Shi J., Peng A., Chen L. Elution-extrusion counter-current chromatography separation of five bioactive compounds from *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. *Journal of chromatography A,* 2011, vol. 1218: 3124-3128.

Li Y., Gong Q., Wu Q., Shi J. Inhibitory effects of *Dendrobium* alkaloids on memory impairment induced by lipopolysaccharide in rats. *Planta medica,* 2010, vol. 77: 117-121.

Lim E-J., Kang H-J., Jung H-J., Kim K., Lim C-J., Park E-H., Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of 4-hydroxybenzaldehyde. *Biomolecules & therapeutics*, 2008, vol. 16: 231-236.

Lin J-H., Liu Y-C., Hau J-P., Wen K-C. Parishins B and C from rhizomes of *Gastrodia elata. Phytochemistry,* 1996, vol. 42: 549-551.

Lindstorm B., Lüning B., Siirala-Hansen K. Studies on Orchidaceae alkaloids XXVI. A new glycosidic alkaloid from *Malaxis grandifolia* Schltr. *Acta chemica scandinavica,* 1971, vol. 25: 1900-1903.

Liu D., Ju, J., Zou Z., Lin G., Yang J. Isolation and structure determination of cypritibetquinone A and B, two new phenanthroquinones from *Cypripedium tibeticum. Acta pharmacologica sinica,* 2005, vol. 40: 255-257.

Liu X., Wan D., Yuan Q. Chemical component of *Pleione bulbocodioides. Zhongguo Yiuan Yaoxue Zazhi*, 2011, vol. 31 : 1649-1650.

Lin Y-L., Chen W-P., Macabalang A-D. Dihydrophenanthrenes from *Bletilla formosana. Chemical pharmaceutical bulletin,* 2005, vol. 53: 1111-1113.

Lommen A., Godejohann M., Venema D. P., Hollman P. C., H., Spraul M. Application of directly coupled HPLC-NMR-MS to the identification and confirmation of quercetin glycosides and phloretin glycosides in apple peel. *Analytical chemistry,* 2000, vol. 72: 1793-1797.

Lüning B. Studies on Orchidaceae alkaloids I. *Acta chemica scandinavica*, 1964, vol. 18: 1507-1516.

Lüning B., Tränker H. Studies on Orchidaceae alkaloids II. Structure of alkaloids in *Chysis bractescens* Lindl. *Tetrahedron letters,* 1965, vol. 14: 921-922.

Lüning B., Tränker H., Brandänge S. Studies on Orchidaceae alkaloids V. A new alkaloid from *Phalaenopsis amabilis* Bl. *Acta chemica scandinavica,* 1966, vol. 20: 2011.

Lüning B, Lindstrom B. Alkaloids of the Orchidacea, dans Withner C. L.: The Orchids scientific studies. Edition: *John Wiley and sons*, New York, 1974.

Ma G-X., Wang T-S., Yin L., Pan Y. Two pimarane diterpenoids from *Ephemerantha lonchophylla* and their evaluation as modulators of the multidrug resistance phenotype. *Journal of natural products*, 1998, vol. 61: 112-115.

Ma X., Tu P., Chen Y., Zhang T., Wei Y., Ito Y. Preparative isolation and purification of two isoflavones from *Astragalus membranaceous* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao by high-speed counter-current chromatography. *Journal of chromatography A,* 2003, vol. 992: 193-197.

Majumder P. L., Sarkar A. K. Imbricatin, a new 9,10-dihydrophenanthrene derivative of the orchid *Pholidota imbricata. Indian journal of chemistry,* 1982, vol. 21B : 829-831.

Majumder P. L., Datta N., Sarkar A. K. Flavidin, a novel 9,10-dihydrophenanthrene derivative of the orchids *Coelogyne flavida*, *Pholidota articulata* and *Otochilus fusca. Journal of natural products,* 1982, vol. 45: 730-732.

Majumder P. L. Joardar M. Structure of erianin, a new bibenzyl derivative from the orchid *Eria carinata. Indian journal of chemistry section b-organic chemistry including medicinal chemistry,* 1984, vol. 23: 1040-1042.

Majumder P.L., Sen S. Structure of moscatin-a new phenanthrene derivative from the orchid *Dendrobium moscatum. Indian journal of chemistry section B-organic chemistry including medicinal chemistry,* 1987, vol. 26: 18-20.

Majumder P. L., Basak M. Two bibenzyl derivatives from the orchid *Cirrhopetalum andersonii. Phytochemistry,* 1991, vol. 30: 321-324.

Majumder P. L., Pal S. Cumulatin and tristin, 2 bibenzyl derivatives from the orchids *Dendrobium cumulatum* and *Bulbophyllum triste. Phytochemistry,* 1993, vol. 32: 1561-1565.

Majumder P. L., Pal. S. Two stilbnoids from the orchid *Arundina bambusifolia. Phytochemistry,* 1993a, vol. 32: 439-44.

Majumder P.L., Banerjee S., Sen S. Three stilbenoids from the orchid *Agrostophyllum callosum. Phytochemistry,* 1996, vol. 42: 847-852.

Majumder P. L., Pal S., Majumder S. Dimeric phenanthrenes from the orchid *Bulbophyllum reptans. Phytochemistry*, 1999, vol. 50: 891-897.

Majumder P.L., Sen S., Majumder S. Phenanthrene derivatives from the orchid *Coelogyne cristata. Phytochemistry*, 2001, vol. 58: 581-586.

Manako Y., Wake H., Tanaka T., Shimomura K., Ishimaru K. Phenanthropyran derivatives from *Phalaenopsis equestris. Phytochemistry,* 2001, vol.*58*: 603-605.

Marston A. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry,* 2007, vol. 68: 2785-2797.

Mason J. J., Bergman J., Janosik T. Synthetic studies of cephalandole alkaloids and the revised structure of cephalandole A. *Journal of natural products,* 2008, vol. 71: 1447-1450.

Mato M. C., Calvo R. Effect of lunularic acid on auxin-oxidase activity. *Biologia plantarum,* 1977, vol. 19: 394-396.

Matsuura H., Saxena G., Farmer S. W., Hancock R. E. W., Towers G. H. N. Antibacterial and antifungal compounds from *Empetrum nigrum. Planta medica,* 1995, vol. 61: 580.

Michel T., Halabalaki M., Skaltsounis A-L. New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources. *Planta medica*, 2013, vol. 79: 514-532.

Miliauskas G., van Beek T. A., de Waard P., Venskutonis R. P., Sudhölter E. J. R. Identification of radical scavenging compounds in *Rhaponticum carthamoides* by means of LC-DAD-SPE-NMR. *Journal of natural products,* 2005, vol. 68: 168-172.

Miyazawa M, Shimamura H., Nakamura S., Kameoka H. Antimutagenic activity of gigantol from *Dendrobium nobile. Journal of agricultural and food chemistry,* 1997, vol. 45: 2849-2853.

Morita H., Fujiwara M., Yoshida N., Kobayashi J. New picrotoxinin-type and dendrobine-type sesquiterpenoids from *Dendrobium* Snowflake 'Red Star'. *Tetrahedron,* 2000, vol. 56: 5801-5805.

Nanacorn W., Watthana S. *Thai native orchids I (Queen Sirikit Botanical garden)*. Wandia Press, 2008.

Nayak B. S., Suresh R., Rao A. V. C., Pillai G. K., Davis E. M., Ramkissoon V., McRae A. Evaluation of wound healing activity of *Vanda roxburghii* R.Br(Orchidaceae): a preclinical study in a rat model. *The international journal of lower extremity wounds,* 2005, vol. 4: 200-204.

Neto F. C., Siquitelli C. D., Pilon A. C., Silva D. H. S., Bolzani V. S., Castro-Gamboa I. Dereplication of phenolic derivatives of *Qualea grandiflora* and *Qualea cordata* (Vochysiaceae) using liquid chromatography coupled with ESI-QToF-MS/MS. *Journal of Brazilian chemical society,* 2013, vol. 24: 578-564.

Nimmanpisut S., Chudapongse P., Ratanabanangkoon K. Effects of 2,4,3'-tetrahydroxystilbene on oxidative-phosphorylation by rat-liver mitochondria. *Biochemical*

pharmacology, 1976, vol. 25: 1245-1248.

Noda A., Kobayashi Y., Miyaharaa K., Fukahori S. 2,4-bis(4-hydroxybenzyl) phenol from *Gastrodia elata. Phytochemistry,* 1995, vol. 39: 1247-1248.

Ohguchi K., Itoh T., Inoue H., Nozawa Y., Ito M. SIRT1 modulates expression of matrix metalloproteinases in human dermal fibroblastes. *British journal of dermatology,* 2010, vol. 163: 689-694.

Oka F., Oka H. Ito systematic search for suitable 2-phase solvent systems for high-speed couter-current chromatography. *Journal of chromatography A,* 1991 vol. 531(1): 99-108.

Ouattara B., Angenot L., Guissou P., Fondu P., Dubois J., Frederich M. LC/MS/NMR analysis of isomeric divanilloylquinic acids from the root bark of *Fagara zanthoxyloides* Lam. *Phytochemistry,* 2004, vol. 65: 1145-1151.

Owen R. W., Haubner R., Mier W., Giacosa A., Hull W. E., Spiegelhalder B., Bartsch H. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and chemical toxicology*, 2003, vol. 41: 703-717.

Park S., Kim D. S., Kang S. *Gastrodia elata* Blume water extracts improve insulin resistance by decreasing body fat in diet-induced obese rats: vanillin and 4-hydroxybenzaldehyde are the bioactive candidates. *European journal of nutrition,* 2011, vol. 50: 107-118.

Pathak P., Sehgal R.N., Shekhar N., Sharma M., Sood A., Singh D. K. *Orchids: science and commerce.* New Dehli, 2001, p. 35.

Patil D., Dev B., Nag A. Lipase-catalyzed synthesis of 4-methoxycinnamoyl glycerol. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic,* 2011, vol.73: 5-8.

Pen J-Y., Han X., Xu L-N., Qi Y., Xu Y-W., Xu Q-W. Two new prenylated coumarins from *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames. *Journal of Asian natural product research,* 2008, vol. 10 : 256-259.

Podstolski A., Havkin-Frenkel D., Malinowski J., Blount J. W., Kourteva G., Dixon R. A. Unusual 4-hydroxybenzaldehyde synthase activity from tissue cultures of the vanilla orchid *Vanilla planifolia. Phytochemistry,* 2002, vol. 61 : 611-620.

Prasad D. N., Achari G. A study of anti-arthritic action of *Vanda roxburghii* in albino rats. *Journal of the Indian medical association,* 1966, vol. 46: 234-237.

Qin X-Y., Cui J., Zhang Y. *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* extract protects against amyloid toxicity in rat prefrontal cortex neurons. *International journal of clinical and experimental medicine,* 2010, vol. 20: 88-94.

Qing L. H., Rui L., Xing W. T., Yuan L. G. Isolation and purification of two constituents from *Dendrobium fimbriatum* Hook by high-speed counter-current chromatography using stepwise elution. *Separation science and technology,* 2009, vol. 44: 1218-1227.

Quan T., Qin Z., Xia W., Shao Y., Voorhees J. J., Fisher G. J. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *Journal of investigative dermatology symposium proceedings,* 2009, vol. 14: 20-24.

Queiroz E. F., Wolfender J-L., Atindehou K. K., Traore D., Hostettmann K. On-line identification of the antifungal constituents of *Erythrina vogelii* by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, ultraviolet absorbance detection and nuclear magnetic resonance spectrometry combined with liquid chromatographic micro-fractionation. *Journal of chromatography A,* 2002, vol. 974: 123-34.

Rajendran A., Rao N. R., Kumar R. K., Henry A. N. Some medicinal orchids of Southern India. *Ancient science of life*, 1997, vol. 17: 10-14.

Ramos P., Colareda A. G., Rosella M. A.Debenedetti S. L., Spegazzini E. D., Consolini A. E. Phytochemical profile and anti-inflammatory effect of the orchid *Catasetum macroglossum*. *Latin American journal of pharmacy,* 2012, vol. 31: 62-67.

Reddy K. N. Ethnobotany of Andhra Pradesh : A review. *Ethnobotanical Leaflets,* 2008, vol. 12: 305-310.

Reddy K.N., Subba Raju G. V., Reddy C.S., Raju V. S. Ethnobotany of certain orchids of Eastern Ghats, Anadhra Pradesh. *ENVIS news letter*, 2005, vol. 2: 5-9.

Redl. K., Breu W., Davis B., Bauer R. Anti-inflammatory active polyacetylenes from *Bidens campylotheca. Planta medica,* 1994, vol. 60: 58-62.

Renault J-H., Thépenier P., Zèchez-Hanrot M., Le Men-Olivier L., Durand A., Foucault A., Margraff R. Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography. *Journal of chromatography A*, 1997 vol. 763: 345-352.

Roy A. R., Patel R. S., Patel V. V., Yadav D. S. Medicinal orchids of Meghalaya. *Journal of the Orchid society of India,* 2007, vol. 21: 15-7.

Sachdev K., Kulshreshtha D. K. Phenolic constituents of *Coelogyne ovalis. Phytochemistry,* 1986, vol. 25: 499-502.

Saito M., Kondo N., Yamaguchi H., Hashimoto T. Plant growth-regulating activities of batatasin-III analogs. *Plant and cell physiology,* 1976, vol. 17: 411-416.

Saito N., Kenjiro T., Uesato K., Shingihara A., Honda T. An acetylated cyanidin glycoside from the red-purple flowers of *Dendrobium. Phytochemistry,* 1994, vol. 37: 245-248.

Saito N. Ku M., Tatsuzawa F., Lu T. S., Yokoi M., Shigihara A., Honda T. Acetylated cyanidin glycosides in the purple-red flowers of *Bletilla striata. Phytochemistry,* 1995, vol. 40: 1523-1529.

Sandvoss M., Weltring A. Preiss A. Levsen K., Wuensch G. Combination of matrix solid-phase dispersion extraction and direct on-line liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy-tandem mass spectrometry as a new efficient approach for the rapid screening of natural products: Application to the total asterosaponin fraction of the starfish *Asterias rubens. Journal of chromatography A*, 2001**,** vol. 917: 75-86.

Sandvoss M., Bardsley B., Beck T. L., Lee-Smith E., North S. E., Moore P. J., Edwards A. J. Smith R. J. HPLC-SPE-NMR in pharmaceutical development: capabilities and applications. *Magnetic resonance in chemistry*, 2005, vol. 43: 762-770.

Schneider B., Zhao Y., Blitzke T., Schmitt B., Nookandeh A., Sun X., Stöckgit J. Taxane analysis by high performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy of *Taxus* species. *Phytochemical analysis,* 1998, vol. 9: 237-244.

Seger C., Godejohann M., Tseng L. H., Spraul M., Girtler A., Sturm S. LC-DAD-MS/SPE-NMR hyphenation, a tool for the analysis of pharmaceutically used plant extracts : identification of isobaric glycoside regioisomers from *Harpagophytum procumbens. Analytical chemistry,* 2005, vol. 77: 878-885.

Shi X., Li Y., Ying J., Wang L., Zhang Y., Chen Y. A new 9,10-dihydrophenanthropyran dimer and a new natural 9,10-dihydrophenanthropyran from *Otochilus porrectus. Biochemical systematics and ecology,* 2010, vol. 38: 842-845.

Shinomiya K., Kabasawa Y., Nakazawa H., Ito Y. Countercurrent chromatographic separation of soybean isoflavones by two different types of coil planet centrifuges with various two-phase solvent system. *Journal of liquid chromatography and related techniques*. 2003, vol. 26: 3497-3509.

Shinomiya K., Kabasawa Y., Ito Y. Countercurrent chromatographic separation of sugars and their *p*-nitrophenyl derivatives by cross-axis coil planet centrifuge. *Journal of liquid chromatography and related techniques*. 1999, vol. 22: 579-592.

Shu Y., Zhang D-M., Guo S-X. A new sesquiterpene glycoside from *Dendrobium nobile* Lindl. *Journal of Asian natural products research*, 2004, vol. 6: 311-314.

Simin N., Orcic D., Cetojevic-Simin D., Mimica-Dukic N., Anackov G., Beara I., Mitic-Culafic D., Bozin B. Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of small yellow onion (*Allium flavum* L. subsp. *flavum*, Alliaceae). *LWT-Food science and technology,* 2013, vol. 54: 139-146.

Simmler C. Etudes phytochimiques et biologiques de *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl. et de *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. (Orchidaceae). *Thèse de doctorat*, octobre 2010.

Simmler C., Antheaume C., André P., Bonté F., Lobstein A. Glucosyloxybenzyl eucomate derivatives from *Vanda teres* stimulate HaCaT cytochrome *c* oxidase. *Journal of natural products,* 2011 vol. 74: 949-955.

Simmler C., Antheaume C., Lobstein A. Antioxidant biomarkers from Vanda coerulea stems reduce irradiated HaCaT PGE-2 production as a result of COX-2 inhibition. *Plos One,* 2010, vol. 5(10): e13713.

Singh A., Duggal S. Medicinal orchids – An overview. *Ethnobotanical leaflets,* 2009, vol. 13: 351-63.

Singh A., Duggal S. Medicinal orchids – An overview. *Ethnobotanical leaflets,* 2009, vol. 13: 399-412.

Spring O. Buschmann H., Vogler B., Schilling E. E., Spraul M., Hoffmann M. Sesquiterpene lactones chemistry of *Zaluzania grayana* from on-line LC-NMR measurements. *Phytochemistry,* 1995, vol. 39: 609-612.

Sritularak B., Anuwat M., Likhitwitayawuid K. A new phenanthrenequinone from *Dedrobium draconis. Journal of Asian natural products research,* 2011, vol. 13: 251-255.

Steller H. Mort cellulaire programmée (apoptose). *http://biologie.univ-mrs.fr/upload/p100/ppt_H._Steller.pdf*

Stewart J. *Orchids at Kew*. Stationery Office Books, 1992.

Stintzing F. C. Conrad J., Klaiber I., Beifuss U., Carle R. Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. *Phytochemistry,* 2004, vol. 65: 415-422.

Tatsuzawa F., Saito N., Seki H., Hara R., Yokoi M., Honda T. Acylated cyanidin glycosides in the red-purple flowers of *Phalaenopsis. Phytochemistry,* 1997, vol. 45: 173-177.

Tatsuzawa F., Saito N., Seki H., Yokoi M., Yukawa T., Shinoda K., Honda T. Acylated anthocyanins in the flowers of *Vanda* (Orchidaceae). *Biochemical systematics and ecology,* 2004, vol. 32: 651-664.

Tezuka Y., Yoshida Y., Kikuchi T., Xu G-J. Constituents of *Ephemerantha fimbriata*. Isolation and structure elucidation of two new phenanthrenes, fimbriol-A and fimbriol-B, and new dihydrophenanthrene, ephemeranthol-C. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 1993, vol. 41: 1346-1349.

Thorne R. F. Classification and geography of the flowering plants. *The Botanical review,* 1992, vol. 58 : 225-348.

Urban S., Timmers M. HPLC-NMR chemical profiling and dereplication studies of the marine brown alga, *Cystophora torulosa. Natural product communications,* 2013, vol. 8: 715-719.

Vaddhanaphuti N. *Wild orchids of Thailand*. Silkworm Books, 2005.

Venkateswarlu S., Raju M. S. S., Subbaraju G. V. Synthesis and biological activity of isoamoenylin, a metabolite of *Dendrobium amoenum. Bioscience, biotechnology and biochemistry,* 2002, vol. 66: 2236-2238.

Vogler B., Klaiber I., Roos G., Walter C. U., Hiller W., Sandor P. Combination of LC-MS and LC-NMR as a tool for the structure determination of natural products. *Journal of natural products,* 1998**,** vol. 61: 175-8.

Wallstedt A., Dube S. L., Nilsson M-C. Photosynthetic functions of leaves affected by the bibenzyls batatasin III. *Allelopathy: from molecules to ecosystems,* 2002, 45-58.

Wang C. Y., Lee S.S. Analysis and identification of lignans in *Phyllanthus urinaria* by HPLC-SPE-NMR. *Phytochemical analysis,* 2005, vol. 16: 120-126.

Wang J., Fivecoat H., Ho L., Pan Y., Ling E., Pasinetti G. M. The role of Sirt1: At the crossroad between promotion of longevity and protection against Alzheimer's disease neuropathology. *Biochimica et biophysica acta,* 2010, vol. 1804: 1690-1694.

Wang J-H., Luo J-P., Zha X-Q., Feng B-J. Comparison of antitumor activities of different polysaccharide fractions from the stems of *Dendrobium nobile* Lindl. *Carbohydrate polymers,* 2010, vol.79: 114-118.

Wang J-H., Luo J-P., Zha X-Q., Yang X-F. An acetylated galactomannoglucan from the stems of *Dendrobium nobile* Lindl. *Carbohydrate research,* 2010, vol. 345: 1023-1027.

Wang J-H., Luo J-P., Zha X-Q. Structural features of a pectic polysaccharide from stems of *Dendrobium nobile* Lindl. *Carbohydrate polymers,* 2010, vol. 81: 1-7.

Wang J-H., Luo J-P., Yang X-F., Zha X-Q. Structural analysis of a rhamnoarabinogalactan from stems of *Dendrobium nobile* Lindl. *Food chemistry,* 2010, vol. 122: 572-576.

Wang L., Tang Z., Yang X., Lei Y., Wang L., Yin B., Chen Y. Chemical constituents from *Otochilus fusca. Biochemical systematics and ecology,* 2012, vol. 43: 48-50.

Wei L-B., Chen J-M., Ye W-C., Yao X-S., Zhou G-X. Three new cycloartane glycosides from *Nervilia fordii*. *Journal of Asian natural products research.* 2012, vol. 14: 521-527.

Williams C. A. The leaf flavonoids of the Orchidaceae. *Phytochemistry,* 1979, vol. 18: 803-813.

Wilson D. M. Fenical W., Hay M., Lindquist N., Bolser R. Habenariol, a freshwater feeding deterrent from the aquatic orchid *Habenaria repens* (Orchidaceae). *Phytochemistry*, 1999, vol. 50: 1333-1336.

Wilson MF. Medicinal plant fact sheet : Cypripedium : Lady's slipper orchids. Virginia : Arlington, 2007.

Wolfender J-L., Rodrigues S., Hostettmann K., Hiller W. Liquid chromatography/ultra violet/mass spectrometric and liquid chromatography/nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of crude extracts of Gentianaceae species. *Phytochemical analysis,* 1997, vol. 8: 97-104.

Wong C., Anderson D. J., Lee E. F., Fairlie W. D., Laudlam M. J. C. Direct visualization of Bcl-2 family protein interactions using cell fluorescent protein redistribution assays. *Cell death and disease,* 2012, vol. 3: e288, doi: 10.1038/cddis.2012.28.

Wu B., He S., Pan Y-J. New dihydrodibenzoxepins from *Bulbophyllum kwangtungense. Planta Medica,* 2006, vol. 72: 1244-1247.

Wu H., Guo J., Chen S., Liu X., Zhou Y., Zhang X., Xu X. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis,* 2013, vol. 72: 267-291.

Wu P-L., Hsu Y-L., Jao C-W. Indole alkaloids from *Cephalanceropsis gracilis*. *Journal of natural products,* 2006a, vol. 69: 1467-1470.

Xue Z., Li S ;, Wang S., Wang Y., Yang Y., Shi J., He L. Mono-, bi-, and triphenanthrenes from the tubers *Cremastra appendiculata. Journal of natural products,* 2006, vol. 69: 907-913.

Yaar M., Gilchrest B. A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *British journal of dermatology,* 2007, vol. 157: 51-58.

Yamaki M., Kato T., Inoue K., Takagi S. Biphenanthrenes from *Bletilla striata. Phytochemistry,* 1989, vol. 28: 3503-3505.

Yamaki M., Kato T., Bai L., Inoue K., Takagi S. Methylated stilbenoids from *Bletilla striata. Phytochemistry,* 1991, vol. 30: 2759-2760

Yamaki M., Kato T., Bai L., Inoue K., Takagi S. Phenanthrene glucosides from *Bletilla striata*. *Phytochemistry,* 1993, vol. 34: 535-537.

Yang L., Qin L-H., Bligh S. W. A., Bshall A., Zhang C-F., Zhang M., Wang Z-T., Xu L-S. A new phenanthrene with a spirolactone from *Dendrobium chrysanthum* and its anti-inflammatory activities*. Bioorganic & medicinal chemistry,* 2006, vol. 14: 3496-3501.

Yang L., Wang Y., Zhang G., Zhang F., Zhang Z., Wang Z., Xu L. Simultaneous quantitative and qualitative analysis of bioactive phenols in *Dendrobium aurantiacum* var. *denneanum* by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry and diode array detection. *Biomedical chromatography,* 2007, vol. 21: 687-694.

Yang L., Han H., Nakamura N., Hattori M., Wang Z. Xu L. Bio-guided isolation of antioxidants from the stems of *Dendrobium auranticum* var. *denneanum*. *Phytotherapy research*, 2007, vol. 7 : 696-698.

Yang X-D., Zhy J., Yang R., Liu J-P., Li L, Zhang H-B. Phenolic constituents from the rhizomes of *Gastrodia elata. Natural product research,* 2007, vol. 21: 180-186.

Ye Q., Qin G., Zhao W. Immunomodulatory sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile. Phytochemistry,* 2002, vol. 61: 885-890.

Ye Q-H., Zhao W-M., Qin G-W. New fluorenone and phenanthrene derivatives from *Dendrobium chrysanthum.* Natural product research, 2003, vol. 17: 201-205.

Ye, Q-H., Zhao W-M., Qin G-W. Lignans from *Dendrobium chrysanthum. Journal of Asian natural products research,* 2004, vol. 6: 39-43.

Yue Z., Zhu C., Lin S., Yang Y., Shi J. Constituents of *Gymnadenia conopsea. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2010, vol. 35: 2852-2861.

Yuliana N. D., Jahangir M., Verpoorte R., Choi Y. H. Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. *Phytochemical review*, 2013, vol. 12: 293-304.

Zanolari B., Wolfender J-L., Guilet D., Marston A., Queiroz E. F., Paulo M. On-line identification of tropane alkaloids from *Erythrotoxuylum vacciniifolium* by liquid chromatography-UV detection-multiple mass spectrometry and liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectrometry. *Journal of chromatography A,* 2003, vol. 1020: 75-89.

Zeng X., Zhang S., Zhang L., Zhang K., Zheng X. A study of the neuroprotective effect of the phenolic glucoside gastrodin during cerebral ischemia *in vivo* and *in vitro. Planta medica*, 2006, vol. 72: 1359-1365.

Zha X-Q., Pan L-H., Luo J-P., Wang J-H., Wei P., Bansal V. Enzymatic fingerprints of polysaccharides of *Dendrobium officinale* and their application in identification of *Dendrobium* species. *Journal of natural medicine*, 2012, vol. 66: 525-534.

Zhang C-F., Wang M., Wang L., Linuma M., Zhang M., Xu L-S., Wang Z-T. Chemical constituents of *Dendrobium gratiosissimum* and their cytotoxic activities. *Indian journal of chemistry, section B: Organic chemistry including medicinal chemistry,* 2008, vol. 47B: 952-956.

Zhang D., Liu G., Shi J., Zhang J. *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* extract attenuates D-galactose and $NaNO_2$ induced memory impairment in mice. *Journal of Ethnopharmacology,* 2006, vol. 104: 250-256.

Zhang G-N., Zhong L-Y., Bligh S. W. A., Guo Y-L., Zhang C-F., Zhang M., Wang Z-T., Xu L-S. Bi-cyclic and bi-tricyclic compounds from *Dendrobium thyrsiflorum. Phytochemistry,* 2005, vol. 66: 1113-1120.

Zhang G-Q., Liu K-W., Chen L-J., Xiao X-J., Zhai J-W., Li L-Q., Cai J., Hsiao Y-Y., Rao W-H., Huang J., Ma X-Y., Chung S-W., Huang L-Q., Tsai W., Liu Z-J. A new molecular phylogeny and new genus, *Pendulorchis,* of the *Aerides-Vanda* alliance (Orchidaceae: Epidendroideae). *Plos one,* 2013, vol. 8: e60097.

Zhang S., Mueller C. Comparative analysis of volatiles in traditionally cured Bourbon and Ugandan vanilla bean (*Vanilla planifolia*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 2012, vol. 60: 10433-10444.

Zhang X., Xu J-K., Wang J., Wang N-L., Kurihara H., Kitanaka S., Yao X-S. Bioactive bibenzyl derivatives and fluorenones from *Dendrobium nobile. Journal of natural products,* 2007, vol. 70: 24-28.

Zhang X., Tu F-J., Yu H-Y., Wang N-L., Wang Z., Yaon X-S. Copacamphane, picrotoxane and cyclocopacamphane sesquiterpenes from *Dendrobium nobile. Chemical pharmaceutical bulletin,* 2008, vol. 56: 854-857.

Zhang W., Yang L., Li X-F., Lin Q., Lin G-H., Wei W-B. Screening of active compounds from *Gastrodia elata* Blume for vascular smooth muscle relaxation. *Zhongguo shiyan fangjixue zazhi*, 2011, vol. 17: 157-160.

Zhang W., Song Q. Chemical composition of *Gastrodia elata* Blume cultured in Guizhou Defang forest. *Zhongcaoyao*, 2010, vol. 41: 1782-1785.

Zhao Y., Nookandeh A., Schneider B., Sun X., Schmitt B., Stöckigt J. Lignans from *Torreya jackii* identified by stopped-flow high-performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chromatography A*., 1999, vol. 837: 83-91.

Zouboulis C. C., Makrantonaki E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. *Clinics in dermatology,* 2011, vol. 29: 3-14.

Zschocke S., Klaiber I., Bauer R., Vogler B. HPLC-coupled spectroscopic techniques (UV, MS, NMR) for the structure elucidation of phthalides from *Ligusticum chuanxiong*. *Molecular diversity*, 2005, vol. 9: 33-9.

Webographie

- **University of Michigan: Native American Ethnobotany** : http://herb.umd.umich.edu (accès en juillet 2013).

- **Taxonomie:** http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy (accès en juillet 2013).
- **The Plant List of all plant species**: http://www.theplantlist.org/browse/A/Orchidaceae
- **World checklist of monocotyledons:** http://apps.kew.org/wcsp/home.do (accès en juillet 2013)
- **Dictionnaire des produits naturels**: http://dnp.chemnetbase.com (accès en mai 2013)
- http://scifinder.cas.org (accès en mai 2013)
- http://www.botanicus.org/page/654218, accès en septembre 2013
- http://www.orchidspecies.com (accès en juillet 2013).
- http://orchids.wikia.com/wiki/Aerides_rosea (accès en septembre 2013).
- http://www.theorchidologist.com/blog/archives/112 (accès en septembre 2013).
- http://www.tropicos.org (accès en juillet 2013).
- http://www.univers-orchidées.org (accès en juillet 2013).
- http://www.kew.org/plants-fungi/Vanda-coerulea.htm (accès en octobre 2013)
- http://www.incapable.fr/meteo-suisse-geneva-historique-2012 (accès en octobre 2013)
- http://weatherspark.com/history/33957/2012/Chiang-Mai-Thailand (accès en octobre 2013)
- http://www.tutiempo.net/en/Climate/JINGHONG/04-2012/569590.htm (accès en octobre 2013)
- http://orchid.unibas.ch (accès en octobre 2013)
- http://www.rv-orchidworks.com (accès en novembre 2013)

Veronika ČÁKOVÁ

Contribution à l'étude phytochimique d'orchidées tropicales

Résumé :

L'analyse de la composition chimique de deux orchidées de la sous-tribu des Aeridinae, *Aerides rosea* Lodd. ex. Lindl. & Paxton et *Acampe rigida* (Buch.-Ham. ex Sm.) P. F. Hunt, a été menée en ayant recours à des techniques de couplages et grâce à une stratégie de déréplication. Dix dérivés phénanthréniques ont ainsi été identifiés dans les tiges d'*A. rosea,* dont deux nouvellement décrits. Quatre stilbénoïdes, trois dérivés d'acides phénoliques et quatre esters d'acide cinnamique ont été identifiés dans les tiges d'*A. rigida*.

Nous avons également effectué des dosages de traceurs dans différents échantillons de deux représentants de la tribu des Vandeae : *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. et *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl., afin de mettre en évidence d'éventuelles variations de composition en fonction des facteurs environnementaux et du stade de croissance végétative.

Enfin, nous avons mis au point des conditions d'isolement préparatif par chromatographie de partage centrifuge afin de purifier des marqueurs biologiques préalablement identifiés dans les tiges de *Vanda teres* : trois glucospyranosyloxybenzyl-malates ainsi que leur précurseur biosynthétique.

Mots clés: Orchidacées, marqueurs phytochimiques, dérivés phénanthréniques, silbénoïdes, HPLC-DAD-MS-SPE-UV-RMN, HPLC-ESI-HR/MS/MS, CPC.

Contribution to the phytochemical studies of tropical orchids

Abstract :

Phytochemical analyses of the composition of two orchids Aeridinae subtribe, *Aerides rosea* Lod . ex . Lindl . & Paxton and *Acampe rigida* (Buch. -Ham . Ex Sm.) P. F. Hunt were conducted using the state-of-the-art hyphenated techniques and a developed dereplication strategy. Ten phenanthrene derivatives have been identified in the stems of *A. rosea*, including two newly described structures. Four stilbenoids, three phenolic acids derivatives and four cinnamic acid esters were identified in the stems of *A. rigida*.

We also performed quantitative assays of chemical tracers in different samples of two representative species from the Vandeae tribe: *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. and *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl., in the aim to highlight possible variations in their composition, depending on environmental factors and vegetative growth stage.

Finally, we have developed conditions for preparative isolation using centrifugal partition chromatography to purify biomarkers previously identified in the stems of *Vanda teres*: three glucosyloxybenzyl malates derivatives and their biosynthetic precursor.

Key words: Orchidaceae, phytochemical markers, phenanthrene derivatives, stilbenoids, HPLC-DAD-MS-SPE-UV-RMN, HPLC-ESI-HR/MS/MS, CPC.