THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ SAVOIE MONT BLANC

Spécialité : **Chimie**

Arrêté ministériel : 25 Mai 2016

Présentée par **Vanille QUINTY**

Thèse dirigée par **Dr. Grégory Chatel**
et co-encadrée par **Pr. Micheline Draye** et **Dr. Christine Piot**

préparée au sein du **Laboratoire Environnements Dynamiques et Territoires de Montagnes, EDYTEM**
dans **l'École Doctorale SIE**

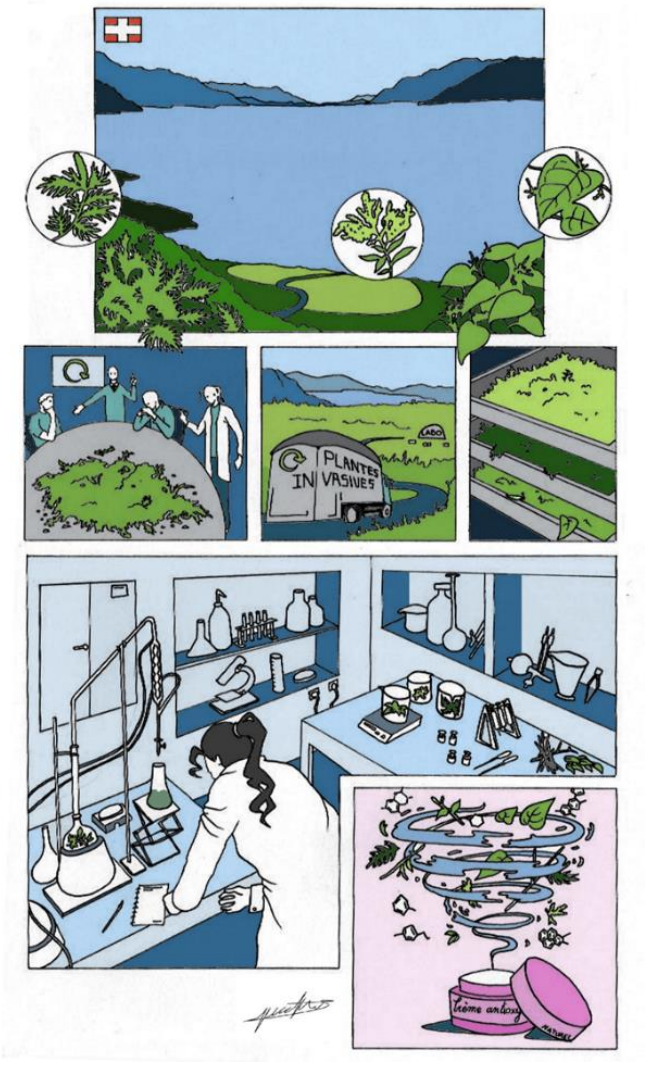
Valorisation chimique d'espèces végétales exotiques envahissantes du territoire Savoie Mont Blanc : applications en dermo-cosmétique et nutraceutique

Thèse soutenue publiquement le **11/12/2024**
devant le jury composé de :

Mme Florence PIOLA
Maîtresse de Conférences -Habilités à Diriger des Recherches, LEHNA, Université Lyon 1 – CNRS (Rapportrice)
M. Xavier FERNANDEZ
Professeur des Universités, INC, Université Côte d'Azur – CNRS (Rapporteur)
Mme Christiane GALLET
Professeur des Universités, LECA, l'Université Grenoble Alpes et Université Savoie Mont-Blanc – CNRS (Examinatrice, Président du jury)
Mme Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES
Maître de Conférences -Habilités à Diriger des Recherches, INRAE MétaboHUB, Université Lyon 1 (Examinatrice)
M. Félix TOMI
Professeur des Universités, SPE, Università di Corsica Pasquale Paoli – CNRS (Examinateur)
M. Grégory CHATEL
Maître de Conférences -Habilités à Diriger des Recherches, EDYTEM, Université Savoie Mont-Blanc – CNRS (Directeur de thèse)

A ma famille,

A toi mon chéri.



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Madame Florence Piola et Monsieur Xavier Fernandez qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs. De même, je remercie Mesdames Christiane Gallet et Anne-Emmanuelle Hay de Bettignies ainsi que Monsieur Félix Tomi d'avoir acceptés d'être examinateurs de ce travail. Leurs travaux m'ont beaucoup inspiré et je suis honorée qu'ils m'accompagnent dans cette dernière étape du travail.

Je souhaiterais remercier sincèrement mon directeur de thèse Grégory Chatel ainsi que mes co-encadrantes Christine Piot et Micheline Draye de m'avoir choisi pour mener à bien ce travail, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire Environnements Dynamiques et Territoires de Montagnes (EDYTEM), de m'avoir accompagné et encadré au quotidien, et soutenu dans mes choix. Je me souviendrais toujours de ce jour où ils m'ont annoncé le démarrage de ce beau projet. Je leur suis reconnaissante pour la confiance qu'ils m'ont témoignée dans ce travail ainsi que pour la grande autonomie qu'ils m'ont accordée. Je tiens à remercier également Yves Perette directeur du laboratoire EDYTEM et Jean-Luc Besombes, directeur du Collège doctoral de l'Université Savoie Mont Blanc (USMB) de m'avoir intégré au sein de l'équipe et soutenu durant toutes ces années. Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du laboratoire, Bernard David, Mathieu Pin, Laurence Reinert, Nathalie Cottin, Violaine Naffrechoux, Sylvie Guittonneau, Philippe Fanget, Emmanuel Naffrechoux, Emilie Chalmin, Magali Rossi, Nathalie Kardos, David Gateuille, Laurent Duclaux, …, doctorants, stagiaires et post-doctorants avec qui j'ai passé une belle aventure et de très bons moments de partage. Je tiens à également à remercier particulièrement Annie Millery et Geneviève Chiapuso des laboratoires et unités voisins USMB pour nos échanges autour des plantes et de nos thématiques proches. J'ai apprécié leurs conseils avisés et leurs soutiens. Je voudrais aussi remercier toutes les filles du pôle gestion administratif et financière, ainsi que Virginie Thivillon gestionnaire administrative, pour leurs aides dans toutes les démarches. Mes remerciements vont également aux filles des *TPs* de l'USMB qui m'ont beaucoup apporté et soutenu. Je remercie le Conseil Savoie Mont Blanc et Equo vivo pour leurs co-financements dans ce projet. Je remercie sincèrement les membres d'EquoVivo avec qui j'ai eu de beaux et constructifs échanges autour de la thématique des espèces végétales exotiques envahissantes.

Je tiens à remercier également Messieurs Pascal Bonnet et Sylvain Routier, directeurs successifs de l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) de m'avoir reçu au sein de l'institut et de m'avoir permis de travailler aux côtés des membres de l'équipe Stratégies Analytiques, Affinités et Bioactifs. Je remercie aussi Sophie Nicourt de m'avoir aidé dans tous les cheminements administratifs. Mes remerciements vont également à Patrice André pour ses conseils et pour toute l'aide qu'il a pu apporter dans la mise en place de la collaboration ICOA/EDYTEM. Cette expérience à l'ICOA a été très enrichissante pour moi, tant dans le travail que sur le plan humain. J'ai apprécié chaque moment, chaque échange avec l'ensemble des membres de l'institut. Je voudrais remercier tout particulièrement Emilie Destandau et David Da Silva pour leur gentillesse, leur confiance, leur disponibilité, leur encadrement et leur soutien dans chaque étape. J'ai apprécié nos nombreuses discussions et

leur encouragement à aller toujours plus loin. Sincèrement, merci à vous deux pour tout. Je remercie également Reine NEHMÉ, responsable de l'équipe, ainsi que Rouba Nasreddine, pour leur aide précieuse en électrophorène capillaire. Laëtitia Fougère et Cyril Colas, je vous remercie pour votre aide et nos moments d'échange autour de la spectrométrie de masse. J'ai passé d'agréables instants avec vous Gaëlle Buche, Pierre-Eric Campos, Sandrine Zubrzycki, Alexandra Launay, Marine Chambaud, Audrey Le Cabec, et tous les autres membres du laboratoire, et vous en remercie.

J'adresse également mes remerciements à Pierre Bernard Savary, président du Club de CCM, pour nos discussions autour de l'HPTC et son soutien dans ce travail. Je souhaiterais dire quelques mots également à mon professeur de sciences physiques au lycée Valérie Bourel-Belforte, qui est la toute première personne à m'avoir donné envie d'aller vers le domaine de la Chimie et de même, pour Sébastien Ulrich, un de mes encadrants en chimie à l'Université de Montpellier et anciennement directeur de stage, d'avoir éveillé ma curiosité en sciences, de m'avoir beaucoup appris sur les techniques analytiques et de caractérisation et de m'avoir soutenu dans la poursuite en thèse. Je tiens également à remercier mes encadrants de l'Université de Corse, avec qui j'ai appris énormément sur la phytochimie, la botanique et la cosmétique. Ce sont eux qui m'ont donné envie de poursuivre dans cette voie, d'apprendre toujours plus et d'aller vers ce sujet de thèse.

Un grand merci également à ma famille et amis proches qui ont su m'épauler à n'importe quel moment, qui ont cru en moi, qui m'ont fait grandir et pour leur enthousiasme. Mes parents, je vous aime et je vous remercie d'être là pour moi, de m'avoir permis de faire des études (qui l'eût cru !), de me laisser faire mes choix et de me soutenir quoi qu'il en soit. Ma sœur, toi et Khloé vous êtes précieuses pour moi, je vous remercie pour votre soutien, votre humeur à toute épreuve, votre encouragement et vos sourires. Je vous aime. Enfin, je termine par remercier mon chéri, et je ne sais pas par quoi commencer… Sans toi je n'y serais jamais arrivé. Tu as su être présent pour moi dans tous les moments positifs et les plus difficiles, tu m'as aidé dans tous mes choix, dans mon quotidien, tu as su me supporter tout au long de ses années et me porter vers le haut, me donner de la joie, du bonheur et de la bonne humeur. Je te remercie pour tes dessins et le temps consacré. Tu m'as aéré avec nos animaux, tu m'as donné le sourire quand je ne l'avais pas. Je t'aime, je te remercie d'être toi et j'espère que nous irons encore plus loin ensemble.

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS

- Draye M.; Chevallier M. L.; **Quinty V.**; Besnard C.; Vandeponseele A.; Chatel G. Sustainable activation of chemical substrates under sonochemical conditions. CHAPTER 8. Sustainable organic synthesis: tools and strategies. *The Royal Society of Chemistry*. **2021**; 212-237. https://doi.org/10.1039/9781839164842-00212

- **Quinty V.**; Colas C.; Nasreddine R.; Nehmé R.; Piot C.; Draye M.; Destandau E.; Da Silva D.; Chatel G. Screening and evaluation of dermo-Cosmetic activities of the invasive plant species *Polygonum cuspidatum*. *Plants*. **2023**; 12, 83. https://doi.org/10.3390/plants12010083

- **Quinty V.**; Nasreddine R.; Colas C.; Launay A.; Nehmé R.; El-Khiraoui A.; Piot C.; Draye M.; Destandau E.; Da Silva D.; Chatel G. Antioxidant and anti-lipase capacities from the extracts obtained from two invasive plants: *Ambrosia artemisiifolia* and *Solidago canadensis*. *Food Bioscience*. **2023**; 55, 103069. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103069

COMMUNCATIONS PAR AFFICHES

- **QUINTY V.** ; Piot C.; Draye M.; Chatel G. InvaVAL project: Valorization of invasive plants in Savoie Mont-Blanc territory: green chemistry and circular economy strategies. *Journée des Doctorants de l'ED SIE*, Le Bourget du Lac, **2019**.

- **QUINTY V.** ; Da Silva D.; Colas C.; Piot C.; Draye M.; Destandau E.; Chatel G. Valorisation de plantes invasives de Savoie/Haute-Savoie : mise en place d'un criblage d'actifs par CCM-Bioautographie couplée à la spectrométrie de masse. *14ème Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages de l'AfSEP*, *SEP 21,* Paris, **2021**.

- **QUINTY V.** ; Da Silva D.; Colas C.; Piot C.; Draye M.; Destandau E.; Chatel G. Criblage d'inhibiteurs de la tyrosinase de plantes invasives du territoire Savoie Mont Blanc par couplage CCM-bioautographie/HRMS. *COSM'ING 2021*, Palais du Grand Large - Saint-Malo, **2021**.

- **QUINTY V.** ; Da Silva D.; Colas C.; Piot C.; Draye M.; Destandau E.; Chatel G. Analyse phytochimique et criblage d'extraits de Renouée du Japon, une espèce végétale exotique envahissante en Savoie Mont Blanc, sur des cibles enzymatiques dermocosmétiques. *Journée de la Société Chimique de France Rhône Alpes*, Le Bourget du Lac, **2022**.

COMMUNICATIONS ORALES

- **Quinty V.** ; Saint-Raymond C. ; Dusaucy J. L'Homme et la nature : un couple en sursis ? *Fête de la science*, Centre des congrès, le Manège, Chambéry, **2020**.
- **Quinty V.** Ma thèse en 180 secondes. *Fête de la science*, Centre des congrès, le Manège, Chambéry, **2020**.
- Bernard Savary P. ; **Quinty V.** ; Rogeboz P. L'HPTLC et la sécurité : perturbateurs endocriniens et autres sujets d'actualité. *Club de Chromatographie sur Couches Minces*, Salon Forum Labo Paris expo, Porte de Versailles, **2021**.
- **QUINTY V.** ; Da Silva D. ; Colas C. ; Piot C. ; Draye M. ; Destandau E. ; Chatel G. Mise en place du couplage CCM-bioautographie/HRMS pour le criblage d'actifs dermocosmétiques présents dans des plantes invasives savoyardes. *Club Jeunes AfSEP*, **2021**.
- **Quinty V.** Concours Ma thèse en 180 secondes. *Pré-sélection locale*, Chambéry et *sélection finale*, Grenoble, **2021**.
- **Quinty V.** Podcast Que faire des mauvaises herbes dans les Alpes ? *Allodocs #10*, **2021**.
- **Quinty V.** Conférence Quels outils futurs pour la lutte contre l'ambroisie ? *Journée Observatoire Ambroisie 10 ans*, **2021**.
- **Quinty V.** MT180. Observatoire des Sciences de l'Univers de Grenoble (OSUG), J*ournée de l'Obs'! Sciences Participatives*, ISTerre Gières, **2021**.
- **Quinty V.** Conférence Un autre devenir pour les plantes envahissantes du territoire ? *Centre de conférences Aqualis*, *CISALB,* Aix les Bains, **2021**.
- **Quinty V.** Concours Etonnants découvreurs. *COSM'ING 2021*, Palais du Grand Large - Saint-Malo, **2021**.
- **Quinty V.** ; Da Silva D.; Colas C.; Piot C.; Draye M.; Destandau E.; Chatel G. Recherche de nouvelles alternatives de traitement des déchets de plantes invasives avec l'HPTLC-Bioautographie/HRMS. *Club de Chromatographie sur Couches Minces*, Salon Forum Labo Lyon, Centre de congrès de Lyon, **2022**.

MISSIONS COMPLEMENTAIRES

- Contrat doctoral : 179 h de formations, enseignements de Travaux Dirigés (10,5 h) en Licence de Chimie organique
- Encadrement d'un stagiaire (Ali El-Khiraoui)
- Bénévolat dans l'organisation du *14ème Congrès SEP 21,* Paris, **2021**.
- Interviews des Gestionnaires du territoire Savoie Mont Blanc, Reportages TV divers
- Lettre de l'Observatoire des ambroisies, N °75 avril 2021, Description Projet.
- Dessins collaboratifs *BD documentaire*, Vulgarisation du projet de thèse, avec Pierre Alexis Letiche.

LISTES DES SYMBOLES, FORMULES ET ABREVIATIONS UTILISES

Symbole, formule, abbréviation	Signification
ACN	Acétonitrile
AH	Acide Hyaluronique
Trolox	Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2carboxylique
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
ACP	Analyse en Composantes Principale
AF	Acide formique
ANOVA	Analyse de la variance (*ANalysis Of VAriance*)
A. artemisiifolia	*Ambrosia artemisiifolia*
BPC	*Base Peak Chromatograms*
$CHCl_3$	Chloroforme
CPA	Surface du pic corrigé
CPL	Chromatographie en Phase Liquide
CQA	Acide caféoylquinique
Cu	Cuivre
DAD	Détecteur à barrette de diode (*Diode Array Detector*)
DCQA	Acide dicaféoylquinique
EAG	Equivalence en Acide Gallique
EC	Electrophorèse capillaire (*Capillary Electrophoresis*)
EEE	Espèce Exotique Envahissante
EGCG	Epigallocatéchine gallate
ER	Equivalence en Rutine
ESI-MS	Spectrométrie de masse en mode ionisation par électrospray (*ElectroSpray Ionization-Mass Spectrometry*)
EtOH	Ethanol
EVEE	Espèce Végétale Exotique Envahissante (*Invasive Alien Plant Species* ou *Invasive Plant Species* ou même *Invasive Plants*)
F. japonica	*Fallopia japonica*
Fe	Fer
$FeCl_3$	Chlorure de fer
FRAP	Pouvoir antioxydant réducteur du fer ferrique (*Ferric Reducing Antioxydant Power*)
H_2O	Eau
HPLC	Chromatographie liquide haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*)
HPTLC	Chromatographie sur couche mince haute performance (*High Performance Thin Layer Chromatograph*y)
hRf	Centaine de rétention frontale *(Rapport frontal hundred)*
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution *(High Resolution Mass Spectrometry*)
m/z	Rapport masse/charge
MeOH	Méthanol

mg	Milligramme
min	Minute
MAE	Macération assistée par micro-ondes (*microwave-assisted extraction*)
MS	Spectrométrie/spectromètre de masse (*Mass Spectrometry/Spectrometer*)
MTP	MicroTitration 96 Puits
Na_2CO_3	Carbonate de sodium
Na_2SO_4	Sulfate de sodium
NEU	Amino-2-éthyle diphénylborate
NH_4OH	Ammoniaque
p	*p*-value
PEG	Polyéthylène glycol
Q-TOF	Quadrupole - détecteur de masse à temps de vol (*Quadrupole Time-Of-Flight*)
Rf	Rapport frontal
s	Seconde
SOD	Superoxyde dismutase
S. canadensis	*Solidago canadensis*
T °C	température en °C
TFC	Teneur en flavonoïdes totaux (*Total Phenolic Content*)
TLC	Chromatographie sur Couche Mince (*Thin Layer Chromatography*)
TPC	Teneur en composés phénoliques totaux (*Total Phenolic Content*)
UHPLC	Chromatographie liquide ultra-haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*)
UICN	Union Internationale pour la Conservation de la Nature
UV	UltraViolet
XOD	Xanthine oxydase

GLOSSAIRE BOTANIQUE, MEDICAL ET BIOLOGIQUE

Adipocyte : cellule de l'organisme responsable du stockage de la graisse et réserve d'énergie.
Angiogenèse : processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux existants.
Bractée : petite feuille accompagnant les pédoncules ou les fleurs, et différant des autres feuilles par sa forme ou sa couleur.
Capitule : inflorescence à fleurs sessiles ou subsessiles et serrées en tête sur un réceptacle commun, simulant une seule fleur (caractéristique des Astéracées).
Cellule de Langerhans : cellule présentatrice d'antigène du tissu cutané assurant la défense contre les microorganismes par activation du système immunitaire.
Cellule de Merkel : cellule du système neuroendocrinien localisée dans la couche basale de l'épiderme et spécialisée dans la perception du toucher.
Ecosystème : est un ensemble d'organismes vivants (végétaux, animaux, etc.) et de leur environnement associé (climat, altitude, géologie, etc.) dans un espace délimité. Ces organismes vivants et leur environnement sont en interaction.

Espèce exotique : une espèce, sous-espèce ou un taxon inférieur introduit par l'homme à l'extérieur de sa région naturelle ou n'importe quelle partie, gamète, graine, œuf ou propagule de cette espèce capable de survivre et de se reproduire par la suite.
Espèces exotiques envahissantes : conformément aux définitions de l'Union internationale pour la conservation de la nature (UICN), de la Convention sur la diversité biologique, du Parlement européen et du Conseil de l'Europe, une espèce exotique envahissante est une espèce introduite par l'homme en dehors de son aire de répartition naturelle (volontairement ou fortuitement) et dont l'implantation et la propagation menacent les écosystèmes, les habitats ou les espèces indigènes avec des conséquences écologiques et/ou économiques et/ou sanitaires négatives.
Espèce indigène : une espèce, sous-espèce ou un taxon inférieur présent naturellement à l'intérieur d'un territoire, y compris la zone qu'elle peut atteindre et occuper en utilisant ses propres moyens de déplacement.
Espèces introduites : n'induisent pas toutes des conséquences négatives au sein des écosystèmes dans lesquelles elles s'installent. Seule une partie d'entre-elles est à l'origine d'impacts négatifs, directs ou indirects, observés à différents niveaux. Elles peuvent causer de graves impacts écologiques en affectant la composition spécifique et le fonctionnement des écosystèmes d'accueil, engendrer des conséquences socio-économiques en perturbant certaines activités économiques (agriculture, foresterie, etc.), et affecter la santé humaine.
Espèce naturalisée : une espèce, sous-espèce ou un taxon inférieur exotique dont les populations se reproduisent et se perpétuent de manière autonome, sans l'aide de l'homme.
Fibroblaste : cellule du tissu conjonctif qui sécrète les composés de la matrice extracellulaire et les protéines du tissu conjonctif.
Glabre : dépourvu de pilosité
in silico : qualifie les recherches effectuées au moyen de calculs mathématiques informatisés.
Introduction intentionnelle ou volontaire : déplacement délibéré et/ou libération par l'homme d'une espèce exotique hors de son aire de répartition naturelle.
Introduction accidentelle ou fortuite : toute autre introduction qui n'est pas intentionnelle.
Invasion biologique : phénomène correspondant à l'expansion d'une espèce hors de son aire de répartition naturelle, y constituant, une ou des populations pérennes et autonomes, généralement sans aide humaine dans les milieux colonisés. Trois phases, l'arrivée, l'établissement, l'expansion, y sont généralement discriminées.
in vitro : qualifie des observations, recherches et examens réalisés en tubes ou plaques, hors de l'organisme vivant ou de la cellule.
in vivo : qualifie un processus biologique observé au sein d'un organisme vivant.
Involucre : réunion de bractées, verticillées ou imbriquées, insérées à la base d'une inflorescence.
Kératinocyte : cellule constitutive de l'épiderme synthétisant la kératine et participant à la protection de la peau contre les rayons ultraviolets par accumulation de mélanine.
Lancéolé : en forme de fer de lance, atténué aux deux bouts, plus longuement au sommet.
Mélanine : substance pigmentaire présente dans la peau, les cheveux, les poils et l'épithélium pigmentaire de l'iris.
Mélanocyte : cellule localisée dans l'épiderme ou le derme et responsable de la pigmentation de la peau par sécrétion de mélanine.
Pédoncule : support d'une ou plusieurs fleurs.
Protozoaire : organisme unicellulaire eucaryote hétérotrophe qui ingère sa nourriture par phagocytose.
Pubescent : garni de poils fins, mous, courts et peu serrés.
Radicaux libres : molécules chimiques instables possédant un électron célibataire lui procurant une grande réactivité vis-à-vis des molécules environnantes.
Services écologiques : désignent les bénéfices que nous pouvons tirer de la nature (par exemple la nourriture, le bois, l'eau douce, *etc.*).

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS ..... D
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES ..... F
LISTES DES SYMBOLES, FORMULES ET ABREVIATIONS UTILISES ..... H
GLOSSAIRE BOTANIQUE, MEDICAL ET BIOLOGIQUE I
TABLES DES MATIERES ..... K
INTRODUCTION GENERALE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 9

I. GESTION ET VALORISATION D'ESPECES VEGETALES EXOTIQUES ENVAHISSANTES 10
A. POURQUOI FAUT-IL PRESERVER LA BIODIVERSITE ? 10
B. PARTICULARITES DU TERRITOIRE SAVOIE MONT BLANC 11
C. MOYENS DE LUTTE ACTUELS 12
D. RECHERCHE DE NOUVELLES PISTES DE VALORISATION 13
II. RECHERCHE DE NOUVEAUX ACTIFS : APPLICATIONS EN DERMO-COSMETIQUE ET NUTRACEUTIQUE 14
A. LE VIEILLISSEMENT CUTANE 14
1. STRUCTURE & FONCTIONNEMENT DE LA PEAU 14
2. DESCRIPTION & CARACTERISTIQUES DU VIEILLISSEMENT CUTANE 15
3. FAVORISER LA REPARATION CUTANEE 16
B. L'OBESITE 17
1. ROLE, DIGESTION & METABOLISME DES LIPIDES DANS LE CORPS HUMAIN 17
2. RISQUES LIEES A L'OBESITE 18
3. TRAITEMENTS ACTUELS DE L'OBESITE 19
C. EVALUATION D'ACTIVITES BIOLOGIQUES 19
1. ACTIVITE ANTIOXYDANTE 19
2. ACTIVITE ANTI-HYALURONIDASE 22
3. ACTIVITE ANTI-ELASTASE 24
4. ACTIVITE ANTI-COLLAGENASE 25
5. ACTIVITE ANTI-TYROSINASE OU BLANCHISSANTE 26
6. ACTIVITE ANTI-LIPASE 28
D. OUTILS D'AIDE A LA RECHERCHE D'ACTIFS 29
1. L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE 29
2. LA BIOAUTOGRAPHIE 31
III. PRESENTATION DES TROIS ESPECES ETUDIEES 33
A. TAXONOMIE 33
B. PRESENTATION DE *FALLOPIA JAPONICA* 35
1. DESCRIPTION BOTANIQUE 35
2. ORIGINE DE SON INTRODUCTION & REPARTITION GEOGRAPHIQUE 36
3. IMPACTS NEGATIFS ENVIRONNEMENTAUX, SECURITAIRES ET ECONOMIQUES 37
4. UTILISATIONS TRADITIONNELLES 37
5. CHIMIODIVERSITE 38
a) LA CLASSE DES STILBENOIDES 43
b) LA CLASSE DES QUINONES 44
c) LA CLASSE DES FLAVONOIDES 45
C. PRESENTATION D'*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* 46
1. DESCRIPTION BOTANIQUE 46
2. ORIGINE DE SON INTRODUCTION & REPARTITION GEOGRAPHIQUE 47
3. IMPACTS NEGATIFS SANITAIRES, ENVIRONNEMENTAUX ET ECONOMIQUES 47
4. UTILISATIONS TRADITIONNELLES 48
5. CHIMIODIVERSITE 49
a) LA CLASSE DES ACIDES PHENOLIQUES 53
b) LA CLASSE DES FLAVONOIDES 54
c) LA CLASSE DES SESQUITERPENES LACTONES & AUTRES SESQUITERPENOIDES 55
D. PRESENTATION DE*SOLIDAGO CANADENSIS* 56
1. DESCRIPTION BOTANIQUE 56
2. ORIGINE DE SON INTRODUCTION & REPARTITION GEOGRAPHIQUE 57
3. IMPACTS NEGATIFS ECOLOGIQUES, ENVIRONNEMENTAUX ET SOCIO-ECONOMIQUES 57
4. UTILISATIONS TRADITIONNELLES 58
5. CHIMIODIVERSITE 59
a) LA CLASSE DES ACIDES PHENOLIQUES 63

b) LA CLASSE DES FLAVONOIDES 64
c) LA CLASSE DES DITERPENOIDES DES TYPES LABDANE & CLERODANE 65
IV. ETUDE DES EXTRAITS VEGETAUX NATURELS 66
A. TECHNIQUES D'EXTRACTION 66
1. CAS PARTICULIER DE LA MACERATION ASSISTEE PAR ULTRASONS 67
2. CAS PARTICULIER DE LA MACERATION ASSISTEE PAR MICRO-ONDES 69
3. OPTIMISATION DE L'EXTRACTION PAR PLAN D'EXPERIENCES 73
a) PRINCIPE ET AVANTAGES DU PLAN D'EXPERIENCES 73
b) CAS PARTICULIER DU PLAN POUR SURFACE DE REPONSE COMPOSITE CENTRE 74
B. TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CARACTERISATION 77
1. LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE (ULTRA)-HAUTE PERFORMANCE 77
2. LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUHE MINCE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (TLC/MS) 78

TRAVAUX REALISES 80

I. CRIBLAGE ET EVALUATION DES ACTIVITES DERMO-COSMETIQUES DES EXTRAITS BRUTS 81
A. INTRODUCTION 81
B. EVALUATION DE PARAMETRES INFLUENÇANT LE RENDEMENT D'EXTRACTION A PARTIR DE FEUILLES DE *FALLOPIA JAPONICA* 82
C. COMPARAISON DE PROFILS POLYPHENOLIQUES D'EXTRAITS DIVERS DE *FALLOPIA JAPONICA* 84
D. DETERMINATION DES ACTIVITES DERMO-COSMETIQUES 86
1. DETERMINATION DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES 86
a) DISCUSSION AUTOUR DES RESULTATS OBTENUS PAR VOIE CHIMIQUE 86
b) DISCUSSION AUTOUR DES RESULTATS OBTENUS PAR VOIE ENZYMATIQUE 90
2. EVALUATION DES EFFETS INHIBTEURS 91
a) SUR LA HYALURONIDASE 91
b) SUR L'ELASTASE 93
c) SUR LA COLLAGENASE 95
d) SUR LA TYROSINASE 97
E. DETERMINATION DES TENEURS EN COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX ET EN FLAVONOÏDES TOTAUX 99
F. PROFILS PHYTOCHIMIQUES DES EXTRAITS BRUTS 101
1. CARACTERISATION DES SUCRES 101
2. CARACTERISATION DES LIPIDES ET DES TERPENES 103
3. CARACTERISATION DES COMPOSES PHENOLIQUES 106
4. VARIABILITE POLYPHENOLIQUE : INFLUENCE DE L'ORGANE 109
G. CONCLUSION 111
II. VALORISATION DANS LE SECTEUR DERMO-COSMETIQUE 112
A. INTRODUCTION 112
B. VALORISATION DANS LE SECTEUR DERMO-COSMETIQUE DE *FALLOPIA JAPONICA* 113
1. COMPARAISON DES FLEURS ET DES FEUILLES 113
2. CARACTERISATION DES PRINCIPAUX ANTIOXYDANTS 118
3. IDENTIFICATION DES PRINCIPAUX INHIBITEURS DE LA TYROSINASE 120
4. CRIBLAGE DERMO-COSMETIQUE DE STANDARDS SELECTIONNES 125
5. CARACTERISATION DES ORGANES ET DISCUSSION SUR LES ACTIVITES BIOLOGIQUES OBSERVEES 129
6. INFLUENCE DE LA QUANTITE D'EAU LORS DE L'EXTRACTION DE *FALLOPIA JAPONICA* SUR LES TENEURS DE SES ACTIFS PRINICIPAUX 132
C. VALORISATION DANS LE SECTEUR DERMO-COSMETIQUE D'*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* ET DE *SOLIDAGO CANADENSIS* 136
1. CARACTERISATION DES PRINCIPALES MOLECULES ANTIOXYDANTES 136
2. INFLUENCE DU STADE DE DEVELOPPEMENT D'*A. ARTEMISIIFOLIA* SUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES 138
3. MISE EN EVIDENCE DES PRINCIPAUX INHIBITEURS DE LA TYROSINASE 140
4. CRIBLAGE DERMO-COSMETIQUE DE STANDARDS SELECTIONNES ET DISCUSSION SUR LES ACTIVITES BIOLOGIQUES OBSERVEES 142
D. CONCLUSION 146
III. VALORISATION DANS LE SECTEUR NUTRACEUTIQUE D'AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA ET DE SOLIDAGO CANADENSIS ... 149
A. INTRODUCTION 149
B. PROPRIETE NUTRACEUTIQUE 150
C. EVALUATION DES COMPOSITIONS PHYTOCHIMIQUES DES ORGANES D'*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* ET DE *SOLIDAGO CANADENSIS* 152
D. CORRELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE ANTI-LIPASE 156
E. CONCLUSION 159

IV. INFLUENCE DES PARAMETRES D'EXTRACTION SUR LES TENEURS EN ACTIFS PRINCIPAUX CHEZ AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA ET SOLIDAGO CANADENSIS *161*
A. INTRODUCTION 161
B. CONSTRUCTION DU PLAN D'EXPERIENCES 163
1. DETERMINATION DES PARAMETRES EXPERIMENTAUX (FACTEURS) ET DE LEURS DOMAINES D'ETUDE 163
2. EVALUATION DE LA QUANTITE EXTRAITE ET DES TENEURS EN ACTIFS PRINCIPAUX (REPONSES) 164
C. EFFETS DES PARAMETRES D'EXTRACTION 165
1. REPRESENTATIVITE DES REPONSES 165
2. FACTEURS D'INFLUENCE DU RENDEMENTS D'EXTRACTION 168
3. TENEURS EN 5-*O*-CQA 170
4. TENEURS EN ACIDE 3,5-DCQA 173
5. SOMMES DES ACIDES 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA 176
D. VERS L'ENRICHISSEMENT DES EXTRAITS EN ACTIFS ? 179
E. CONCLUSION 181
V. ETUDE DE LA VARIABILITE PHYTOCHIMIQUE DES ESPECES VEGETALES EXOTIQUES ENVAHISSANTES *183*
A. INTRODUCTION 183
B. VARIABILITE PHYTOCHIMIQUE DE *FALLOPIA JAPONICA* 185
1. VARIABILITE POLYPHENOLIQUE : INFLUENCE DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE 185
2. IMPACTS DE L'ORGANE ET DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE SUR LES RENDEMENTS D'EXTRACTION 187
C. VARIABILITE PHYTOCHIMIQUE D'*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* 188
1. VARIABILITE POLYPHENOLIQUE : INFLUENCE DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE 188
2. IMPACTS DE L'ORGANE, DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE ET DU STADE DE DEVELOPPEMENT SUR LES RENDEMENTS D'EXTRACTION 191
D. VARIABILITE PHYTOCHIMIQUE DE *SOLIDAGO CANADENSIS* 193
1. VARIABILITE POLYPHENOLIQUE : INFLUENCE DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE 193
2. IMPACTS DE L'ORGANE ET DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE SUR LES RENDEMENTS D'EXTRACTION 196
E. CONCLUSION 197
CONCLUSION GENERALE : VERS LA MISE EN PLACE D'UNE FILIERE DURABLE DE VALORISATION CHIMIQUE ? 199

PARTIE EXPERIMENTALE 205

I. MATIERES PREMIERES VEGETALES DU TERRITOIRE SAVOIE MONT BLANC *206*
II. REACTIFS ET SOLVANTS *209*
III. APPAREILLAGE *209*
A. EXTRACTIONS 209
1. MACERATION CONVENTIONNELLE 209
2. MACERATION ASSISTEE PAR ULTRASONS 209
3. MACERATION ASSISTEE PAR MICRO-ONDES 209
B. DOSAGES CHIMIQUES ET ENZYMATIQUES *IN VITRO* 210
C. ELECTROPHORESE CAPILLAIRE 210
D. HPTLC 210
E. COUPLAGE DE L'(HP)TLC A L'(HR)MS 210
F. UHPLC-UV/MS 211
IV. CONDITIONS OPERATOIRES DES TRAVAUX REALISES *212*
A. CRIBLAGE ET EVALUATION DES ACTIVITES DERMO-COSMETIQUES DES EXTRAITS BRUTS 212
1. EVALUATION DE PARAMETRES INFLUENÇANT LE RENDEMENT D'EXTRACTION A PARTIR DE FEUILLES DE *FALLOPIA JAPONICA* 212
2. COMPARAISON DE PROFILS POLYPHENOLIQUES D'EXTRAITS DIVERS DE *FALLOPIA JAPONICA* 212
3. TESTS DES ACTIVITES DERMO-COSMETIQUES 213
a) DOSAGES DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE 213
(1) DOSAGES CHIMIQUES *IN VITRO* 213
(2) DOSAGE INDIRECT DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE *IN VITRO* 215
b) DOSAGES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES 215
(1) ACTIVITE ANTI-HYALURONIDASE ET CONDITIONS DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE 215
(2) ACTIVITE ANTI-ELASTASE *IN VITRO* 216
(3) ACTIVITE ANTI-COLLAGENASE *IN VITRO* 217
(4) ACTIVITE BLANCHISSANTE *IN VITRO* 218
c) ANALYSES STATISTIQUES 218
4. DETERMINATION DES TENEURS EN COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX ET EN FLAVONOÏDES TOTAUX 219
5. CARACTERISATION DES PRINCIPALES FAMILLES MOLECULAIRES ANALYSES PAR HPTLC 219
a) CARACTERISATION DES SUCRES 220
b) CARACTERISATION DES LIPIDES ET DES TERPENES 220
c) CARACTERISATION DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES 221

6. VARIABILITE POLYPHENOLIQUE : INFLUENCE DE L'ORGANE 221
B. VALORISATION DANS LE SECTEUR DERMO-COSMETIQUE 221
1. VALORISATION DANS LE SECTEUR DERMO-COSMETIQUE DE *FALLOPIA JAPONICA* 221
a) COMPARAISON DES FLEURS ET DES FEUILLES 221
b) CARACTERISATION DES ANTIOXYDANTS 222
c) CARACTERISATION DES INHIBITEURS DE LA TYROSINASE 223
d) CRIBLAGE DERMO-COSMETIQUES DE STANDARDS SELECTIONNES 224
e) CARACTERISATION DES ORGANES PAR UHPLC-UV/HRMS/MS 224
e) INFLUENCE DE LA QUANTITE D'EAU LORS DE L'EXTRACTION SUR LES TENEURS EN ACTIFS PRINICIPAUX 224
2. VALORISATION DANS LE SECTEUR DERMO-COSMETIQUE D'*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* ET DE *SOLIDAGO CANADENSIS* 225
a) CARACTERISATIONS DES ANTIOXYDANTS ET DES INHIBITEURS DE lA TYROSINASE 225
b) INFLUENCE DU STADE DE DEVELOPPEMENT D'*A. ARTEMISIIFOLIA* SUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES 225
a) CRIBLAGE DERMO-COSMETIQUE DE STANDARDS SELECTIONNES 226
C. VALORISATION DANS LE SECTEUR NUTRACEUTIQUE D'*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* ET DE *SOLIDAGO CANADENSIS* 226
1. PREPARATION DES ECHANTILLONS 226
2. TEST DE L'ACTIVITE ANTI-LIPASE ET CONDITIONS DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE 227
3. CARACTERISATION DES ORGANES PAR UHPLC-UV/ESI-QqTOF-HRMS/MS 228
D. OPTIMISATIONS DE LA MACERATION ASSISTEE PAR MICRO-ONDES : INFLUENCE DES PARAMETRES SUR LES TENEURS EN ACTIFS PRINCIPAUX 228
1. MATIERES PREMIERES UTILISEES 228
2. CONSTRUCTION ET MODELISATION DES PLANS D'EXPERIENCES 228
3. REALISATION DES ESSAIS 229
4. VERS L'ENRICHISSEMENT DES EXTRAITS EN ACTIFS ? 231
E. ETUDE DE LA VARIABILITE PHYTOCHIMIQUE DES ESPECES VEGETALES EXOTIQUES ENVAHISSANTES 231
1. PREPARATION DES EXTRAITS 231
2. VARIABILITE POLYPHENOLIQUE : INFLUENCE DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE 231
a) CHEZ *FALLOPIA JAPONICA* 231
b) CHEZ *AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* 232
c) CHEZ *SOLIDAGO CANADENSIS* 232
LISTES DES FIGURES 233
LISTES DES TABLEAUX 237
ANNEXES 237
I. STRUCTURES AUTRES COMPOSES IDENTIFIES CHEZ FALLOPIA JAPONICA 237
II. PRINCIPALES SAPONINES IDENTIFIEES CHEZ SOLIDAGO CANADENSIS 238
III. PRINCIPAUX POLYACETYLENES IDENTIFIES CHEZ SOLIDAGO CANADENSIS 238
IV. PRINCIPE DE LA SOURCE ELECTROSPRAY (ESI) 238
V. DOSAGES ABTS, CUPRAC, FRAP ET DE CHELATION AU FER DE FALLOPIA JAPONICA 239
VI. SPECTRES DE MASSES OBTENUS DES COMPOSES NON IDENTIFIES (NI) 240
VII. BPCS MODE D'IONISATION NEGATIF DES ORGANES D'AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA ET SOLIDAGO CANADENSIS 241
VIII. COURBES D'ETALONNAGE DU 5-O-CQA ET DU 3,5-DCQA 241
IX. REPONSES OBTENUES POUR LES DEUX PLANS D'EXPERIENCES 242
X. COURBE D'ETALONNAGE TENEURS EN COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX (TPC) 243
XI. COURBE D'ETALONNAGE TENEURS EN FLAVONOÏDES TOTAUX (TFC) 243
XII. COURBES D'ETALONNAGE POLYDATINE, RESVERATROL ET EMODINE 244
REFERENCES 244
RESUME 269
ABSTRACT 269

INTRODUCTION GENERALE

L'implantation d'espèces exogènes est devenue en quelques décennies l'une des principales causes d'érosion de la biodiversité à l'échelle mondiale au même titre que la destruction des habitats naturels, la surexploitation des ressources, les pollutions ou encore le changement climatique [1]. Les espèces introduites volontairement ou accidentellement par l'Homme en dehors de leur aire de répartition d'origine, peuvent devenir envahissantes lorsqu'elles réussissent à s'établir dans le milieu d'accueil (*Figure 1*). Ces espèces exotiques envahissantes (EEE) impactent l'ensemble de la surface terrestre et concernent tous les types d'organismes tels que les virus, champignons, algues, plantes vasculaires, invertébrés, reptiles, amphibiens, oiseaux, poissons et mammifères [2].

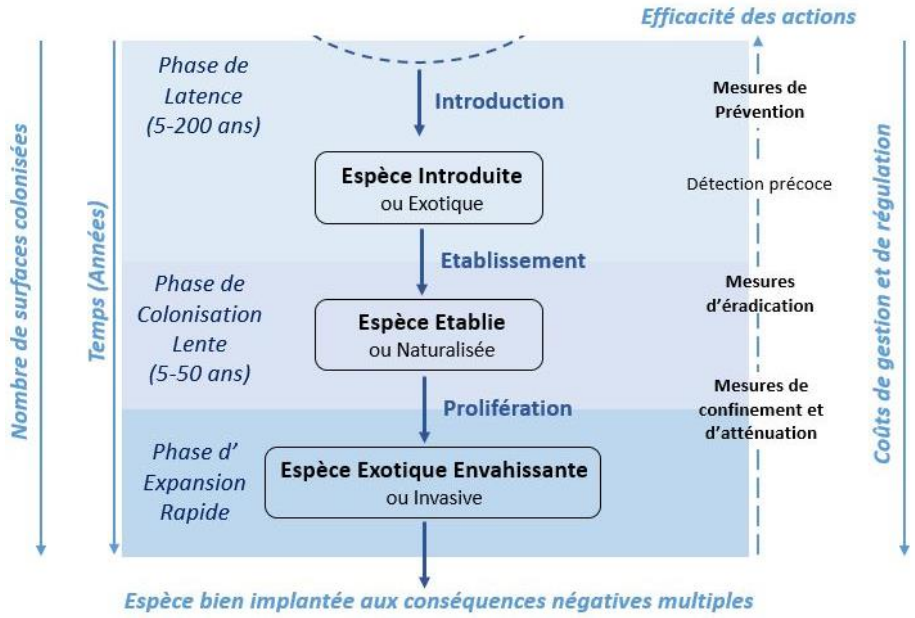


Figure 1. Les différents stades de l'invasion biologique. Image adaptée de l'article de David M. Richardson et collaborateurs sur les concepts et définitions relatives à la naturalisation et l'invasion des plantes exotiques [3].

Associées aux divers changements globaux, ces invasions biologiques sont de plus en plus préoccupantes [4], ayant souvent des conséquences négatives multiples et interdépendantes : écologiques, évolutives, socio-économiques, sécuritaires et/ou sanitaires. Leurs principales caractéristiques sont un pouvoir de dispersion important et une forte capacité de reproduction ou de multiplication. Elles se développent rapidement les rendant compétitives face aux autres espèces ; n'ont pas d'ennemis naturels ou peu et une adaptation ainsi qu'une résistance importante face aux perturbations comme par exemple certaines maladies, les dégradations physiques ou les intrants agricoles chimiques [5].

Face à ces phénomènes, diverses dispositions internationales et nationales ont été prises, dont voici quelques exemples :

- La *Convention de Berne* de 1979 [5], qui concerne la conservation de la vie sauvage et du milieu naturel de l'Europe, a permis de formuler des recommandations pour la prévention et la gestion des EEE à l'échelle européenne.

- Le *Règlement Européen n°1143/2014* [6] du Parlement Européen et du Conseil du 22 octobre 2014, entré en vigueur le 1er janvier 2015, vise la réduction des impacts néfastes des EEE, l'harmonisation de leur gestion à l'échelle de l'Europe et le développement de la prévention. Il s'articule autour de la création d'une liste régulièrement actualisée, comprenant depuis 2019 66 espèces [7] de faune et de flore exotiques envahissantes menaçant la biodiversité. Les EEE qui y figurent ne peuvent pas être introduites de manière intentionnelle sur le territoire de l'UE. Elles ne peuvent pas être conservées, élevées ou transportées vers, hors de ou au sein de l'UE, ni être vendues, cultivées ou libérées dans l'environnement. Cependant, des permis peuvent être délivrés par les États membres qui autorisent les travaux de recherche, leur conservation *ex situ* ou leur usage à des fins médicales. De plus, les EEE concernées doivent être manipulées et transportées précautionneusement de manière confinée [7].

- La *loi n°2016-1087* du 8 août 2016 [8] pour la reconquête de la biodiversité, de la nature et des paysages contient des dispositions ayant pour objectif de faire appliquer ce précédent règlement européen en France.

- Le 12 juillet 2016, le Ministère de l'Environnement, de l'Énergie et de la Mer a élaboré une *Stratégie nationale relative aux EEE* s'inscrivant dans le cadre de la *Stratégie nationale pour la biodiversité 2011-2020* [9] et s'articulant autour de 5 axes et 12 objectifs comprenant chacun des actions précises préconisées. Par exemple, l'*objectif 8* (« *Développer les méthodes et outils de gestion* ») cible la complexité de gestion des EEE, entre les espèces à forte densité qui réclament des moyens très importants et les petites populations dont la gestion peut s'avérer aussi coûteuse du fait de la difficulté de la localisation des individus. Il s'agit de mobiliser la recherche scientifique en partenariat avec les gestionnaires et les différentes parties prenantes afin de développer des outils et des méthodes permettant d'optimiser le rapport coût/efficacité des opérations de surveillance, de maîtrise et de restauration des espaces [9].

- Plus récemment, le Ministère de la Transition écologique et l'Office Français de la Biodiversité ont élaboré conjointement un *plan d'action 2022-2030* [10] posant les bases d'une action collective plus efficace pour prévenir le plus en amont possible l'invasion biologique. Il décline une action de la *Stratégie nationale relative aux EEE* décrite précédemment. Il s'attaque à l'introduction et à la propagation des espèces les plus préoccupantes au niveau européen ou national et renforce l'alerte et l'action précoce sur de nouvelles menaces [10].

- La commission du développement durable et de l'aménagement du territoire s'est réunie le 21 juillet 2021, afin d'examiner le rapport d'information relatif aux plantes exotiques envahissantes. Elle a ensuite autorisé la publication de ce *rapport d'information sur la prolifération des plantes invasives et les moyens pour endiguer cette situation*, en application de l'*article 145 du Règlement* par la mission d'information [11].

En réponse à l'urgence écologique mais également l'enjeu sociétal, préserver et restaurer la biodiversité est primordial. Lorsque la population introduite est encore très localisée et les effectifs faibles, il est possible d'envisager l'éradication des espèces exogènes dans une aire géographique donnée. Cependant, passé le premier stade d'invasion, il faudra mettre en place des méthodes curatives ou préventives de lutte [12], à adapter à la fois aux caractéristiques de l'espèce considérée mais également au milieu pour ne pas étendre davantage l'espèce. En Europe continentale, sont engagés 12,5 milliards d'euros par an pour les opérations de gestion et de réparation des dommages causés par les invasions biologiques [4].

En France métropolitaine, plus de 6 000 espèces végétales sont présentes dont environ 4 900 indigènes et 1 300 introduites intentionnellement ou fortuitement par l'Homme, fréquemment qualifiées d'accidentelles ou d'adventices. Certains les qualifient même de « transformateurs », lorsqu'elles modifient profondément le caractère, la forme ou la nature de l'habitat qu'elles envahissent [13]. Il s'avère par ailleurs que sur les 40 dernières années, 5 nouvelles EEE en moyenne s'installent tous les 10 ans dans un département français [14].

Le territoire Savoie Mont Blanc constitué des départements Savoie (73) et Haute-Savoie (74), situés en région Auvergne-Rhône-Alpes, se trouve également impacté par les invasions biologiques et notamment par les espèces végétales exotiques envahissantes (EVEE). Plus de 160 plantes dans cette région sont considérées à ce jour comme des exotiques envahissantes [15,16]. Leur gestion au sein des Savoies, comme la plupart des départements français confrontés à ce type de plantes, engendre non seulement des dépenses considérables pour les gestionnaires et acteurs locaux de la conservation de la biodiversité mais également d'importantes quantités de rémanents, suite aux actions de lutte et de régulation des populations. Une fois cette matière végétale extraite de l'environnement, elle représente une contrainte systématique pour les différents acteurs et gestionnaires territoriaux, responsables du traitement et du devenir de ces rémanents [17]. Ces derniers sont alors généralement épandus sur le sol, enfouis ou confiés à des unités de méthanisation ou de compostage [12]. Ces méthodes engendrent cependant, systématiquement une destruction de la ressource végétale sans qu'aucune voie de valorisation ne soit envisagée [17].

Proposer de nouvelles alternatives de traitement en valorisant ces plantes issues des opérations de gestion, considérées actuellement comme une sous-catégorie des « déchets verts » non dangereux par la réglementation française du *Code de l'Environnement* (*Figure 2*), peut permettre de concilier à la fois les enjeux de biodiversité mais également le développement économique au niveau local. De plus, cela permettrait de réduire les coûts de traitements de ces rémanents occasionnés, voir ceux de gestion, tout en prenant en compte les éventuels risques associés [17].

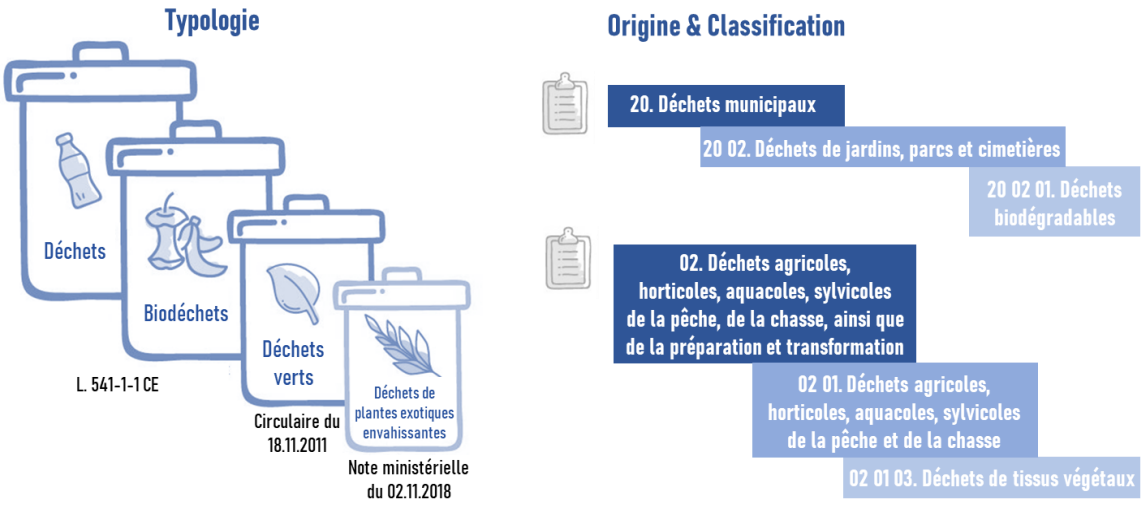


Figure 2. Catégorisation des déchets de plantes exotiques envahissantes, adaptée du guide pour accompagner le traitement des déchets de plantes exotiques envahissantes issus d'intervention de gestion [17].

L'*action « 8.4. »* présentée dans l'*objectif 8 de la Stratégie nationale relative aux EEE* [9] propose en effet d'optimiser l'élimination et la valorisation des déchets végétaux issus des opérations de régulation des populations. Cette proposition doit cependant vérifier que la valorisation économique d'EEE ne se fait pas au détriment de bénéfices écologiques grâce à la mise en place d'un cadre réglementaire spécifique et simple. En effet, des questions peuvent se poser sur l'accroissement des risques de dispersion (intentionnelle ou non) de l'espèce exploitée ou encore le maintien volontaire des populations de l'EEE considérée dans les sites colonisés lorsqu'elle devient un enjeu commercial (*Figure 3*) [18].

La possibilité de valoriser les EEE comme une ressource commercialement exploitable a d'ailleurs été évoquée dans l'*article 19 du Règlement Européen* [6] : « *L'utilisation commerciale d'espèces exotiques envahissantes déjà implantées peut être temporairement autorisée dans le cadre des mesures de gestion visant à leur éradication, au contrôle de leur population ou à leur confinement, pour autant que cela soit strictement justifié et que tous les contrôles appropriés soient mis en place pour éviter toute poursuite de leur propagation ».*

Un récent rapport du groupe de travail national « Invasions biologiques en milieux aquatiques » (GT IBMA) et le comité français de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) expliquent que les intérêts écologiques évoqués par ce type d'initiatives proposent souvent comme argument une démarche « *gagnant-gagnant* », mais dénoncent le fait que les avantages écologiques ne soient que rarement mesurés et prouvés [9]. De la même façon, des intérêts écologiques moins directs, comme la sensibilisation à la problématique des EEE et l'amélioration de la détection précoce, font partie des objectifs de nombreux programmes d'incitation au prélèvement mais ne concernent que très rarement les projets d'exploitation commerciale [18].

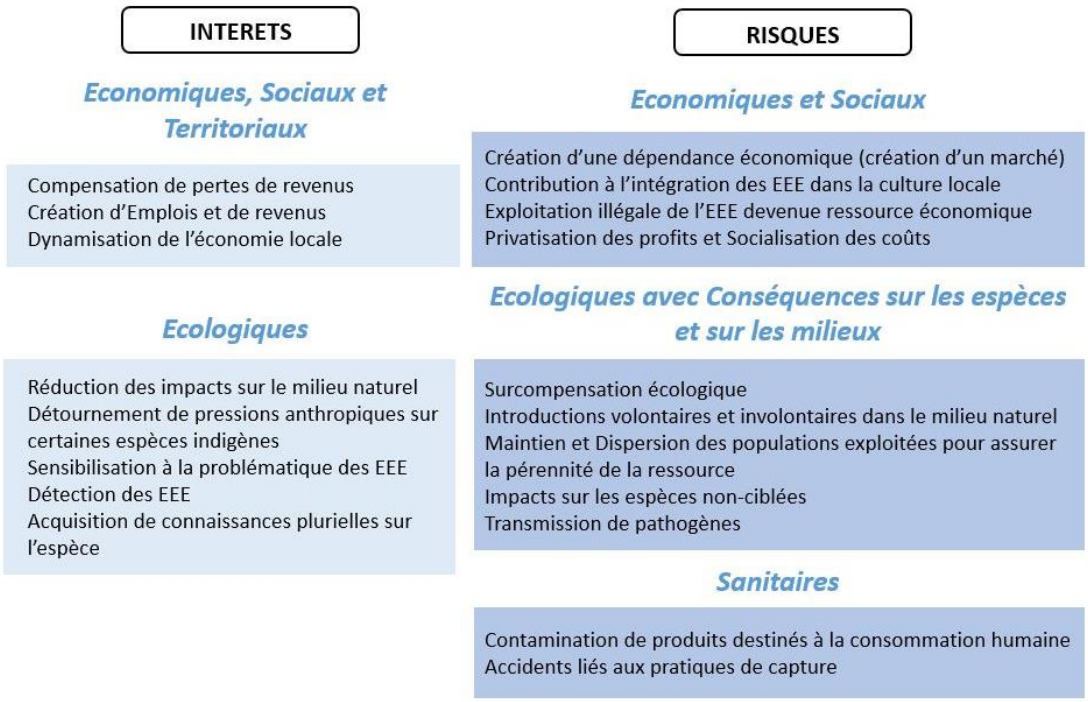


Figure 3. Intérêts et risques existants liés à la valorisation socio-économique des EEE, d'après l'ouvrage publié par le comité français de l'union internationale pour la conservation de la nature [18].

Les EVEE ont ainsi fait l'objet de nombreuses études ces dernières années [12,19–22], notamment sur l'origine de leurs invasions, leurs morphologies, les divers moyens utilisés ou envisagés pour leur contrôle, la compréhension du succès de ces invasions biologiques et de leurs effets néfastes multiples ou encore leurs valorisations potentielles dans des domaines aussi variés que la médecine, l'alimentation, la chimie, la cosmétique, les matériaux ou encore l'énergie. L'engouement de la communauté scientifiques et des industriels pour leurs utilisations entant que plantes médicinales et comestibles peut s'expliquer par la demande grandissante de la part des consommateurs souhaitant des produits plus naturels et authentiques [23–25].

C'est dans ce contexte de valorisation et dans une démarche d'économie circulaire de territoire, que ces travaux de thèse se positionnent. Plus précisément, ils s'inscrivent dans le cadre du projet de recherche InvaVAL, crée et démarré en 2019 (*Figure 4*). Ce dernier est ainsi né des constatations et problématiques autour des plantes exotiques envahissantes des Savoies. En effet, l'absence d'alternatives de traitement de ce type de plantes suite aux pratiques de gestion actuelles [17], a conduit à une réflexion sur les différentes voies de valorisation possibles de la matière végétale résiduelle.

Figure 4. Logo du projet InvaVAL, crée et démarré en 2019, au sein de l'Université Savoie Mont Blanc.

Le projet InvaVAL est porté par le laboratoire Environnements DYnamiques et TErritoires de Montagnes (EDYTEM, UMR 5204, CNRS/Université Savoie Mont Blanc) d'abord débuté au sein du Laboratoire de Chimie Moléculaire et Environnement (LCME, fusion des laboratoires pendant la thèse). Le laboratoire possède des expertises en terme (i) d'éco-procédés utilisant des méthodologies orientées par les douze principes de la chimie verte plus respectueuses de la santé et de l'environnement ; et (ii) de valorisation de tout type de ressources comme les déchets viticoles, les déchets agroalimentaires ou encore les déchets d'EVEE. Durant la thèse, une collaboration a pu être initiée avec l'Institut de Chimie Organique et Analytique d'Orléans (ICOA, UMR 7311, CNRS/Université d'Orléans), dont les expertises complémentaires portent sur la caractérisation moléculaire du végétal, les mesures analytiques des activités biologiques ou encore l'évaluation des interactions et choix raisonné des systèmes séparatifs.

Les travaux de thèse, dont l'objectif principal est de valoriser chimiquement des EVEE préoccupantes sur le territoire Savoie Mont Blanc, sont notamment adossés aux activités de gestion et de régulation des divers acteurs locaux de la conservation de la biodiversité des Savoies (*Figure 5*). Le choix des espèces végétales à étudier et leurs collectes, ont été réalisés en concertation étroite avec l'ensemble de ces gestionnaires privés ou publics. Trois espèces au comportement envahissant avéré [16] (*Fallopia japonica* ou *F. japonica*, *Ambrosia artemisiifolia* ou *A. artemisiifolia* et *Solidago canadensis* ou *S. canadensis*) ont été sélectionnées car : (i) connues des acteurs pour leurs impacts négatifs multiples et suivies depuis plusieurs années sur le territoire [26–29]; (ii) largement répandues au niveau local mais aussi national [9]; (iii) relativement bien documentées dans la littérature [30–33]. Lors des interventions programmées des acteurs sur le terrain, une partie des matières végétales retirées a été collectée pour les expérimentations menées (2020-2021 et 2021-2022). Différentes parcelles expérimentales ont également été mises à disposition pour l'étude. Les localisations géographiques impactées étaient très diversifiées. Dans un souci d'homogénéité et afin de répondre au mieux aux objectifs de la thèse, des plannings de prélèvements ont été prédéfinis en accord avec les gestionnaires sur le territoire. De plus, leurs retours d'expérience sur le terrain ont été d'une grande aide tout au long de la thèse.

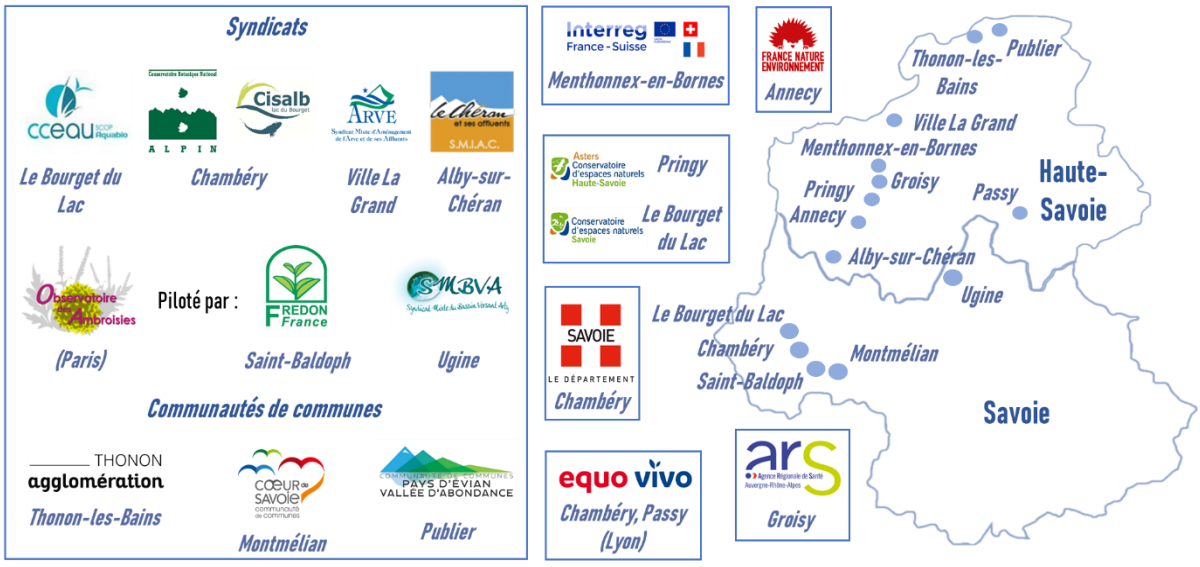


Figure 5. Principaux gestionnaires et acteurs du territoire Savoie Mont Blanc ayant participer au projet InvaVAL.

L'entreprise EquoVivo VINCI Construction (*Figure 5*), dont l'expertise sur le terrassement et la restauration écologique est reconnue, a participé au projet InvaVAL *via* le co-financement de la bourse de thèse, la mise à disposition de « temps humain » pour la logistique et le suivi du projet. EquoVivo apporte une réelle plus-value de par ses connaissances des problématiques de terrain, de la nature des espèces envahissantes, de leurs modes de collecte possibles, mais également *via* la possibilité de mises en place d'expérimentations à plus grande échelle. Les travaux menés doivent permettent d'accompagner EquoVivo et les entreprises de terrassement associées sur de nouvelles pratiques de gestion des EVEE lors de chantiers. La bourse de thèse a par ailleurs été cofinancée par le Conseil Savoie Mont Blanc (CSMB) qui soutient fortement la problématique de recherche proposée.

Les objectifs de cette thèse étaient les suivants i) de cribler et évaluer les activités biologiques à visées dermo-cosmétique et/ou nutraceutique des trois EVEE sélectionnées et collectées afin de mettre en évidence les organes ou parties des espèces les plus prometteurs selon l'activité biologique considérée ; ii) d'identifier les principales molécules pouvant être responsables des activités biologiques observées et d'enrichir à l'échelle laboratoire les extraits en molécules actives ; et enfin iii) de renforcer les connaissances quant aux paramètres pouvant influer sur la composition chimique globale pour les types de valorisations envisagés. La stratégie de valorisation chimique qui a été mise en œuvre pour les expérimentations est résumée *Figure 6*.

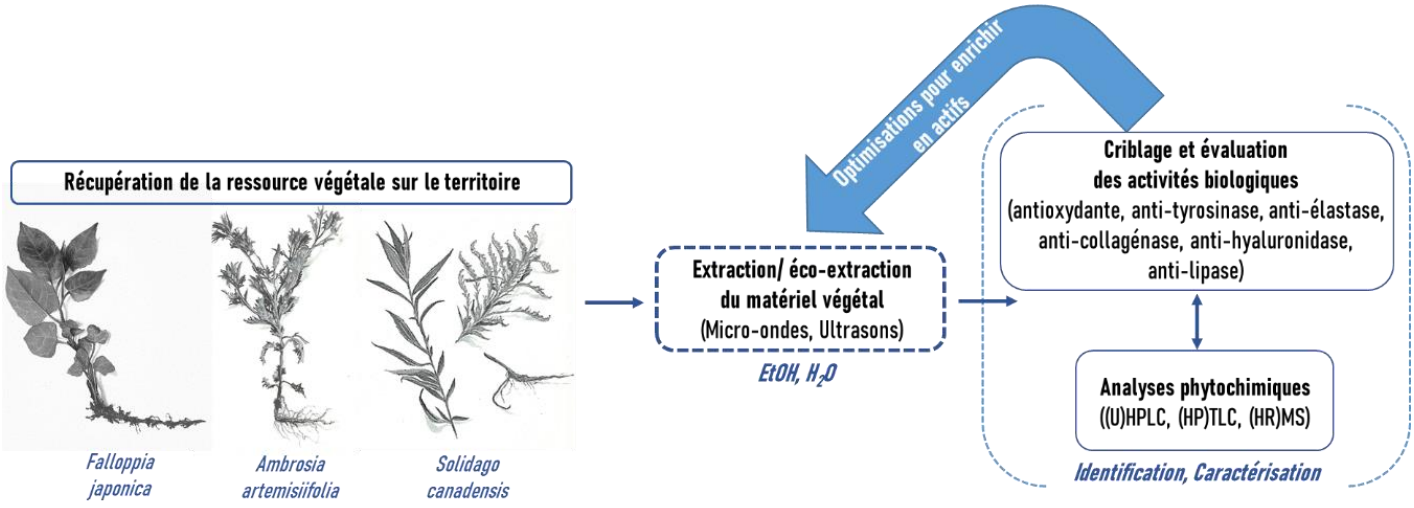


Figure 6. Représentation schématique de la stratégie de valorisation chimique des trois espèces végétales exotiques envahissantes (ou EVEE) des Savoies, mise en place dans le cadre du projet InvaVAL.

Le présent travail de thèse s'articule ainsi autour de trois grandes parties : l'*étude bibliographique*, la *présentation des travaux effectués* ainsi que la *partie expériementale*.

- L'*étude bibliographique* se compose de quatre parties (I. à IV.). Partie I., des généralités sur la gestion et la valorisation des espèces végétales exotiques envahissantes sont tout d'abord présentées. Partie II., les applications dans les secteurs dermo-cosmétique et nutraceutique étant visées, les thèmes du vieillissement cutané et de l'obésité sont tout d'abord abordés. Les activités biologiques associées sont ensuite exposées ainsi que les outils d'aide à la recherche des actifs. Partie III., une présentation botanique et phytochimique des trois EVEE étudiées est par la suite réalisée Enfin partie IV., sont décrites les techniques d'extraction employées et/ou optimisées durant la thèse et les outils permettant l'analyse et la caractérisation des extraits végétaux.

- La *présentation des travaux effectués* est composée de cinq parties (I. à V.). La partie I. est consacrée au criblage et à l'évaluation des potentiels dermo-cosmétiques des extraits des trois EVEE choisies. L'analyse phytochimique de ces derniers permettra de souligner les différences et spécificités de chacun des organes. La partie II. présente d'une part la valorisation chimique dermo-cosmétique de *Fallopia japonica* plus particulièrement. Selon le même modèle, *Ambrosia artemisiifolia* et *Solidago canadensis* sont également étudiées. Les principales molécules actives présentes dans les trois espèces sont d'autre part caractérisées. La partie III. est réservée à la valorisation chimique nutraceutique des deux espèces *A. artemisiifolia* et *S. canadensis* et à leur étude phytochimique. L'efficacité des extraits est mise en relation avec leur composition moléculaire. La partie IV. correspond à l'étude de l'influence des paramètres de l'extraction (macération assistée par micro-ondes) sur les teneurs et abondances relatives des actifs principaux identifiés chez *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*. Les deux plans d'expériences mise en place sont présentés. Les activités anti-enzymes des extraits de plantes découlant de ces plans sont enfin discutées. Enfin, la partie V. se consacre à l'étude de la variabilité phytochimique (notamment polyphénolique) des trois EVEE.

- La *partie expérimentale* expose l'ensemble des instruments et protocoles utilisés dans le cadre de ces travaux.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. GESTION ET VALORISATION D'ESPECES VEGETALES EXOTIQUES ENVAHISSANTES

A POURQUOI FAUT-IL PRESERVER LA BIODIVERSITE ?

La biodiversité comprend la diversité des espèces dont les Hommes, la diversité des individus au sein de chaque espèce impliquant la diversité des gènes mais également la diversité des milieux de vie ou écosystèmes. Dans le récent rapport de la plateforme intergouvernementale scientifique et politique sur la biodiversité et les services écosystémiques (IPBES) [13,34], le groupe d'experts sur la biodiversité alerte sur le fait que *la nature décline globalement à un rythme sans précédent dans l'histoire humaine – et le taux d'extinction des espèces s'accélère, provoquant dès à présent des effets graves sur les populations humaines du monde entier*. Il est estimé que plus d'un million d'espèces animales et végétales sont menacées d'extinction et que d'ici un siècle, avec le rythme de disparition actuel, la moitié des espèces connues pourrait disparaître. La disparition d'une espèce est irréversible et engendre de nombreuses conséquences importantes et imprévisibles sur l'ensemble de l'écosystème [13]. Les facteurs de pression directs (tel que les EEE) et indirects ne cessent de s'accélérer depuis 50 ans (*Figure 7*).

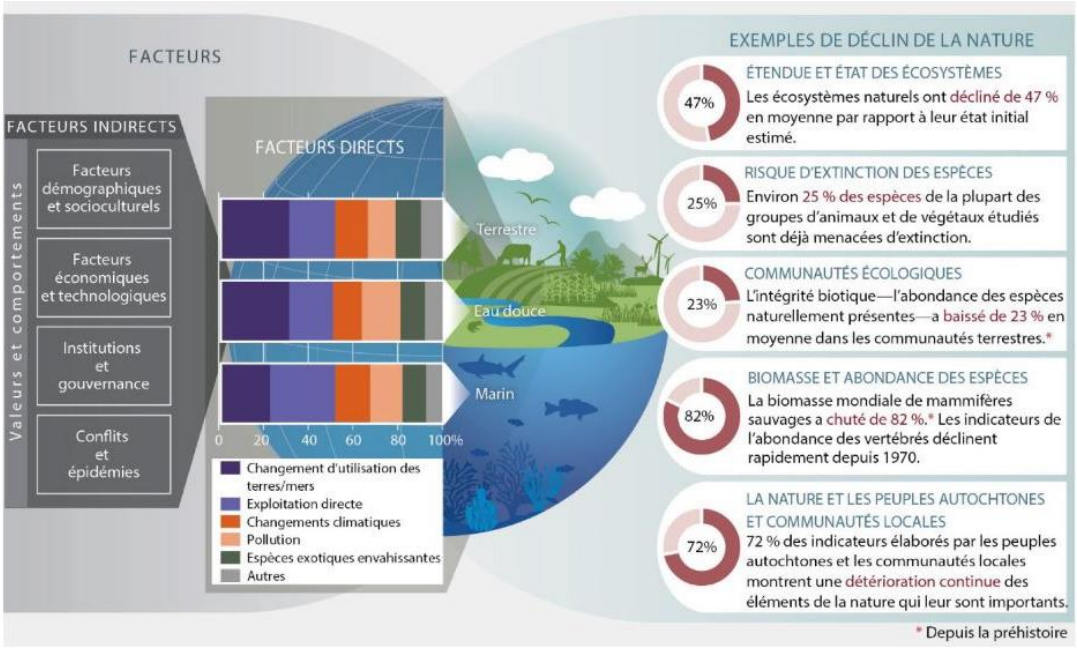


Figure 7. Exemples de déclins de la nature à l'échelle mondiale résultant de facteurs de changement directs et indirects. Image extraite du rapport de l'évaluation mondiale de la biodiversité et des services écosystémiques [13].

La dégradation de l'environnement causée par la pollution, la perte d'habitats et les perturbations d'origine humaine crée des conditions favorables à l'établissement et à la propagation des EEE [13,34]. Le climat est aussi une composante écologiquement importante de l'environnement. Tout changement climatique peut en effet contribuer à modifier la distribution des espèces et à faciliter l'établissement d'espèces exotiques en dehors

de leur distribution naturelle [14]. Le plus souvent, les impacts négatifs causées par les invasions biologiques ne deviennent apparents ou problématiques que lorsque les envahisseurs sont bien établis et ont de vastes aires de répartition.

Les raisons de préserver la biodiversité sont multiples et essentielles [12]. La biodiversité garantit le bon fonctionnement des écosystèmes. Chaque espèce est unique et irremplaçable. Elle a un rôle important dans les services écosystémiques rendus tels que la production d'oxygène, la pollinisation ou l'épuration des eaux. Elle maintient un certain équilibre global. De nombreux bénéfices sont fournis par la biodiversité à la société, qu'il serait difficile de remplacer. Elle a un caractère social, revêtant des valeurs récréatives, spirituelles mais également culturelles [12]. D'autre part, la biodiversité est également source d'inspiration : le biomimétisme représente une réelle opportunité d'innovation et de solutions. L'observation des propriétés particulières d'espèces végétales et animales permet de véritables progrès dans les domaines du médical, des cosmétiques ou des matériaux par exemple [12,35].

B. PARTICULARITES DU TERRITOIRE SAVOIE MONT BLANC

La Savoie est l'un des départements les plus montagneux de France. Sa biodiversité dite ordinaire est d'une incroyable diversité de milieux naturels liées à une géographie alpine. La Haute-Savoie, avec son point culminant à 4800 mètres (massif du Mont-Blanc), présente une immense variété de milieux naturels et d'espèces végétales et animales remarquables. Les espaces protégés y représentent presque ¼ du territoire [36]. Néanmoins, la proportion d'espèces menacées, c'est-à-dire risquant de disparaître à court ou moyen terme, est extrêmement importante [37].

Le territoire Savoie Mont Blanc se trouve impacté par les EEE et notamment par les EVEE. Régulièrement formulé de la part de ces divers acteurs, une liste actualisée et hiérarchisée des EVEE avérées, potentielles et émergentes, présentes dans les cinq départements rhônalpins du territoire d'agrément du conservatoire botanique national alpin (CBNA : l'Ain, la Savoie, la Haute-Savoie, l'Isère et la Drôme), a été réalisée en mars 2020 [38]. L'évaluation était basée sur des outils d'analyse du caractère envahissant et du potentiel de risque invasif des espèces c'est-à-dire au moyen de la cotation de Lavergne, l'échelle de Weber ainsi que la cotation EPPO (*European Public Prosecutor's Office*) [38]. 443 espèces exogènes végétales ont été ainsi recensées regroupant 282 espèces exogènes non envahissantes, 94 espèces envahissantes émergentes, 27 espèces envahissantes potentielles et 40 espèces envahissantes avérées. Il y a donc 161 EVEE sur 443 espèces exogènes totale connues [38,39].

C. MOYENS DE LUTTE ACTUELS

Actuellement, plusieurs méthodes curatives ou préventives de lutte contre les EVEE [40,41] sont mises en pratique sur le territoire :

- La *lutte physique* regroupe les méthodes d'arrachage manuel ou mécanique, la fauche ou encore le concassage bâchage. L'efficacité de la technique d'éradication mécanique des renouées du japon ou *Fallopia spp.* par concassage du sol avait été démontrée par exemple en 2005 sur des sites expérimentaux en région Auvergne-Rhône-Alpes [41].

- La *lutte chimique* comprenant le désherbage chimique est non sélective et souvent toxique pour l'environnement et la santé humaine. Elle n'est pas considérée comme une solution durable d'autant plus que l'utilisation intensive de produits herbicides favorise les espèces tolérantes et le développement de population résistantes [40]. C'est par exemple le cas de l'ambroisie à feuilles d'armoise ou *A. artemisiifolia* résistante aux inhibiteurs de l'acétolactate synthase (ALS), une famille d'herbicides, entrainant des échecs de traitements dans les parcelles agricoles [42].

- La *lutte biologique* consiste à introduire un ennemi naturel ou insectes phytophages, pathogènes (champignons) de la plante exotique envahissante. Par exemple, des études récentes ont montré que le lépidoptère *Epiblema strenuana* et le coléoptère *Ophraella communa* pouvaient servir d'agents de contrôle pour l'EVEE *A. artemisiifolia* [32,43].

- L'*éco-pâturage* d'animaux divers peut représenter une manière écologique de gestion. Néanmoins, il nécessite d'avoir une certaine surface de terrain et a un coût car il faut réaliser une clôture et avoir un accès à l'eau. Les odeurs des animaux et leurs déjections peuvent être problématiques en zones urbaines [44].

- La *lutte intégrée* consiste à mettre en œuvre une combinaison des méthodes les plus efficaces [40].

- Enfin, *les modèles prédictifs* permettre d'estimer les divers impacts d'une invasion et d'évaluer les effets des techniques employées [45]. Cependant, leur pouvoir prédictif reste limité car les mécanismes liés aux processus d'invasion sont complexes et pour la plupart mal connus. L'estimation des effets secondaires des méthodes de lutte envisagées nécessite une bonne compréhension des interactions entre espèces, à l'échelle de l'écosystème entier (impacts sur les autres espèces de l'écosystème), mais aussi entre les écosystèmes [45].

Les divers acteurs locaux de la conservation de la biodiversité des Savoies choisissent et mettent en place précautionneusement ces méthodes en fonction à la fois des caractéristiques de l'espèce végétale considérée mais également celles du milieu impacté afin de ne pas l'étendre davantage [26–29]. Même si les connaissances sur le sujet des EVEE sont de plus en plus nombreuses, les gestionnaires sont souvent face à des difficultés à la fois techniques, environnementales et financières, ne permettant pas toujours d'obtenir des résultats d'intervention satisfaisants [17,26–29].

D. RECHERCHE DE NOUVELLES PISTES DE VALORISATION

Les différents moyens de lutte employés pour réduire les populations des EVEE, engendre une importante quantité de matière végétale qui n'a le plus souvent pas d'exutoire [17]. La valorisation de cette ressource matérielle peut alors constituer une solution alternative aux modes de gestion actuels, permettant de concilier à la fois les enjeux de conservation de la biodiversité mais également le développement économique au niveau local voir national. Il existe de nos jours plusieurs alternatives de traitement à savoir les valorisations alimentaire [18] ou chimique ainsi que la création de matière première ou combustibles (*Figure 8*) [17,46].

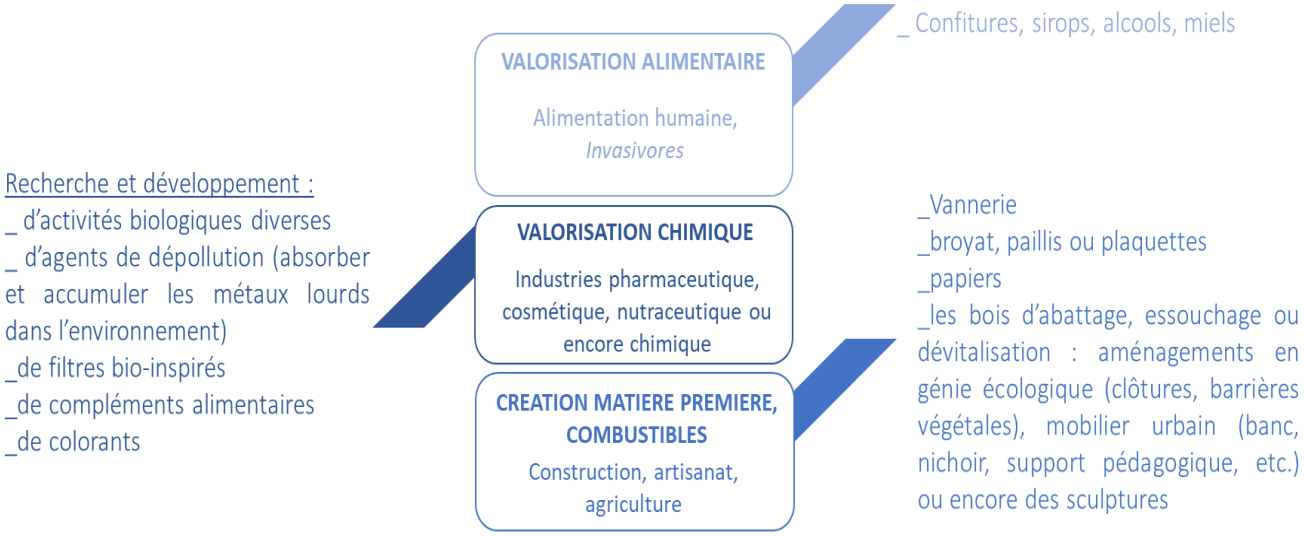


Figure 8. Méthodes alternatives de traitement des espèces végétales exotiques envahissantes et exemples d'applications existantes. Image adaptée du guide pour accompagner le traitement des déchets de plantes exotiques envahissantes issus d'intervention de gestion [17].

Dans le cadre de ces travaux, c'est la voie de la valorisation chimique qui a été explorée afin de traiter les trois EVEE *F. japonica*, *A. artemisiifolia* et *S. canadensis* à l'issue des opérations de gestion réalisées sur le territoire Savoie Mont Blanc. Souvent perçues comme des nuisibles, ces plantes aux métabolites constitutifs divers pourraient représenter une réelle opportunité pour l'Homme dans de nombreux secteurs [22,35].

II. RECHERCHE DE NOUVEAUX ACTIFS : APPLICATIONS EN DERMO-COSMETIQUE ET NUTRACEUTIQUE

A LE VIEILLISSEMENT CUTANE

La lutte contre le vieillissement cutané est un défi majeur du XXIe siècle. Les premiers signes visibles incluent les rides, les cheveux blancs et les taches brunes. Comprendre les mécanismes sous-jacents est essentiel pour développer des produits efficaces contre ces signes. La diminution des tissus cutanés, notamment au niveau dermique et hypodermique, contribue à leur apparition, tout comme les problèmes de cicatrisation et les pathologies cutanées associées au vieillissement [47–49].

1. STRUCTURE & FONCTIONNEMENT DE LA PEAU

La peau, pesant approximativement 4 kilogrammes et couvrant près de 2 m² chez l'adulte, est l'organe le plus lourd et le plus étendu du corps humain [50]. Elle joue un rôle vital dans le système immunitaire entant que barrière contre les agressions externes telles que les rayons ultraviolets (UV), la chaleur et les pathogènes. Elle contribue également à la thermorégulation du corps et exerce des fonctions sensorielles et métaboliques, notamment la synthèse de la vitamine D [47]. Structuralement, la peau se compose de trois couches principales : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. (*Figure 9*) [47,51,52].

L'épiderme, entant que couche la plus externe de la peau, assume plusieurs rôles cruciaux pour la santé et la fonctionnalité du corps humain. D'une épaisseur variant de 0,07 à 2 mm, il assure la souplesse, la perméabilité et la résistance de la peau [51]. Composé de cinq couches cellulaires superposées, il comprend la couche basale (ou *Stratum germinativum*), la couche épineuse (ou *Stratum spinosum*), la couche granuleuse (ou *Stratum granulosum*), la couche claire (ou *Stratum lucidum*) et la couche cornée (ou *Stratum corneum*) [51,48]. Malgré l'absence de vaisseaux sanguins, l'épiderme est richement innervé, ce qui confère à la peau sa sensibilité à la douleur. Les différentes cellules présentes dans l'épiderme jouent des rôles spécifiques : les kératinocytes, par exemple, synthétisent la kératine et des peptides antimicrobiens pour renforcer la barrière cutanée et combattre les agents pathogènes [47,51]. Les mélanocytes produisent la mélanine, qui agit comme un pigment protecteur contre les rayons UV, tandis que les cellules de Langerhans participent à la défense immunitaire en capturant et en éliminant les substances étrangères [49,53]. Les cellules de Merkel, enfin, sont des mécanorécepteurs sensibles à la

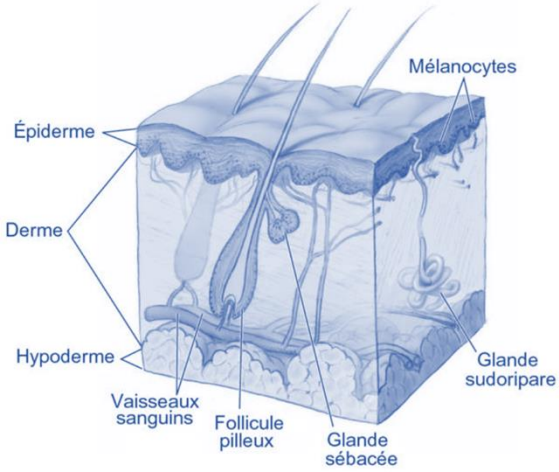


Figure 9. Coupe transversale histologique de la peau du corps humain, extraite de [52].

pression, jouant un rôle essentiel dans la sensation tactile. La couche cornée, constituée de cornéocytes soudés par des lipides, forme une barrière presque imperméable, empêchant la pénétration d'agents chimiques nocifs dans l'organisme. Elle est également recouverte d'un film hydrolipidique contenant de la sueur et de l'eau, renforçant ainsi son rôle protecteur [47,49].

Le derme, environ quatre fois plus épais que l'épiderme, est composé de fibres d'élastine et de collagène, ce qui lui confère une résistance, une souplesse et une élasticité particulières. Cette couche cutanée abrite les poils, les glandes sudoripares et sébacées, ainsi que les vaisseaux sanguins fournissant des nutriments aux cellules de l'épiderme et aux cellules immunitaires. Structuralement, il se compose de trois couches de tissus : le derme papillaire, dense en collagène, en fibres élastiques et en terminaisons nerveuses ; le derme réticulaire, formé d'un entrecroisement de fibres de collagène et de fibres élastiques ; et le derme profond, contenant un réseau fibreux et des adipocytes [51,53]. La matrice extracellulaire du derme, complexe et dynamique, est constituée de minéraux, de polymères saccharidiques et de glycosaminoglycanes, formant un réservoir d'hydratation [54]. Les protéines essentielles telles que le collagène et l'élastine confèrent à la peau des propriétés mécaniques, la rendant ferme, résistante à la compression, à la traction et au relâchement. Vascularisé et innervé, le derme assure l'oxygénation et l'apport en nutriments de la peau, et abrite les glandes sudoripares et sébacées, ainsi que les follicules pileux et les ongles. Ses nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques transportent également des cellules immunitaires telles que les lymphocytes et les macrophages, qui détectent, signalent et éliminent les substances étrangères [51,54].

L'hypoderme, ou fascia sous-cutané, est la couche la plus profonde de la peau, fortement vascularisée et innervée, avec une épaisseur variant de quelques millimètres à 1 cm [51,55]. Cette couche de tissu de soutien est à la fois souple et déformable, et sa fonction principale est de protéger les organes internes profonds tels que les muscles et les os. Elle agit également comme réserve énergétique et régulateur thermique grâce à la graisse contenue dans les adipocytes, qui peut être mobilisée sous forme de glucose en cas d'effort intense ou prolongé [51]. Composée de lobules graisseux et de trames fibreuses, elle stocke l'énergie nécessaire au bon fonctionnement des muscles, ainsi que des fibroblastes et des macrophages tissulaires. L'hypoderme contribue également à amortir les chocs subis par le corps et est présent sur tout le corps, à l'exception des paupières, des oreilles et des organes génitaux externes masculins [49,51].

2. DESCRIPTION & CARACTERISTIQUES DU VIEILLISSEMENT CUTANE

Le vieillissement cutané, un processus complexe, résulte de multiples interactions biologiques, biochimiques et physiques altérant les fonctions cutanées à travers toutes les couches de la peau et des tissus de support [47]. Il est régulé par deux processus principaux [56]. D'une part, le vieillissement intrinsèque, génétiquement déterminé, entraîne la sénescence des cellules cutanées, réduisant l'élasticité, la souplesse et le renouvellement cellulaire. D'autre part, des facteurs extrinsèques tels que l'exposition aux UV, la pollution, le

tabagisme, l'alcool, le stress, un régime déséquilibré, le diabète, la déshydratation et la sédentarité accélèrent ce processus [47,48]. De plus, l'exposition aux rayons UV induit la formation de *Reactive Oxygen Species* (ROS), favorisant l'angiogenèse et la mélanogénèse (*Figure 10*) [57].

D'une manière générale, l'épiderme s'affine, le renouvellement cellulaire diminue et la prolifération kératinocytaire ralentie. Le derme, le tissu adipeux sous-cutané ainsi que les masses musculaires s'atrophient. Un amincissement global de la peau et un affaiblissement de son support adipo-musculaire, conduisant au relâchement cutané, sont ainsi induits [47,56]. Des modifications dégénératives marquées se produisent alors dans le tissu conjonctif du derme supérieur avec une dégradation de l'acide hyaluronique (AH), une hyperpigmentation ou encore des altérations des fibres élastiques et de collagène. Dans les kératinocytes, les fibroblastes et autres cellules inflammatoires, une augmentation de l'expression de la hyaluronidase, de la tyrosinase, de l'élastase et de la métalloprotéinase matricielle ou de la collagénase est observée. Différents mécanismes enzymatiques interviennent alors selon l'enzyme considérée [58].

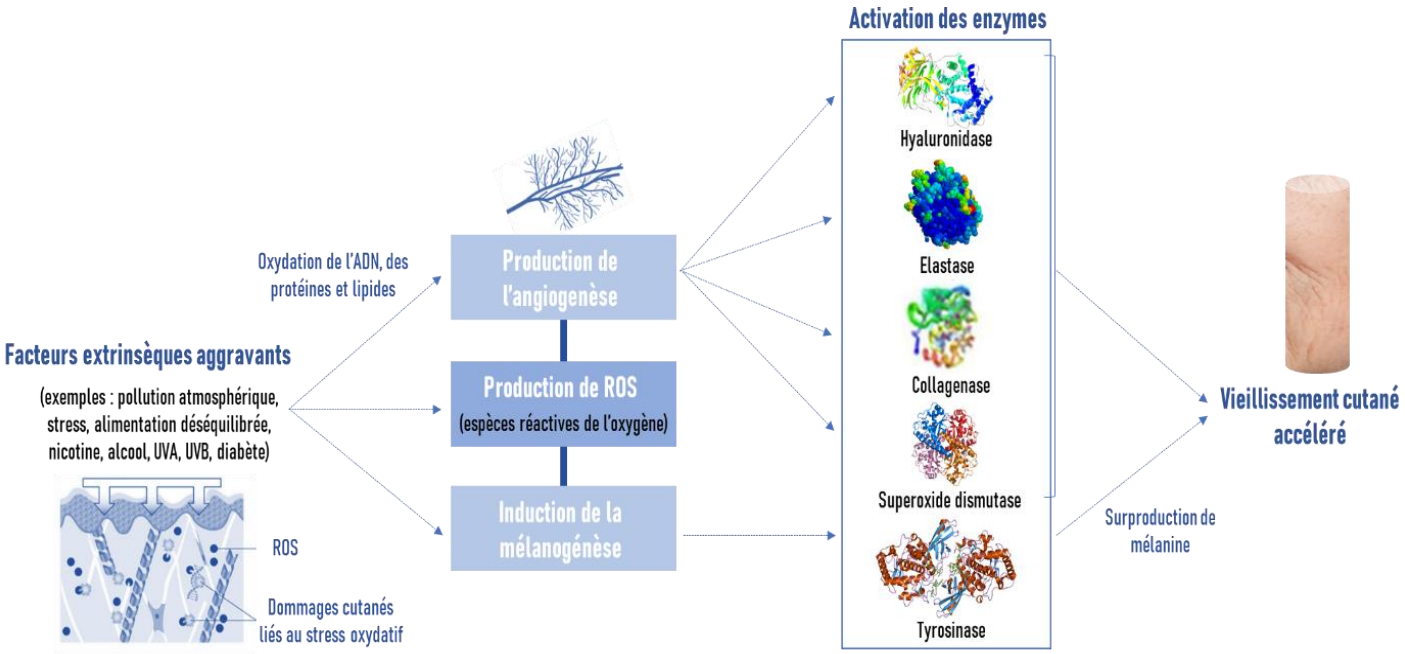


Figure 10. Représentation schématique du vieillissement cutané, adaptée de [58].

3. FAVORISER LA REPARATION CUTANEE

La réparation cutanée, mécanisme physiologique naturel, se déroule en trois phases : inflammatoire, de prolifération et de remodelage, suite à une altération de la structure cutanée. La nutrition et l'hydratation sont essentielles pour favoriser ce processus en fournissant les nutriments nécessaires [47,48]. Pour lutter contre les signes du vieillissement, plusieurs stratégies « anti-âge » sont disponibles, incluant des traitements topiques, systémiques et invasifs [47]. Les traitements topiques, tels que les crèmes, contiennent des agents tels que les

antioxydants (vitamines C, B3, E) et les régulateurs cellulaires (vitamine A), stimulant la synthèse de collagène et réduisant les dommages cutanés. Les traitements systémiques, administrés par voie orale, incluent des antioxydants et des hormones, agissant sur la synthèse du collagène et de l'AH. Les traitements invasifs, tels que la chirurgie plastique et le laser, sont également utilisés pour restaurer la structure cutanée [47].

B. L'OBESITE

1. ROLE, DIGESTION & METABOLISME DES LIPIDES DANS LE CORPS HUMAIN

Les lipides, essentiels pour la santé, sont des composants majeurs des membranes cellulaires, assurant la plasticité de la peau et du système nerveux. Ils fournissent des acides gras essentiels comme les Oméga-3 et 6, non synthétisés naturellement dans le corps. Les apports lipidiques recommandés pour un adulte sont de 80 à 120 g par jour, principalement sous forme de triglycérides provenant des huiles alimentaires [59]. Les lipides sont une importante source d'énergie, fournissant environ 9 kcal par gramme. Ils participent à la synthèse d'hormones stéroïdiennes et de prostaglandines, ainsi qu'au transport des vitamines liposolubles (A, D, E, K). La *Figure 11* présente par ailleurs le processus de digestion et la voie métabolique des lipides dans l'organisme humain, et plus particulièrement des triglycérides [59].

Les graisses exogènes doivent être hydrolysées pour être absorbées par le corps humain. Les lipases présentes dans le système digestif, telles que la lipase pancréatique, convertissent les triglycérides en acides gras libres et monoglycérides, facilitant ainsi leur absorption dans l'intestin [59]. Les lipides émulsifiés forment des micelles dans l'intestin grêle, qui sont ensuite absorbées par les cellules et libérées dans le plasma sous forme de chylomicrons [59,60]. Les taux de lipoprotéines comme le HDL (*High Density Lipoproteins* ou « bon cholestérol ») et le LDL (*Low Density Lipoproteins* ou « mauvais cholestérol ») sont mesurés pour évaluer le profil lipidique [60].

Une carence en lipides peut causer des troubles de croissance et augmenter le risque de maladies chroniques, voire entraîner une malnutrition si les autres nutriments sont également insuffisants. D'autre part, un excès de lipides dans l'alimentation peut conduire à l'obésité ou au surpoids, en particulier en l'absence d'activité physique et en présence de prédispositions génétiques ou de facteurs environnementaux [61,62]. L'obésité, maladie multifactorielle, engendre divers problèmes physiologiques, psychologiques, comportementaux et sociaux [61,63].

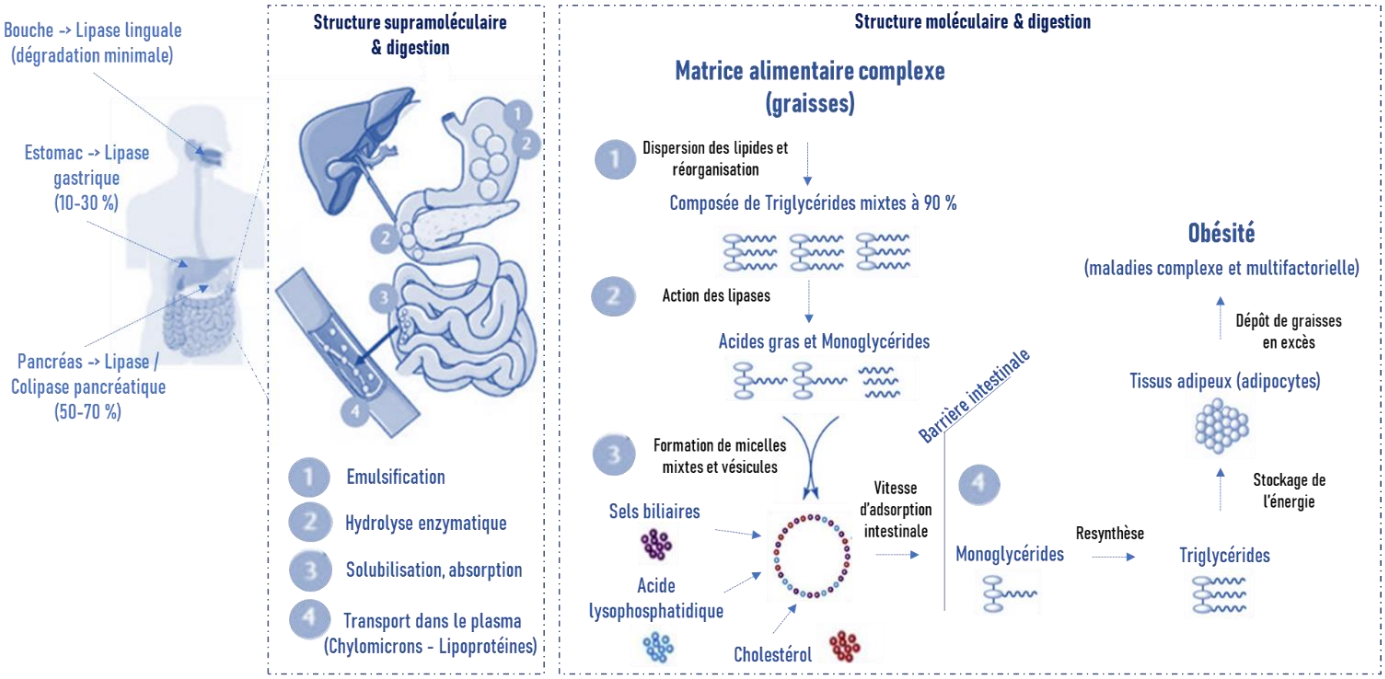


Figure 11. Voies métaboliques des lipides dans le corps humain et importance des structures dans la digestion et l'absorption des lipides, adaptée de [59,60].

2. RISQUES LIEES A L'OBESITE

L'obésité est un grave problème de santé publique à l'échelle mondiale, classé comme le cinquième facteur de mortalité et un important risque pour le développement d'autres maladies. Elle est associée à divers problèmes de santé, notamment la dépendance, la dépression, les maladies cardiovasculaires, hépatiques et coronariennes, l'intolérance au glucose, l'hypertension, l'hyperlipidémie, l'infertilité, certains cancers, les fractures, l'arthrose, le diabète de type 2 et une réduction de l'espérance de vie [64]. L'obésité est également liée à de nombreuses maladies chroniques, et le type d'acides gras consommés en excès peut jouer un rôle crucial. Des études ont souligné le lien entre l'obésité et des altérations du microbiote intestinal, qui influent sur le métabolisme énergétique et sont associées à des symptômes comme l'apnée du sommeil, l'essoufflement et l'asthme [62,64].

Les implications psychologiques et sociales de l'obésité sont mieux reconnues, incluant l'anxiété, les troubles cognitifs, et l'hyperphagie boulimique. Sa prise en charge nécessite une approche globale [64], avec la prévention comme priorité en santé publique. En France, la Stratégie nationale de santé 2018-2022 du gouvernement recommande une activité physique régulière, une alimentation équilibrée et diversifiée, la consommation quotidienne de fruits et légumes, la limitation des graisses saturées, des sucres et du sel, ainsi que la réduction du temps passé devant les écrans [65].

3. TRAITEMENTS ACTUELS DE L'OBESITE

Il existe différents traitements de l'obésité pouvant être complémentaires : la chirurgie gastrique associée à l'activité physique [66] ou esthétique, les médicaments, l'hypnose [67], les nutraceutiques comme sous forme de compléments alimentaires ou pré-/pro-biotiques [68], ou l'usage de la phytothérapie. Dans les cas d'obésité grave, la chirurgie bariatrique vise à réduire la taille de l'estomac pour limiter l'apport alimentaire ou à diminuer l'absorption des nutriments. Cependant, dans 20 à 30% des cas, une reprise de poids compromet son efficacité à long terme [66]. La liposuccion, une option à court terme, peut enlever sélectivement les graisses, mais comporte des risques et peut ne pas affecter uniformément la graisse sous-cutanée.

Les médicaments amaigrissants incluent les inhibiteurs de la lipase périphérique et les coupe-faim centraux. Cependant, la sécurité des coupe-faim centraux reste incertaine [63]. Par exemple, l'*Orlistat* inhibe les lipases gastro-intestinales, mais peut causer des effets secondaires tels que des selles grasses et des risques hépatiques. Le liraglutide, initialement utilisé dans le diabète de type 2, est également employé dans l'obésité, bien que son mécanisme d'action soit encore peu clair et qu'il puisse entraîner des complications telles que la pancréatite [69]. Enfin, la fenfluramine et la sibutramine, agissant sur le système nerveux central comme coupe-faim, peuvent provoquer des effets indésirables tels que des maux de tête et des troubles gastro-intestinaux [63,69].

Différents types de compléments alimentaires à bases de plantes notamment, destinés à favoriser la perte de poids peuvent aussi être utilisés. Il y a le *brûle-graisse* visant à augmenter les dépenses caloriques ; le *coupe-faim* visant à diminuer l'appétit ; *substance de lest* visant à provoquer une sensation de ventre plein ; ou encore des compléments visant à empêcher l'absorption intestinale d'une partie des graisses ingérées [69,70]. Les plantes riches en caféine comme le guarana ou *Paullinia cupana*, les algues comme le fucus vésiculeux ou *Fucus vesiculosus* peuvent favoriser la perte de poids [71]. Les autorités sanitaires veillent à avoir des preuves d'efficacité sans quoi certaines propriétés énoncées deviennent interdites [72].

C. EVALUATION D'ACTIVITES BIOLOGIQUES

1. ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomes ou molécules, contenant un électron non apparié. Particulièrement instables, ils réagissent avec des substances plus stables pour apparié cet électron, soit en en arrachant un tel un oxydant soit en en cédant un tel un réducteur. Il se forme ainsi en chaîne de nouveaux radicaux. Le dioxygène ou O_2, est une de ces substances susceptibles de capter facilement un à deux électrons, pour être partiellement réduit en anion superoxyde ou $O^{2\bullet-}$ et peroxyde d'hydrogène ou H_2O_2, conduisant ainsi à la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS) [73]. Les ROS sont des espèces à la fois essentielles pour la signalisation et la régulation cellulaire mais aussi très toxiques. En effet, naturellement présents dans l'organisme, les radicaux

libres sont produits au quotidien selon divers mécanismes physiologiques, et ce de façon mesurée et adaptative. La balance antioxydants-prooxydants est ainsi en équilibre. En revanche, si cette balance est en déséquilibre à cause d'un déficit en antioxydants, d'une surproduction conséquente de radicaux libres ou même de phénomènes toxiques exogènes, alors cet excès est communément qualifié de stress oxydatif [74]. Ce stress oxydant non spécifique, irréversible et néfaste (sur les macromolécules intracellulaires, les lipides oxydants, l'ADN, les acides aminés, les acides gras ou les protéines) engendre d'importants dommages biochimiques comme la prolifération de cellules, la mort cellulaire par apoptose, le dépôt de lipides ou encore la mutagenèse. C'est pourquoi le stress oxydatif est responsable ou impliqué dans de nombreuses maladies dégénératives, cancers, troubles cardiovasculaires, diabète, vieillissement cutané et affections dermatologiques diverses. Les problèmes cutanés sont généralement induits par l'exposition à des facteurs environnementaux comme les UV entrainant d'une part l'altération des tissus conjonctifs par la formation excessive de peroxydes lipidiques et de ROS et impactant d'autre part l'activité de certaines enzymes [47,57,75].

L'activité antioxydante est donc essentielle pour protéger le système biologique. De ce fait, la fonction majeure des antioxydants est de lutter contre les ROS toxiques en les neutralisant ou en favorisant leur décomposition. Aussi, selon leur nature, ils interviendront à différents stades des chaînes de réactions oxydatives (*Figure 12*) [73,76].

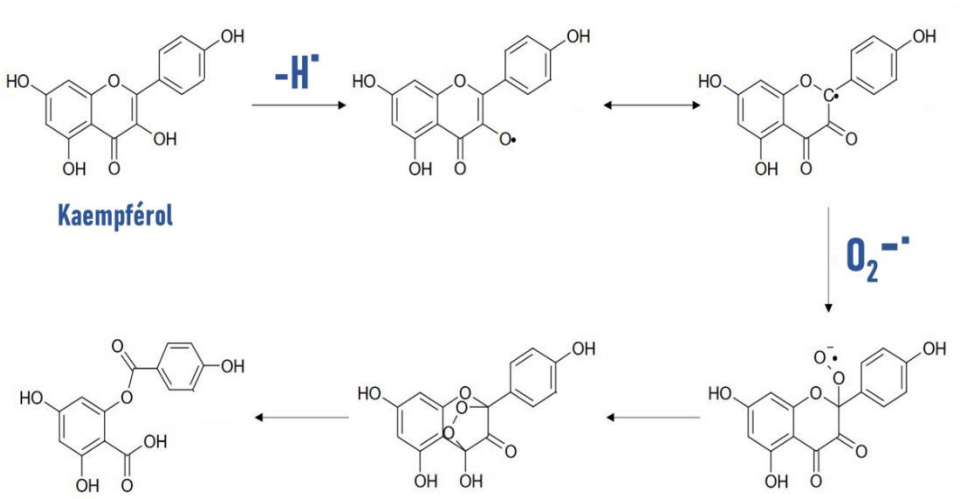


Figure 12. Mécanisme d'action anti-radicalaire du kaempférol pour le piégeage d'anion superoxide, adaptée de [73].

De multiples composés naturels sont des antioxydants efficaces, tels que le resvératrol [77], l'émodine, la rhéine [78], la catéchine, le dimère de procyanidine B ou encore l'acide chlorogénique [79]. Un bon antioxydant doit présenter plusieurs propriétés : efficacité à faible concentration, comptabilité physique et chimique avec le substrat qu'il doit protéger, absence de toxicité et de qualités sensorielles propres. Par ailleurs, différents tests colorimétriques *in vitro* non comparables sont disponibles pour évaluer le pouvoir antioxydant d'une molécule isolée ou d'un mélange complexe de molécules comme les extraits végétaux [76]. Les plus couramment employés, faciles à mettre en œuvre et à interpréter, sont les tests chimiques DPPH ou 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ; ABTS

ou acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique ; CUPRAC et FRAP pour les pouvoirs antioxydants réducteurs respectivement cuivrique et ferrique, ou encore le test de la chélation du fer (*Figure 13*) [76,80].

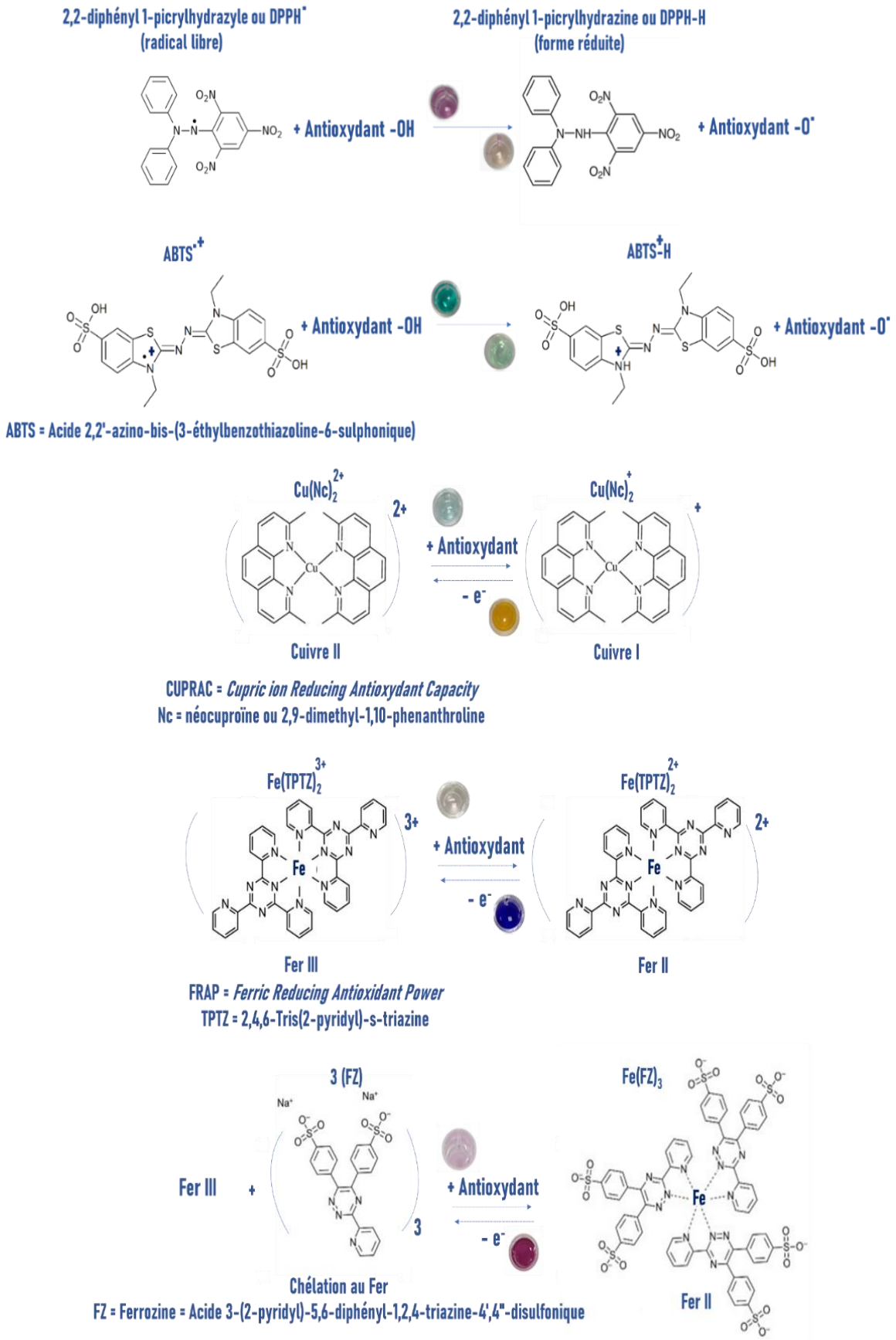


Figure 13. Mécanismes réactionnels mis en jeux lors des tests chimiques (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP et Chélation au fer) en présence de composés antioxydants.

D'autre part, les principaux systèmes de défense enzymatique contre ces radicaux sont les superoxydes dismutases, la glutathion peroxydase, la glutathion réductase, la catalase et d'autres hémoprotéines peroxydases, ainsi que les enzymes métabolisant les médicaments, telles que les glutathion S-transférases. Des méthodes enzymatiques peuvent aussi permettre l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de plantes comme le test avec la superoxyde dismutase ou SOD. Cette enzyme est responsable de l'élimination de l'anion superoxyde $O^{2\bullet-}$ protégeant ainsi les cellules des dommages liés aux radicaux libres produits par le métabolisme. Elle catalyse la dismutation de deux radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène [76,81]. Le dosage de l'activité SOD est indirect à base de xanthine oxydase (XOD) et d'un réactif coloré (*Figure 14*). Impliquant divers mécanismes (réactions de transfert d'un seul électron ou d'un atome d'hydrogène, ou inhibitions directes des radicaux libres, réactions de dismutation), il est souvent recommandé d'utiliser au moins deux méthodes pour un même essai [82].

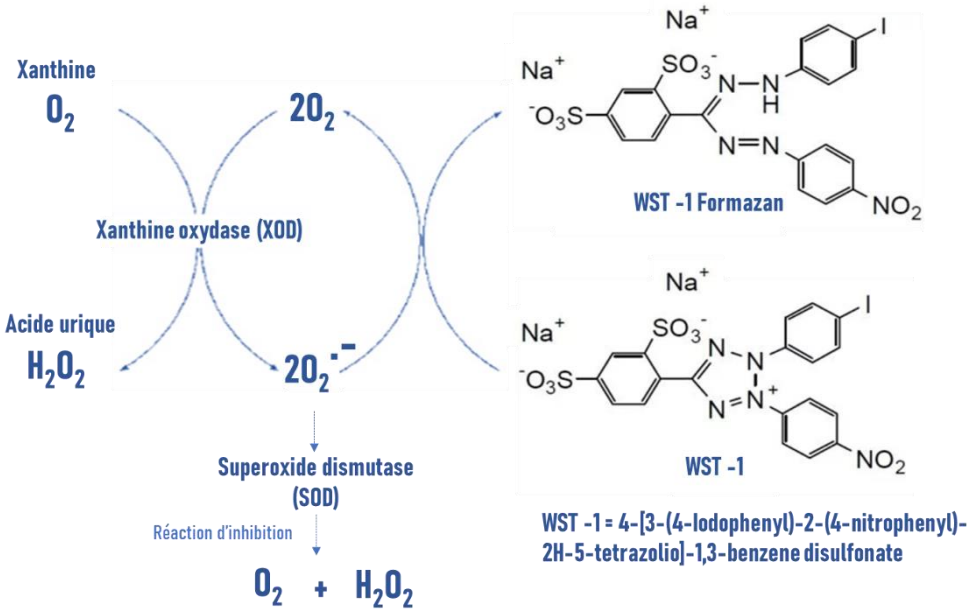


Figure 14. Mécanismes réactionnels mis en jeux lors du test enzymatique avec la xanthine oxydase.

2. ACTIVITE ANTI-HYALURONIDASE

Lorsque la peau contient une quantité suffisante d'eau, elle a un aspect plein, lissé et repulpé. En revanche, lorsqu'elle manque d'eau des rides, une modification du relief de la peau, une perte de souplesse, tonicité et fermeté, des taches pigmentées peuvent par exemple apparaître. L'hydratation intervient en effet, non seulement dans la mécanique de la peau, mais également dans tous les phénomènes inflammatoires et d'hyperpigmentation [48]. La molécule la plus importante, impliquée dans cette manifestation cutanée est l'acide hyaluronique ou hyaluronane ou AH, de haut poids moléculaire pouvant aller au-delà de 2×10^6 Dalton [83]. Appartenant à la famille des glycosaminoglycanes, il est non sulfaté et formé d'unités disaccharidiques polymériques répétitives d'acide D-glucuronique et de D-N-acétylglucosamine liés par une liaison glucuronidique β (1 → 3). Il s'avère qu'environ 50% des AH sont localisés dans la peau, produits par les fibroblastes du derme et

les cellules épidermiques [84]. Ils interviennent alors dans le processus de réparation cutanée en favorisant la migration et la prolifération cellulaire.

Au cours du vieillissement cutané, une disparition progressive d'AH dans l'épiderme est observée alors qu'il reste présent dans le derme. Sa qualité dermique change : sa taille diminue, il est plus fortement lié aux structures tissulaires et plus difficilement extractible. Avec l'âge ou sous l'influence de radicaux libres formés suite à une exposition aigue aux UV, il y a augmentation du dépôt d'AH et un œdème. Tandis que suite à une exposition chronique, l'AH est dégradé par une famille d'enzymes appelées hyaluronidases ou Hyal, qui en clivant la liaison *β*-1,4 génèrent des polymères de plus petite taille (*Figure 15*). Ces enzymes sont capables d'avoir à la fois des activités d'hydrolyse et de transglycosylation [48,58].

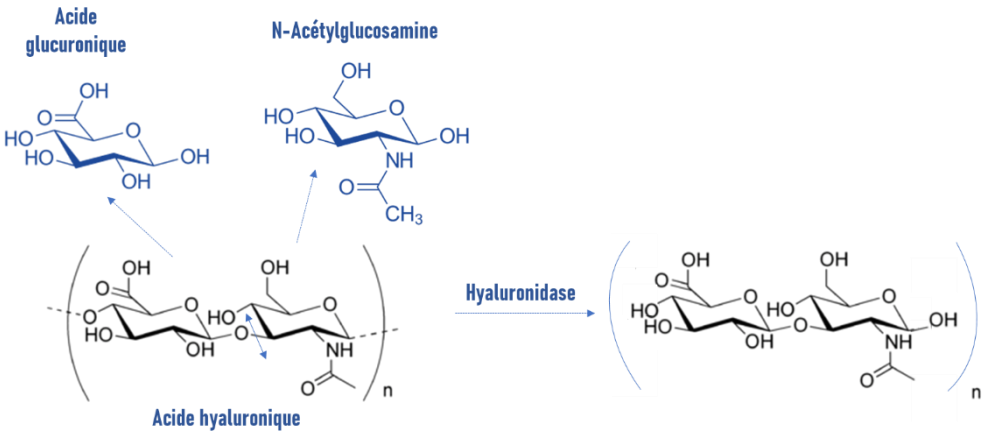


Figure 15. Schéma de la réaction hyaluronidase-acide hyaluronique, adaptée de [58]. La double flèche représente le clivage de la liaison β-1,4 par l'enzyme.

L'équilibre entre catabolisme et anabolisme des AH est primordial pour une organisation normale des tissus et des fonctions de la matrice extracellulaire. Un extrait végétal renfermant des inhibiteurs de la Hyal, utilisé entant qu'ingrédient dans un traitement topique fini dermocosmétique peut alors permet de prévenir la dégradation rapide de l'AH dans la matrice extracellulaire [85]. Ces inhibiteurs peuvent être par exemple des protéines, glycosaminoglycanes telle l'héparine, glucides, acides gras comme acide oléanolique, alcaloïdes telle la réserpine, flavonoïdes avec la lutéoline, terpénoïdes, antioxydants et polyphénols comme la catéchine ou l'acide chlorogénique [85,86]. Afin de suivre la cinétique enzymatique et le processus de digestion de l'AH par la Hyal, l'électrophorèse capillaire est une technique analytique qui peut être utilisée [87].

3. ACTIVITE ANTI-ELASTASE

De la famille des protéines fibreuses de type structural, l'élastine confère aux fibres élastiques du derme leur élasticité et leur résistance. Amorphe et hydrophobe, elle est formée de tropoélastines liées les unes aux autres par des liaisons croisées majoritairement tétravalentes nommées desmosine et isodesmosine. C'est d'ailleurs la polymérisation irréversible de ces monomères solubles qui fait que l'élastine est insoluble et résistante [58]. Les principaux facteurs qui régulent la synthèse de la mélanine sont le développement ou le vieillissement, les facteurs solubles comme les cytokines, les vitamines ou hormones, ainsi que les contraintes hémodynamiques tels que la respiration, le volume sanguin ou la viscosité sanguine [88].

L'élastine est très difficilement dégradable et fait partie des protéines les plus résistantes de l'organisme. L'élastase est l'unique protéase capable de dégrader le réseau de fibres d'élastine du derme par clivage préférentiel des acides aminés alanine, glycine et valine (*Figure 16*) [58]. Elle peut aussi s'attaquer à d'autres substrats comme le collagène, la fibronectine, la fibrilline et diverses protéines de la matrice extracellulaire. Cette enzyme est essentielle dans le processus de réparation cutanée afin de dégrader les protéines exogènes. En revanche si son activité est surexprimée, induite avec l'âge ou *via* les dégâts oxydatifs tel que le photo-vieillissement, l'apparition de rides, le relâchement de la peau, le développement de psoriasis ou encore une élastose solaire sont alors observés [89].

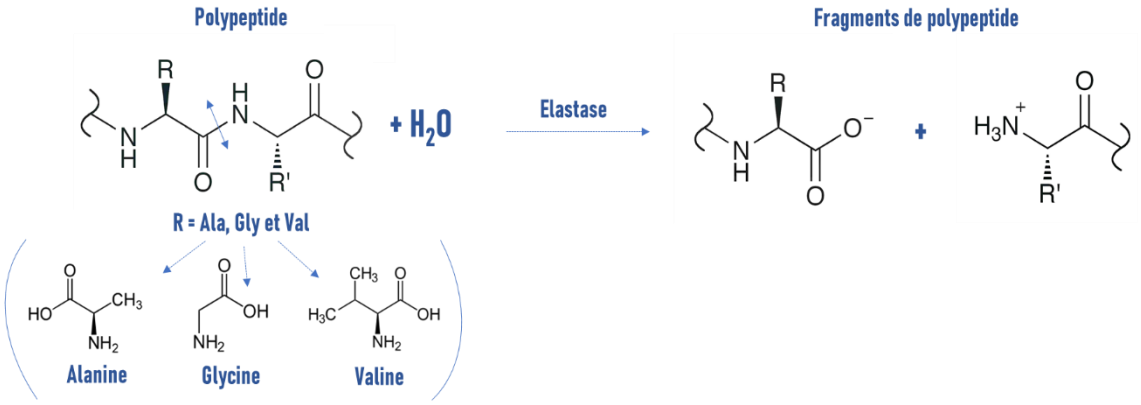


Figure 16. Réaction d'hydrolyse d'un peptide par l'élastase, adaptée de [58]. La double flèche représente le clivage préférentiel des acides aminés par l'enzyme.

Pour y remédier, des inhibiteurs de l'activité de l'élastase peuvent être incorporés dans des traitements topiques finis. Les extraits végétaux ou molécules isolées de ces extraits, peuvent réguler l'activité de cette enzyme et donc améliorer l'élasticité et la résistance des tissus cutanés. En effet, ils renferment des métabolites spécialisés inhibiteurs comme la catéchine et certaines de ses dérivés, le piceatannol, la lutéoline, la quercitrine, l'apigénine, l'acide pyracrénique, l'acide bétulinique ou encore l'amentoflavone [89,90]. La détermination de relations

structure-activité de flavonoïdes aglycones et *O*- ou *C*-glycosylées a permis de mettre en évidence les groupes chimiques potentiellement responsables de provoquer un effet inhibiteur sur l'élastase (*Figure 17*) [89].

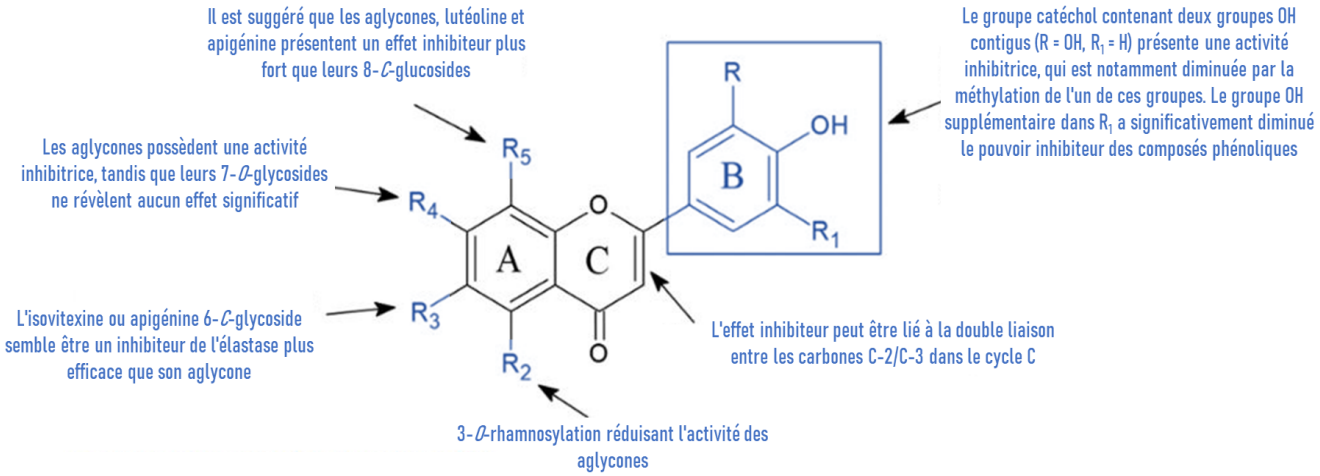


Figure 17. Mise en évidence des groupes chimiques de flavonoïdes potentiellement responsables d'un effet inhibiteur sur l'élastase, adaptée de [89].

4. ACTIVITE ANTI-COLLAGENASE

Le collagène est une protéine structurelle, génératrice d'intégrité, d'élasticité et de maintien des différentes structures du corps comme la peau, le cartilage, les articulations, les ligaments et tissus conjonctifs. Le corps dispose d'une quantité abondante de collagène par exemple de types I, II, III, IV, V et X. Avec l'âge, la quantité de collagène présente dans le corps diminue, facilitant ainsi le relâchement de la peau, l'apparition de rides ou de blessures ou même la diminution du flux sanguin [47,58]. La collagénase est responsable de la dégradation du collagène en cassant les liaisons peptidiques (*Figure 18*). Les collagénases appartiennent à la famille des métalloprotéinases matricielles, comprenant par exemple les gélatinases, les stromélysines et les matrilysines. Ces enzymes protéolytiques sécrétées ou membranaires, diffèrent d'un point de vue structurel, expliquant la capacité de chacune à dégrader un certain type de substrats [58].

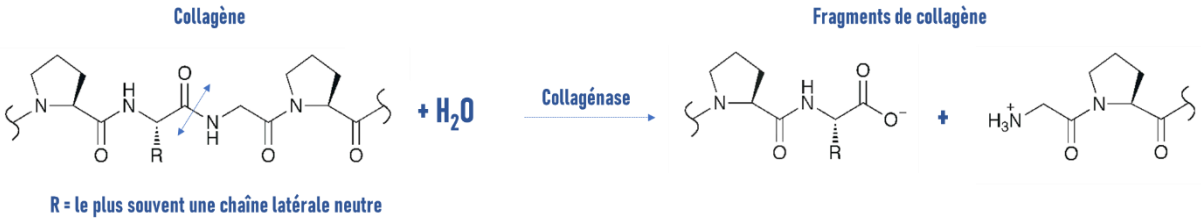


Figure 18. Hydrolyse du collagène par la collagénase, adaptée de [58]. La double flèche représente le clivage de la liaison peptidique par l'enzyme.

Une dégradation contrôlée et coordonnée des composants de la matrice extracellulaire est nécessaire à la régulation de nombreux processus biologiques, et l'activité des métalloprotéinases matricielles est donc régulée

finement par leurs inhibiteurs endogènes. Dans des conditions pathologiques, est observé un déséquilibre entre l'expression de la collagénase et de son inhibiteur endogène, en faveur d'une surexpression enzymatique. Dans de telles conditions, il est important de rétablir l'équilibre enzyme/inhibiteur, permettant de ralentir la destruction de la membrane basale, tout en préservant le collagène responsable de la force tensile de la peau [47,87]. Dans les extraits naturels sont présentes certaines molécules inhibitrices de la collagénase, comme l'émodine [91], la catéchine, la taxifoline, la polydatine [92], l'épigallocatéchine gallate (EGCG), la 1,10-phenanthroline monohydrate, la bulbophyllanthrine, le 3-hydroxy-2,4,7-triméthoxy-phénanthrène, le marylaurencinol A, l'éphéméranthroquinone B, ou encore la 5-hydroxy-2-méthoxy-1,4-phénanthrènequinone [93].

5. ACTIVITE ANTI-TYROSINASE OU BLANCHISSANTE

La tyrosinase, de la famille des mono-oxygénases, est une glycoprotéine à zinc catalysant les premières étapes de la mélanogénèse qui est le processus physiologique de synthèse des mélanines. Ces dernières sont les pigments responsables de la coloration de la peau, jouant un rôle essentiel dans la protection de la peau contre les radiations UV, dans le piégeage des radicaux libres ou l'accumulation d'ions [94,95]. L'enzyme a dans un premier temps une activité monophénolase ou monophénol hydroxylase permettant l'ortho-hydroxylation de l'acide aminé L-tyrosine en L-3,4-dihydroxyphénylalanine ou L-DOPA en présence d'ions cuivriques, cofacteurs indispensables. Puis dans un second temps, elle a une activité diphénolase ou diphénol oxydase assurant l'oxydation de la L-DOPA en dopaquinone [95]. Il s'avère de plus que selon le substrat utilisé (L-tyrosine ou L-DOPA) dans les tests *in vitro*, il est possible de mettre en évidence l'inhibition de l'une ou l'autre des activités de la tyrosinase, soit respectivement monophénolase ou diphénolase. Dans la voie de biosynthèse de la mélanine, la dopaquinone est ensuite convertie en leucodopachrome, puis en dopachrome de couleur rouge conduisant à la mélanine suite à des réactions en chaîne (*Figure 19*) [94,96].

Sa synthèse est par ailleurs régulée par le facteur α-MSH (*alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone*) qui se fixe sur un récepteur spécifique porté par les mélanocytes. La mélanine est ainsi produite et sécrétée dans les mélanocytes de l'épiderme, et plus particulièrement dans les mélanosomes, des organites cytoplasmiques spécifiques (*Figure 20*) [23]. Sous l'influences de facteurs divers externes ou internes (UV, hormones, médicaments d'usage courant, *etc.*), faisant varier la production de mélanine ou sa distribution, des problèmes dermatologiques comme les mélasmas [97] ou les lentigos avec respectivement apparition de taches foncées ou brunes sur certaines parties du corps peuvent survenir. Des agents blanchissants synthétiques ou naturels (molécules isolées ou extraits végétaux) sont alors nécessaires pour traiter ces phénomènes d'hyperpigmentation cutanés. Leur réglementation en vigueur, constamment en évolution, est d'ailleurs très précise et diffère selon les pays. Par exemple en Suisse, l'acide kojique, qui est souvent utilisé entant que référence contrôle dans les tests *in vitro*, est interdit dans la composition des produits cosmétiques pour blanchir la peau. Il peut engendrer des effets secondaires telles que des irritations ou allergies [23].

Différents types de métabolites inhibiteurs de la tyrosinase peuvent ainsi être employés comme les composés polyphénoliques (taxifoline, dalénine, oxyresvératrol), quinones (physcione, arbutine), coumarines (aloésine, 9-hydroxy-4-méthoxypsoralène), ou encore les terpènes (citral, myrcène, bayogénine) [23,98]. Ils pourront agir soit en bloquant la voie de biosynthèse de la mélanine à une étape donnée, soit en bloquant le transfert des mélanosomes ou soit enfin en diminuant le nombre de mélanocytes [99,100].

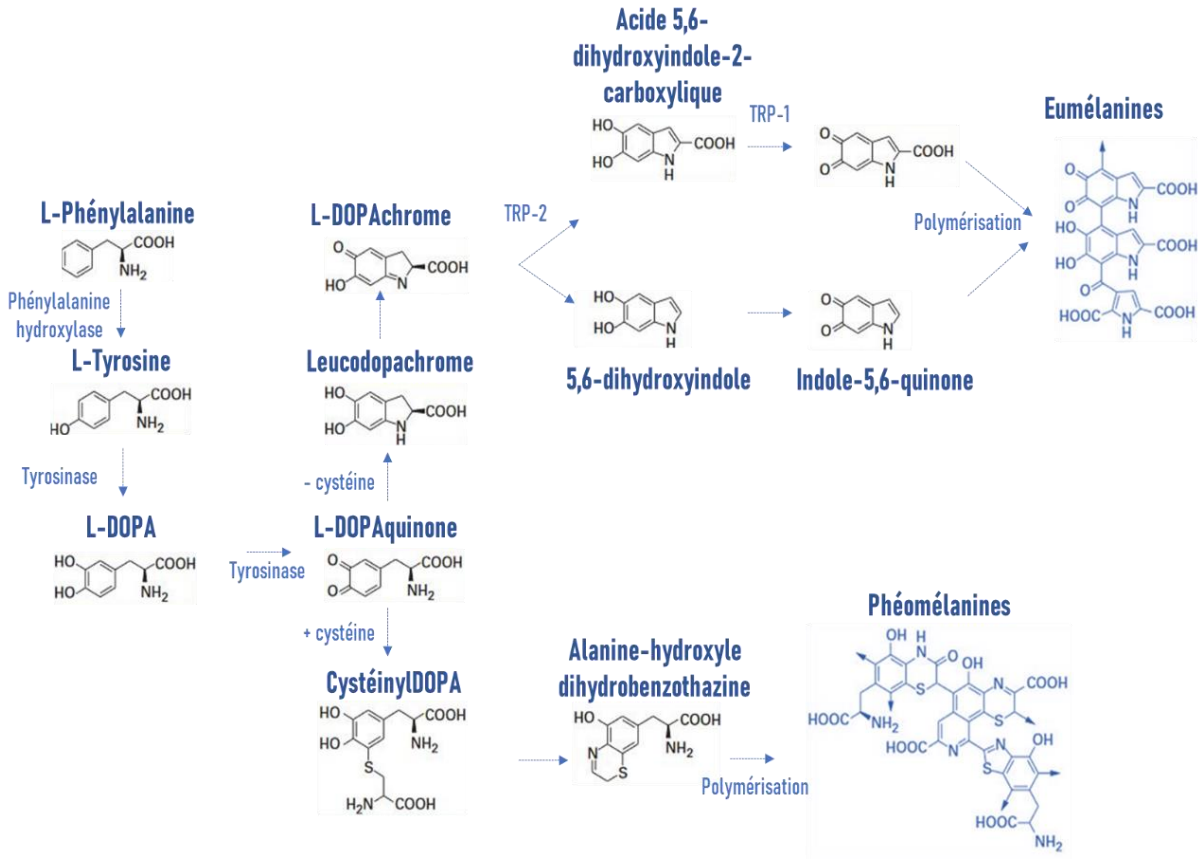


Figure 19. Biosynthèse de mélanines. Les flèches représentent les éventuels sites de polymérisation, adaptée de [23,94] TRP1 et TRP2 : dopachrome tautomérases ou respectivement protéine-1 liée à la tyrosine et protéine-2 liée à la tyrosine.

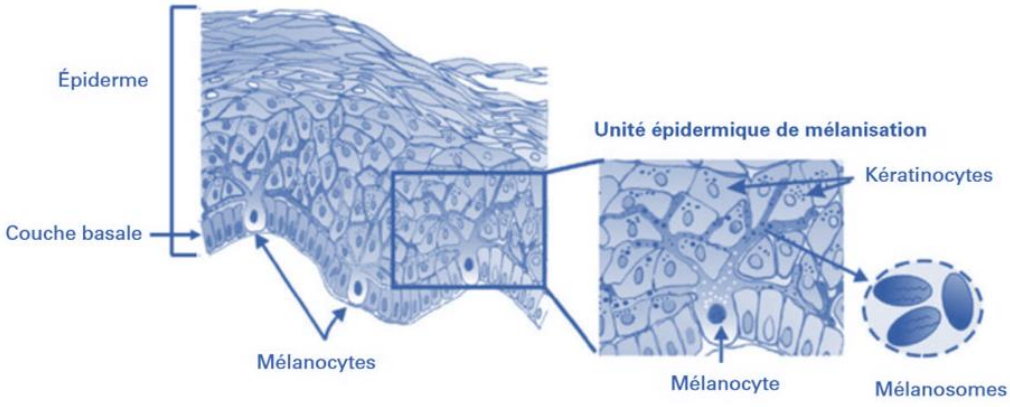


Figure 20. Structure générale de l'épiderme à gauche et zoom sur les mélanosomes secrétant la mélanine, extraite de [23].

6. ACTIVITE ANTI-LIPASE

Les triacylglycérol acyl-hydrolases, ou lipases, sont des enzymes singulières de par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats. Les lipases présentent une grande diversité structurelle provenant d'origines diverses, animales, végétales, dérivées de micro-organismes ou microbiennes, ce qui augmente d'autant plus leurs potentialités. En fonction de leur microenvironnement, elles peuvent agir entant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. Entant qu'hydrolases, elles agissent sur l'interface huile/eau [101,102]. La lipase (EC 3.1.1.3) qui appartient à cette classe est catalyse l'hydrolyse des liaisons ester telles que celles des triglycérides entraînant la libération d'acides gras libres et de monoglycérides, facilitant l'absorption des graisses dans le corps (*Figure 21*) [101]. Certaines lipases ont aussi la possibilité d'hydrolyser des phospholipides, des esters de cholestérol et même parfois certains esters synthétiques. L'électrophorèse capillaire est une technique appropriée pour surveiller ce type de réactions catalysées où différents produits peuvent être obtenus ainsi que pour le criblage d'inhibiteurs potentiels [101].

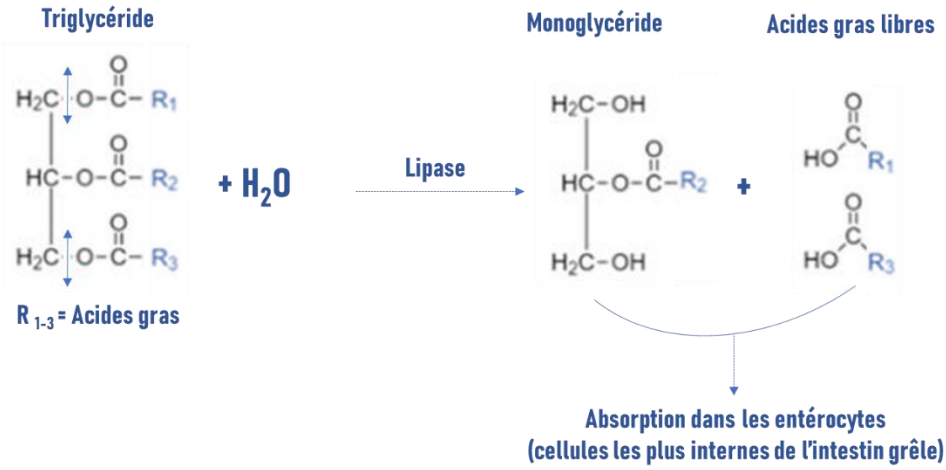


Figure 21. Schéma de la réaction d'hydrolyse d'un triglycéride catalysée par la lipase, adaptée de [101].

Ces dernières années, les inhibiteurs de lipase, notamment synthétiques, sont devenus un moyen important de contrôler et traiter l'obésité, jouant un rôle majeur dans le métabolisme des graisses et ayant une faible toxicité. En effet, en se combinant avec la partie active de la lipase de l'estomac et de l'intestin grêle, ils inhibent l'activité catalytique et réduisent alors les lipides tels que les triglycérides. L'hydrolyse diminue la digestion et l'absorption de ces derniers dans les aliments ainsi que l'accumulation de tissu adipeux, le niveau de LDL dans le sang et augmente le niveau de HDL [63]. Les inhibiteurs de lipase, issus de produits plus naturels telles que les plantes médicinales et comestibles, sont rapidement devenus des centres de recherche potentiels dans le développement de médicaments amaigrissants ou de produits de santé [103]. Ils ont été utilisés dans le tractus intestinal, le sang et le système nerveux central sans effets secondaires. Par exemple, lors de précédents travaux, il a été montré que la théophylline (alcaloïde de type méthylxanthine) extraite du thé, était un excellent inhibiteur de la lipase dans le tractus intestinal améliorant l'environnement de transport des lipides dans le corps. Il s'est

avéré que dans le foie, l'accumulation de diacylglycérol et d'acide gras étaient réduite. La réduction des concentrations de LDL dans le sang et l'augmentation des concentrations de HDL ont aussi été identifiées dans une autre étude menée sur cette même molécule extraite cette fois-ci du café [103,104].

De plus, ces inhibiteurs sont plus largement disponibles, relativement bon marché, sûrs et fiables, bien qu'ils aient des degrés d'inhibition et que la détermination des composants actifs soit plus difficile. Si le mécanisme d'action et la relation structure-activité des composés naturels sur la lipase pancréatique sont étudiés, les produits naturels criblés sont souvent pris comme composés principaux et la méthode de synthèse chimique est utilisée pour apporter une modification moléculaire afin d'améliorer le rendement ou d'avoir une activité anti-lipase plus élevée [103]. Bien que certains produits naturels aient montré des effets inhibiteurs évidents, pour l'instant rares sont ceux qui sont appliqués au stade clinique. Leurs propriétés conduisent au développement d'applications diverses aussi bien en médecine humaine et recherche fondamentale, que dans les industries agro-alimentaires, nutraceutiques, chimiques, pharmaceutiques et cosmétiques [63].

D. OUTILS D'AIDE A LA RECHERCHE D'ACTIFS

1. L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

L'électrophorèse capillaire (ou EC) est une technique analytique appropriée pour la séparation et la quantification de constituants ou analytes ioniques ou ionisables, selon leur état de charge. Ces derniers se trouvent séparés à l'aide d'un tampon sous l'effet d'un champ électrique, grâce à leurs différences de mobilités ou de vitesse de migration (*Figure 22, a et b*) [105]. L'EC permet ainsi l'analyse d'une grande variété de molécules telles que les protéines, les acides nucléiques, les acides aminés ou encore divers composés phénoliques. Cette méthode séparative est aussi employée préférentiellement pour la recherche de constituants actifs présents dans différentes matrices complexes. Il est par exemple possible de suivre le processus de digestion de l'AH par la hyaluronidase, lorsque des inhibiteurs de cette enzyme sont recherchés ou criblés [87,101,105].

En EC, les constituants du mélange sont d'abord injectés dans un capillaire (quelques nanolitres suffisent), le plus souvent en silice vierge et de faible diamètre (inférieur à 100 µm) et dont la paroi peut éventuellement être modifiée par des polymères de multiples types. Cette injection peut être réalisée selon deux modes à savoir hydrodynamique ou électrocinétique [105]. Dans le premier cas, il y a application d'une surpression à l'entrée du capillaire ou le vide à la sortie du capillaire permettant d'introduire le mélange à l'intérieur. Et dans le second cas, il y a application d'une tension aux bornes du capillaire permettant aux constituants ionisés ou entraînés par électroosmose de pénétrer à l'intérieur. Il s'avère que l'électroosmose aussi appelée écoulement électroosmotique (EOF ou *electroosmotic flow*) ainsi que la migration électrophorétique sont les deux processus possibles donnant lieu au transport des constituants à l'intérieur du capillaire (*Figure 22, b*) [105].

Pour l'électroosmose, la paroi du capillaire est recouverte de groupements silanols (SiOH) devenant (SiO^-) si le pH est supérieur à 2,5. Ces groupements déprotonés forment alors une couche de charges négatives en surface. Les cations solvatés présents dans l'électrolyte tel qu'une solution tampon aqueuse viennent alors se positionner en regard pour former une double couche électrique. Aussi ces derniers se mettent en mouvement lorsqu'un champ électrique est appliqué, entraînant les autres molécules ionisées. Le flux en résultant détient un profil de vitesse plat et a une direction partant de l'anode pour aller vers la cathode. Cet écoulement électroosmotique peut par ailleurs être modifié c'est à dire inversé, annulé avec un capillaire greffé ou en adsorbant sur la paroi du capillaire des polymères chargés ou neutres ou encore des tensioactifs qui serviront à dissocier les constituants neutres. La migration électrophorétique entraînant les cations vers la cathode et les anions vers l'anode, se soucie quant à elle des conditions opératoires comme la force ionique, la composition et la viscosité de l'électrolyte de séparation ou encore le pH [105].

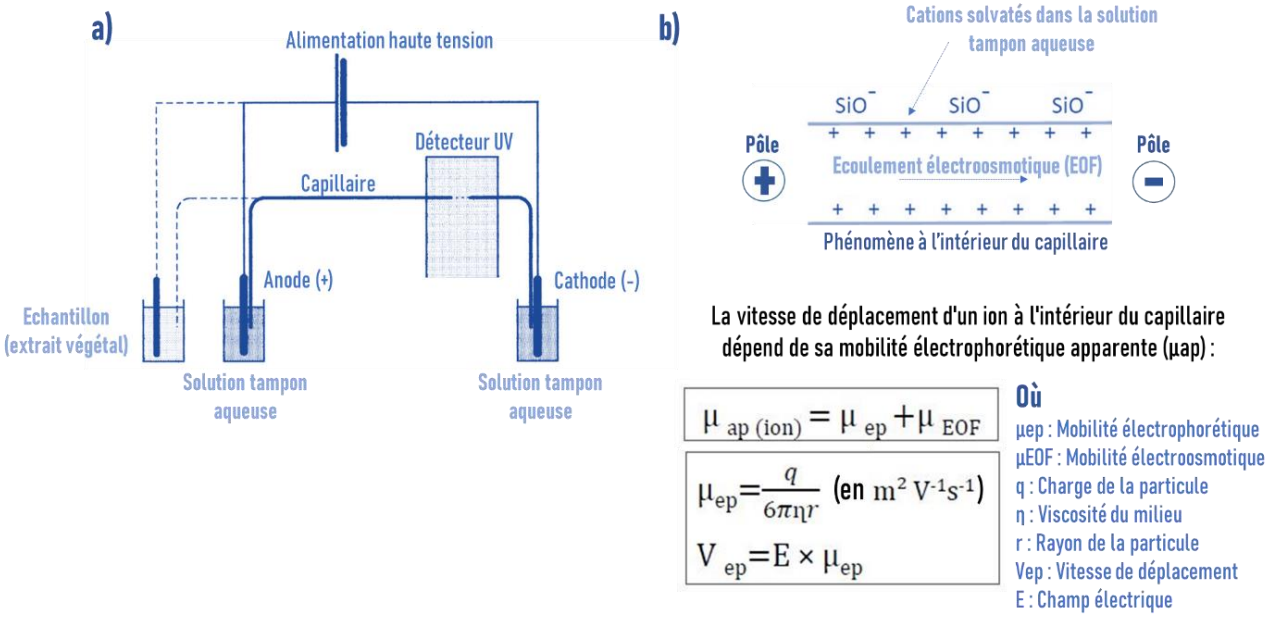


Figure 22. a) Schéma du principe de fonctionnement de l'électrophorèse capillaire : les lignes continues sont associées aux conditions de séparation et les lignes discontinues aux conditions d'injection électrocinétique. b) Présentation schématique de la mobilité des analytes à l'intérieur du capillaire et équations s'y rapportant. Adaptés de [105].

Tout comme l'ensemble des techniques d'analyse de chromatographie en phase liquide (ou CPL), l'électrophorèse capillaire a développé ces dernières années plusieurs modes de séparation. Il existe en effet, l'électrophorèse capillaire de zone (CZE ou *capillary zone electrophoresis*) qui est la plus utilisée, notamment pour l'analyse de constituants ionisés ou ionisables à caractères acido-basiques. Il y a également la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC ou MECC ou *micellar electrokinetic chromatography*), destinée aux constituants neutres ou chargés difficilement séparables, ou même l'électrophorèse en gel (CGE ou *capilary gel electrophoresis*) où les molécules sont séparées en fonction de leur taille. D'autres variante de l'EC comme l'isotachophorèse (ITP ou *isotachophoresis*), l'électrochromatograhie capillaire (CEC ou *capillary electrochromatography*) ou encore la focalisation isoélectrique capillaire (CIEF ou *capillary isoelectricfocusing*) sont disponibles [105].

La visualisation des séparations des différents constituants se fait ensuite sur un électrophérogramme, grâce à des détecteurs de types UV, un ampèremètre, un fluorimètre ou bien un spectromètre de masse (MS). Cependant, certains couplages présentent encore des difficultés de mise en œuvre (maintien du contact électrique aux bornes du capillaire, ionisation/désorption des analytes dans la source d'ionisation). La CE est ainsi reconnue aujourd'hui pour sa haute résolution, sa faible consommation de solvants, son faible coût et ses séparations à la fois rapides et efficaces. Elle apparaît par ailleurs comme une technique complémentaire aux autres méthodes chromatographiques plus classiques permettant de relever les défis analytiques auxquels la CPL ne peut pas répondre ou de confirmer des résultats déjà obtenus [87,101,105].

2. LA BIOAUTOGRAPHIE

Suivre la bioactivité dans des mélanges complexes n'est pas toujours simple. L'isolement et la purification des constituants biologiquement actifs, sont d'autre part, des étapes longues et coûteuses dans l'analyse des produits naturels bruts. Dans ce contexte, de nombreuses études sont menées continuellement sur les bioessais chimique et enzymatique afin de développer des outils plus rapides et fiables ainsi que peu coûteux, tout en minimisant les interférents contingents [106].

La bioautographie couplée à la chromatographie sur couche mince (ou TLC) visuelle et sélective, offre alors la possibilité d'allier chimie & biologie pour corréler l'analyse chimique avec les données biochimiques. Dénommée TLC-bioautographie, cette pratique est aujourd'hui considérée comme une méthode singulière de déréplication s'intéressant en particulier au criblage haut débit d'actifs présents dans les matrices naturelles comme les extraits végétaux riches en molécules. Il est ainsi possible d'évaluer la présence ou l'absence d'une activité biologique recherchée, directement sur la plaque TLC [107]. Les dépôts de l'extrait total, des contrôles négatif et positif à différentes concentrations peuvent être effectués sur le même support. Un fort engouement pour cette association a été observé dès les années 1960, d'autant que les quantités nécessaires de matière pour sa mise en œuvre sont relativement faibles. Différents agents antibiotiques (pénicillines, rifamycines ou encore tétracyclines) ont pu en effet être détectés, en présence de sels de triphényltétrazolium, sur supports recouverts de micro-organismes [108].

Aujourd'hui, les principales applications de la bioautographie sont notamment dans le secteur pharmaceutique, en médecine, en phytochimie et cosmétique, en alimentation, en nutraceutique ou encore dans le domaine des biotechnologies. En effet, de nombreux bioessais compatibles avec la TLC ont été développés ces dernières années, permettant alors la détection d'agents antimicrobiens (bactéries, moisissures) par bioautographie directe, de contact ou par immersion ; d'antioxydants (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ou DPPH, acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique ou ABTS, inhibition du blanchiment du β-carotène) ; de composés œstrogéniques grâce à des levures ; de pathogènes ; ou encore d'inhibiteurs de cibles enzymatiques [109]. Ces dernières appartiennent à des classes d'enzymes différentes telles que les oxydoréductases (par exemple : glucose-6-phosphate déshydrogénase (EC 1.1.1.49), péroxydase (EC 1.11.1. x), monoamine oxidase (EC

1.4.3.4), tyrosinase (EC 1.14.18.1) ou encore xanthine oxidase (EC 1.17.3.2)), les hydrolases (par exemple : lipase (EC 3.1.1.3), acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7), butyrylcholinestérase (EC 3.1.1.8), *α*-glucosidase (EC 3.2.1.20), *β*-glucosidase (EC 3.2.1.21), *α* -amylase (EC 3.2.1.1), *β*-glucuronidase (EC 3.2.1.31), dipeptidyl peptidase IV (EC 3.4.14.5), *α* -chymotrypsine (EC 3.4.21.1) et arginase (EC 3.5.3.1)) et les isomérases (par exemple : glucose-6-phosphate isomérase (EC 5.3.1.9)) [110].

Concernant ce type de bioessais cependant, il s'avère que la TLC-bioautographie présente quelques limitations. Pour les oxydoréductases, une faible sensibilité des agents de dérivation/visualisation, un long temps de réaction, une mauvaise reproductibilité, une consommation élevée de substrat ou des réponses faussement positives ont été observées. La détermination des inhibiteurs d'hydrolase s'est accompagnée de problèmes de quantification, de spécificité, de solubilisation du substrat ou de numérisation du chromatogramme. Pour l'isomérase, des résultats faussement positifs et une sensibilité élevée de l'enzyme aux solvants (par exemple aux acides contenus dans les phases éluantes utilisées lors de la séparation) ont été détectés. Cependant, la plupart des problèmes mentionnés peuvent être atténués par une méthodologie bien choisie [110].

Pour effectuer les analyses bioautographiques, une biomolécule ou enzyme doit être appliquée sur la plaque développée, c'est à dire où les divers constituants à cribler ont été préalablement séparés. Après une (ou plus) incubation(s) appropriée(s), les zones ou *spots* d'inhibition de la cible thérapeutique peuvent être visualisée via le module de visualisation. Si ces dernières ne sont pas observables dans l'immédiat, le recours à une étape de révélation peut être envisagé. Les *spots* ainsi localisés peuvent ensuite être identifiés. Pour obtenir une caractérisation plus fine, des couplages à la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), ou encore à la MS à l'aide d'une interface (*voir section IV. B. 2. de l'étude bibliographique*), peuvent être mis en place. L'(HP)TLC propose ainsi quatre dimensions (la séparation polaire/apolaire, la révélation chimique, le criblage d'actifs et la spectrométrie de masse) pour la recherche de nouvelles molécules bioactives, pouvant être intégrées dans des formulations de produits divers [106,110].

La combinaison de l'(HP)TLC avec des tests biologiques permet finalement un isolement rapide et ciblé des molécules présentes dans le mélange complexe. Les interférences éventuels par d'autres substances du mélange analysé sont également réduits [110]. L'étude des effets synergiques potentiels ne peut quant à elle pas être menée. Les tests classiques spectrophotométriques en microplaques restent par ailleurs complémentaires à cette technique et sont généralement plus adaptés pour déterminer les concentrations inhibitrices médianes ou IC50 des molécules.

III. PRESENTATION DES TROIS ESPECES ETUDIEES

A TAXONOME

Les genres *Fallopia*, *Ambrosia* et *Solidago* sont compris dans les angiospermes dicotylédones (*Figure 23*) [111]. Le genre *Fallopia*, de la famille des *Polygonaceae* [112], appartient à l'ordre des *Caryophyllales* [111,113,114]. Il se compose d'une vingtaine d'espèces, principalement distribuées dans les zones tempérées de l'hémisphère nord, dont le complexe hybride polyploïdes des renouées du Japon (ou *Fallopia* spp.). *Fallopa. Japonica* (ou *F. japonica*) fait partie de ce dernier ainsi que l'espèce *Fallopia sachalinensis* (ou *F. sachalinensis*) et leurs nombreux hybrides interspécifiques *Fallopia x bohemica* (ou *F. x bohemica*)[115,116].

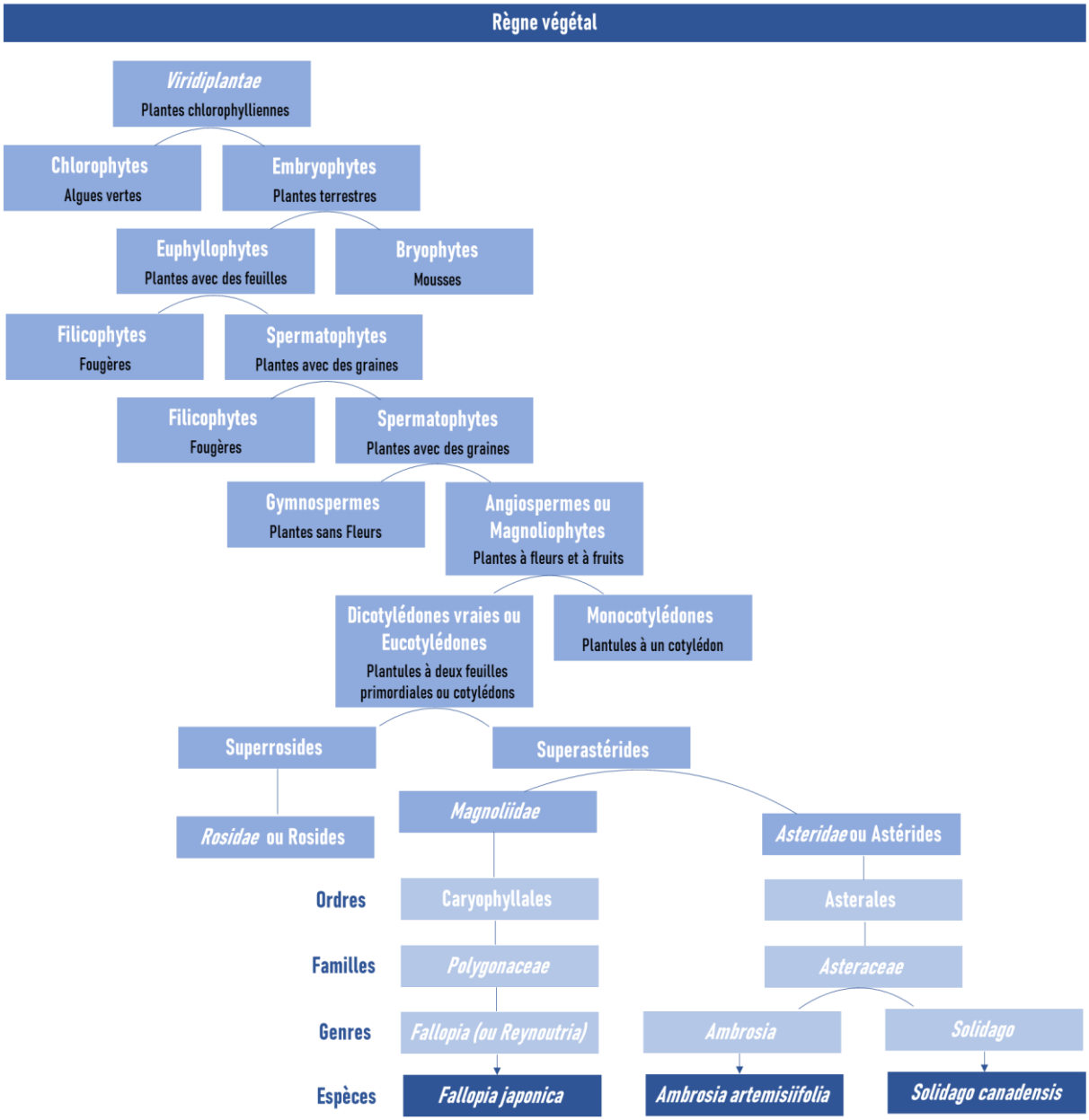


Figure 23. Positions systématiques des trois espèces végétales exotiques envahissantes. Leurs sous-espèces ne sont pas précisées. Adaptée de la dernière version de la classification du groupe de phylogénie des angiospermes datant de 2016 [111].

Le genre *Ambrosia*, de la famille des *Asteraceae* appartient à l'ordre des *Asterales*. Il contient une quarantaine d'espèces réparties dans le monde entier entre les climats continentaux ou semi-continentaux et méditerranéen [117]. Les aires de répartition naturelles de nombreuses espèces d'*Ambrosia* adventices sont obscurcies par les introductions exotiques fréquentes et la naturalisation ultérieure [118]. L'espèce d'*Ambrosia* la plus répandue est *Ambrosia artemisiifolia* (ou *A. artemisiifolia*). Les ambroisies en expansion en Europe sont *A. artemisiifolia* et, en plus petits nombres, l'ambroisie trifide (ou *A. trifida*) et l'ambroisie à épis lisses (ou *A. psilostachya*). L'Ambroisie maritime (ou *A. maritima*) est quant à elle d'origine européenne (région méditerranéenne).

Le genre *Solidago* comprend environ 120 espèces presque toutes nord-américaines [119]. Le genre *Solidago* comprend une grande quantité de variation morphologique et cytologique mais des niveaux étonnamment faibles de variation de séquence d'ADN. Ces espèces sont couramment appelées les solidages américains (ou *Solidago* sp.) [120,121]. En font partie les deux espèces *Solidago canadensis* (ou *S. canadensis*) et *Solidago gigantea* (ou *S. gigantea*) provenant d'Amérique de Nord [31]. *Solidago virgaurea* (ou *S. virgaurea*) est quant à elle originaire d'Europe.

B. PRESENTATION DE *FALLOPIA JAPONICA*

1. DESCRIPTION BOTANIQUE

Figure 24. Dessin d'une jeune pousse de Fallopia japonica, réalisé par Letiche Pierre-Alexis.



♦ **Origine** Asie orientale (Japon, Corée, Chine)

♦ **Genre** *Fallopia (ou Reynoutria)*

♦ **Famille** *Polygonaceae* [112]

♦ **Noms vernaculaires**

Renouée du japon (France), Ko-Jo-Kon (Japon), HO-Jang Geun (Corée), Banzhang (Chine) ou même Japanese knotweed (Angleterre)

♦ **Caractéristiques**

Plante géophyte vivace et vigoureuse au port buissonnant, pouvant constituer des fourrés denses appelés mattes. Herbacée pouvant mesurer jusqu'à 3 m de haut.

♦ **Mode de reproduction**

Reproduction végétative et sexuée. Un simple fragment de plante de quelques grammes suffit pour créer un clone [30]

♦ **Cycle végétatif**

Croissance précoce de ses tiges, mi-avril. Floraison automnale entre août et octobre, suivie de la mortalité des tiges. Les repousses partent des rhizomes le printemps suivant (*Figure 24*).

♦ **Partie aérienne**

Feuilles vertes alternes, rondes de 15 à 20 cm avec une base plate et qui se terminent par une pointe.
Tiges robustes ramifiées au sommet, creuses et arrondies d'un vert rougeâtre avec un diamètre d'environ 0,02 à 0,03 m.
Fleurs blanchâtres, verdâtres ou rougeâtres réunies en grappes apparaissant généralement en août. Fruits-Graines sont des akènes trigonaux bruns et secs.



♦ **Partie racinaire**

Racines épaisses et brunes. Rhizomes pouvant mesurer jusqu'à 20 m, épais, blanchâtres ou brunâtres selon sa maturité, ligneux et fermes. Fine écorce brune foncée visible les recouvrant.

♦ **Risque de confusion entre *Fallopia* spp.**



Renouée du Japon
Fallopia japonica

Feuilles 15 – 20 cm avec une base plate



Renouée de Sakhaline
Fallopia sachalinensis

Feuilles 25 – 40 cm en pointe de flèche



Renouée de bohème
Fallopia x bohemica
(Hybride entre les deux espèces)

Feuilles 20 – 25 cm avec une base plate, en forme de

2. ORIGINE DE SON INTRODUCTION & REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Au XIXème siècle, Philipp Franz Von Siebold, un médecin au service de la compagnie hollandaise des Indes orientales en poste au Japon, avait récolté cette plante locale pour l'introduire dans son jardin de Leyde aux Pays-Bas. Fondateur d'une compagnie horticole spécialisée dans l'importation de plantes orientales, il commercialisa ainsi des renouées du Japon. Rapidement, l'octoploïde *F. japonica* a été utilisée en ornementation appréciée pour ses feuilles en forme de cœur, l'élégance du port et sa floraison automnale. Elle a également été employée entant que plante fourragère et mellifère [122]. Introduite conjointement avec la tétraploïde *F. sachalinensis* en Europe et aux Etats-Unis, ces deux espèces se sont d'abord naturalisées fin du XIXème siècle, puis début du XXème après une phase de latence, ont commencé leur impressionnante colonisation avec une dynamique d'expansion très forte [30,122]. Elles se disséminent par multiplication végétative et ont une excellente reproduction sexuée, libérant chaque hiver un très grand nombre d'akènes participant à la dispersion des individus (par le vent et les cours d'eau) et à la diversité génétique des *Fallopia* spp [123]. Les renouées du Japon se sont ainsi largement répandues dans toutes les régions du globe à climat tempéré (Europe occidentale et centrale, Amérique du Nord, Asie, Nouvelle Zélande). Elles se manifestent sur le territoire européen sous forme d'individus de *F. japonica*, de *F. sachalinensis* et de *F. x bohemica*. Ces derniers se croisent entre eux et avec les espèces parentales de manière permanente et continue avec différents niveaux de ploïdie [115,124]. Les hybrides allopolyploïdes *F. x bohemica* présentent une croissance rhizomateuse agressive et vigoureuse, ce qui réduit l'établissement et la croissance des espèces indigènes [115].

En France, les *Fallopia* spp. sont présentes dans tous les départements [123,125]. En Région Auvergne-Rhône-Alpes, sont notamment retrouvées *F. x bohemica* et *F. japonica*. *F. sachalinensis* quant à elle y est plus rare. Dans les deux Savoies, *F. japonica* apprécie pousser à proximité des rivières telles que le Doron de Beaufort, l'Arly ou la Chaise dans les vallées du Beaufortain et de la Tarentaise [126]. Elle est souvent abondante dans les zones alluviales et dans les sites perturbés et dégradés par les activités humaines (*Figure 25*).



Figure 25. Fallopia japonica. présente dans les Savoies en bords de route dans les communes de la Motte-Servolex (A) et de Saint-Alban-d'Hurtières (B) ; et en bordure du Sierroz (C) et du Lac du Bourget (D).

3. IMPACTS NEGATIFS ENVIRONNEMENTAUX, SECURITAIRES ET ECONOMIQUES

F. japonica et plus largement *Fallopia* spp. sont un vrai fléau ayant des impacts négatifs multiples ♦[1]environnementaux, ♦[2]sécuritaires et ♦[3]économique. Elle est actuellement considérée par l'UICN comme l'une des 100 espèces les plus menaçantes du monde [127], difficile à éliminer [128].

♦[1]Elles dominent l'espace du sol avec leur réseau racinaire dense et profond. Avec leurs plusieurs mètres de haut, elles empêchent la lumière de passer privant les autres espèces végétales de soleil. Ayant une grande capacité de stockage des nutriments, elles appauvrissent aisément les sols. Grande caractéristique des *Fallopia* spp., il s'agit également d'espèces métallophytes, tollérantes aux aux éléments traces métalliques. Ces derniers et donc les conditions environnementales anthropiques peuvent par ailleurs modifier leur métabolisme secondaire [129]. Implantées sur les rives, la bonne alimentation en eau et la richesse du substrat en éléments nutritifs leur permettent d'avoir une croissance et une compétitivité optimale, conduisant à des peuplements monospécifiques étendus. Ce type de peuplement participe à l'effondrement des sols, l'érosion des berges dans les zones alluviales augmentant les risques de débordement et d'inondation. En effet, les peuplements s'opposent à la régénération naturelle et à l'installation des ligneux (aulnes, saules, frênes...), qui assurent la fixation et la stabilité des sols. Des études récentes ont par ailleurs montré que bien que *F. japonica* produise de plus grandes quantités de biomasse aérienne et souterraine par rapport aux espèces résidentes, il ne semble pas y avoir de différence significative dans les propriétés physicochimiques de la couche arable des sites d'étude, suggérant soit que la plante n'a aucune influence sur le sol, soit que la réponse de l'écosystème à l'invasion est spécifique au site et/ou à la saison et/ou à la profondeur du sol [130,131].
Les principaux phytophages collectés sur les populations de renouées du Japon sont l'*Allantus luctifer* ; l'*Anomala albopilosa albopilosa* ; l'*Anomala cuprea* ; l'*atractomorpha lata* ; le *Popillia japonica* ou encore les Aphididés. Dans une étude de terrain, il a été montré que les *Fallopia* spp. rencontraient moins d'ennemis phytophages, subissaient des taux bien moindres d'herbivorie, et avaient un développement végétatif beaucoup plus important (tiges plus hautes et plus ramifiées, surface foliaire plus importante) dominant très nettement les espèces végétales concurrentes (impact négatif prononcé sur les communautés locales) sur leur aire d'introduction [19].

♦[2]Leur développement proche des voies de communication peut gêner l'accessibilité, la visibilité et la circulation [132]. ♦[3]Leur lutte est exigeante et génère des coûts élevés pour les gestionnaires d'espace concernés [132].

4. UTILISATIONS TRADITIONNELLES

F. japonica est une plante médicinale connue pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, cicatrisantes, anti-infectieuses, antidiabétiques, hepatoprotectives, anti-cancéreuses, antivirales, antibactériennes et antifongiques [133]. Elle est aussi utilisée couramment par les populations asiatiques locales dans l'alimentation quotidienne [134,135].

Ses rhizomes comestibles sont employés le plus souvent. Ils sont inscrits depuis 1977 à la Pharmacopée de la République populaire de Chine sous le nom *Rhizoma Polygoni Cuspidati* [136] Les remèdes traditionnels se composent le plus souvent de ces derniers en mélange avec d'autres végétaux telle que la décoction *Bai Hu Shi Yin* pour guérir l'hépatite aiguë, contenant également des rhizomes de l'impérata cylindrique (*Rhizoma Imperatae*); de la sauge chinoise (*Herba Salviae Chinensis*); ainsi que de l'armoise capillaire (*Herba Artemisiae Capillaris)*. En Asie, ses rhizomes servent pour maintenir l'hygiène buccale et dentaire. *F. japonica* sert également dans de multiples crèmes, huiles, baumes et autres onguents à visée dermo-cosmétique [137,138]. C'est son usage pour traiter les problèmes de peau divers (dermatite atopique tel que le psoriasis ; dermatite infectieuse telle que la teigne ; alopécie du cuir chevelu) qui est le plus courant. Elle sert également d'agent cicatrisant et antiseptique à la suite de graves brûlures et d'agent dépigmentant [122].

Réputée comme riche source de resvératrol antioxydant, la plante est actuellement commercialisée sous forme de complément alimentaire dans de nombreux pays comme les Etats-Unis ou la France [139]. De multiples études phytochimiques ont été réalisées afin d'explorer ses activités biologiques et de mettre en évidence les composés actifs responsables de ses effets. Ces dernières sont résumées dans la section suivante.

5. CHIMODIVERSITE

Les *métabolites primaires* constitutifs de *F. japonica* sont présentés (*Tableau 1*). Les polysaccharides non-cellulosiques de ses feuilles mais aussi celles de *F. sachalinensis* et *F.× bohemica* se sont révélés antioxydants [140]. Les feuilles de *F. japonica* ont une teneur en poids de 63,4% en cendres, lignine, acides uroniques, α-cellulose et protéines [140] et ses rhizomes contiennent des acides aminés majoritaires tels l'arginine, le tryptophane et la proline [141].

Tableau 1. Métabolites primaires décrits chez F. japonica. Les organes concernés sont précisés entre parenthèses.

Lipides	Glucides	Protéines	Acides aminés
Acides gras [142] *(Rhizomes, Racines)* Palmitique, stéarique, arachidique Phytostérols β-sitostérol	Polysaccharides [142] *(Rhizomes, Racines)* *D*-glucose, *D*-galactose, *D*-mannose Glucomannane, pectine [140] *(Feuilles)* Sucres simples [140]*(Feuilles)* Galactose, glucose, arabinose, xylose, rhamnose Dérivés [140,141] *(Rhizomes, Feuilles)* Acide uronique, acide galacturonique, vitamine C ou acide ascorbique, acide malique, acide tartrique, acide citrique Sucres complexes [140] *(Feuilles)* α-cellulose, hémicellulose, xyloglucane Autres Galloyl glucose, caffeoyl-glucose	Protéines totales *(Feuilles)* [140]	*(Rhizomes)* Acide aspartique, acide glutamique, valine, leucine, isoleucine, lysine, thréonine, phénylalanine, histidine, sérine, proline, glycine, alanine, tyrosine, arginine, tryptophane [141]

F. japonica possède de nombreuses propriétés biologiques & thérapeutiques, principalement dues à l'immense variété de ses *métabolites spécialisés* [133,134]. Les travaux antérieurs menés portent notamment sur sa partie racinaire, très utilisée en médecine traditionnelle. Les extraits bruts étudiés ont été essentiellement obtenus par macération avec ou sans agitation ou ultrasons. Les solvants employés le plus généralement étaient aqueux et/ou alcooliques. Son applicabilité à l'aide de modèles *in vitro* et/ou *in vivo* est soulignée dans le *Tableau 2*.

Les extraits bruts (*Tableau 2*) avaient principalement des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, cicatrisantes, antimicrobiennes, antidiabétique [143], antivirales, antiprolifératives ainsi qu'anti-cancéreuses. Certains se révélaient aussi antiglycoxydant, analgésique, gastro-ou oculo-protecteur, anti-cholinestérase ou même œstrogénique [134]. Un extrait aromatique issu de ses feuilles [144], contenant les volatils majeurs 2-hexénal (73,4%), 3-hexène-1-ol (7,0%), *n*-hexanal (2,8%), 1-pentène-3-ol (2,6%), 2 -pentène-1-ol (2,2%) et éthyl vinyl cétone (1,1%), possédait également des propriétés antibactériennes.

Les études menées ont permis d'identifier les différentes classes moléculaires présentes dans les extraits totaux produits. Les principales sont les *classes des stilbénoïdes, des quinones et des flavonoïdes* (décrites dans les sections suivantes). Les autres composés identifiés étaient des coumarines telles que la coumarine et la 7-hydroxy-4-methoxy-5-methylcoumarine, des lignanes comme le sodium (-)-lyoniresinol-2a-sulfate et le sodium (+)-isolaricireinol-2a-sulfate, des dérivés d'acides hydroxycinnamiques tels que les vanicosides A et B ou encore des dérivés de naphtalènes avec la torachrysone et hétérosides associés [133] (voir *Annexe 1*). Une vingtaine de caroténoïdes & pigments comme la violaxantine, la lutéine, la chlorophylle b ou encore le *β*-carotène [145] ou encore des proanthocyanidines, appartenant à la classe des tanins condensés [146,147] ont été trouvés.

D'autres travaux *in vitro* et/ou *in vivo* ont été réalisés sur des composés isolés ou purifiés ou sur des standards commerciaux de molécules présentes dans la plante. Ils complètent les résultats des tests d'activités biologiques préliminaires observés sur les extraits bruts totaux (*Tableau 2*). Ils concernent en majorité les deux stilbénoïdes resvératrol et polydatine ainsi que leurs dérivés, les quinones comme l'émodine et dérivés ou également les flavonoïdes tels que la catéchine & dérivés. De nombreuses activités biologiques ont ainsi été explorées notamment antioxydante, cardioprotectrice, anti-inflammatoire, antimicrobienne, antidiabétique antivirale, anti-cancéreuse ou encore anti-âge [134,148,149]. L'activité anti-tyrosinase a révélée des résultats contradictoires, en particulier pour le resvératrol et la polydatine, demandant à être complétée. En revanche, aucune étude n'a été trouvée sur ses potentielles activités anti-hyaluronidase, anti-collagénase ou même anti-élastase.

Concernant sa toxicité, il a été rapporté dans un test mené *in vivo*, que l'administration orale d'anthraquinones (9 g/kg) ne causait pas la mort chez la souris. Il n'y a pas eu d'hémolyse *in vitro* ni de réaction d'agglutination (0,39 mg/mL), d'anaphylaxie systémique ou d'allergie cutanée passive (5,6 mg/kg). Cependant, l'injection de polydatine pourrait induire une péritonite dose-dépendante dans un test de toxicité subaiguë [133].

Tableau 2. Travaux antérieurs réalisés sur F. japonica (3 pages).

Nombre et/ou nom(s) de molécule(s) identifiée(s) (*classe moléculaire*)	Activité biologique observée	Type d'extrait	Organe(s) (*Provenance*)	Référence(s)
Activités réalisées sur extraits bruts				
18 (*volatils*)	Antibactérienne	Extrait aromatique	Feuilles (*Corée*)	[144]
(*alcaloïdes, stérols, terpènes, tannins, flavonoïdes, carbohydrates*)		Extrait MeOH	Racines (*Corée*)	[150]
(*stilbènoïdes, quinones*)		Extrait MeOH/eau (80/20)	Racines (*Chine*)	[151]
(*quinones*)		Extrait heptane	Racines (*Chine*)	[152]
(*stilbènoïdes, quinones*)	Antibactérienne Inhibitrice (acide glycolytique et glucosyltransférase)	Extrait MeOH	Racines (*Corée*)	[153]
17 (*stilbènoïdes, quinones*)	Antibactérienne, Cytotoxique	Extrait Acétone/eau (70/30)	Rhizomes (*Pologne*)	[154]
	Antifongique	Extrait aqueux Extrait Acétone Extrait MeOH Extrait EtOH 96%	Feuilles, rhizomes (*Slovénie*)	[155]
32 (*flavonoïdes et volatils*)	Antimicrobienne, Antioxydante (DPPH)	Extrait AcOEt	Racines (*Chine*)	[156]
(*stilbènoïdes, flavonoïdes*)	Antimicrobienne, Cytotoxique Antioxydante (DPPH, sur cellules) Antidiabétique (α-amylase)	Extrait EtOH 96%	Rhizomes et Fleurs (*Slovénie*)	[143]
(*stilbènoïdes*)	Antiglycoxydante Antidiabétique/hypoglycémiante	Extrait Acétone/eau (70/30)	Rhizomes (*Pologne*)	[157]
(*acides phénoliques, flavonoïdes*)	Antioxydante (DPPH) Anti-cholinestérase	Extrait MeOH/eau (70/30)	Rhizomes, tiges, feuilles et fleurs (*Serbie*)	[158]
	Antioxydante (DPPH)	Extrait EtOH	Racines (*Chine*)	[159]
171 (*stilbènoïdes, flavonoïdes, quinones, tannins*)		Extrait Acétone/eau (70/30)	Rhizomes (*Pologne*)	[160]
(*stilbènoïdes*)		Extrait EtOH 96%	Plante entière	[161]
		Extrait MeOH	Rhizomes (*Roumanie*)	[162]
	Antioxydante (DPPH, chimiluminescence, ABTS)	Extrait aqueux acidifiée Extrait EtOH acidifié Extrait *n*-butanol	Feuilles, rhizomes, tiges et fleurs (*Slovénie*)	[163]
41 (feuilles), 42 (tiges), 41 (racines) (*stilbènoïdes, acides phénoliques, flavonoïdes*)	Antioxydante (ABTS, ORAC)	Extrait AcOEt/hexane (50/50)	Feuilles, tiges et racines (*Pologne*)	[164]
(*stilbènoïdes, quinones*)	Antioxydante (DPPH) Perméation transmembranaire	Extrait MeOH à chaud	Racines (*Chine*)	[165]
(*stilbènoïdes*)	Antioxydante (FRAP) Anti-inflammatoire	Extrait EtOH	Racines (*Chine*)	[166]
(*stilbènoïdes*)	Antioxydante (sur cellules) Anti-inflammatoire	Extrait commercial	Racines et rhizomes	[167]
31 (*stilbènoïdes, quinones*)	Anti-inflammatoire	Extrait MeOH, Extrait EtOH	Racines et rhizomes (*Chine*)	[168]
(*stilbènoïdes, quinones*)	Antioxydante (SOD, GSH, CAT) Activité de cicatrisation Effets gastroprotecteurs	Extrait EtOH/eau (30/70) à chaud	Racines (*Corée*)	[169]
	Activité de cicatrisation	Extrait EtOH/eau (50/50)	Plante entière (*Chine*)	[170]
54 (*classes des stilbènoïdes, flavonoïdes, quinones, tannins*)	Activité de cicatrisation	Extraits EtOH/eau (25/75 et 40/60) Extrait Acétone/eau (60/40) Extrait MeOH/eau (80/20)	Rhizomes (*Pologne*)	[171]
	Anti-inflammatoire, Analgésique	Extrait AcOEt	Rhizomes (*Corée*)	[172]

	Antioxydante (DPPH) Antiproliférative Anti-cancéreuse	Extrait EtOH Extrait AcOEt tamponné	Racines (*Chine*)	[173]
(*stilbènoïdes*)	Anti-cancéreuse	Extrait EtOH/eau (75/25)	Plante entière (*Chine*)	[174]
	Anti-inflammatoire, Analgésique	Extrait AcOEt	Rhizomes (*Corée*)	[172]
	Antivirale	Décoction aqueuse Décoction EtOH	Plante entière	[175]
(*quinones*)		Extrait EtOH à chaud	Racines (*Chine*)	[176]
25 (*stilbènoïdes, quinones, esters d'acides hydroxycinnamiques, flavonoïdes, tannins*)	Antivirale, Inhibitrice SARS-CoV-2 Mpro enzyme (COVID-19)	Extrait Acétone/eau (70/30)	Rhizomes (*Pologne*)	[177]
(*stilbènoïdes*)	Effets régulateurs des lipides (ACAT, LPS, iNOS, COX-2)	Extrait aqueux Décoction aqueuse	Racines, plante entière (*Corée*)	[178,179]
(*stilbènoïdes*)	Anti- infections des voies respiratoires	Remède à base d'un mélange d'herbes *Hu Zhang*	Racines et rhizomes	[180]
(*stilbènoïdes, acides phénoliques, flavonoïdes*)	Effets protecteurs santé oculaire	Décoction aqueuse	Partie aérienne (*Corée*)	[181]
(*quinones*)	Oestrogénique	Extrait EtOH/eau (70/30)	Racines (*Chine*)	[182]
Activités réalisées sur des molécules isolées/purifiées ou standards commerciaux				
Classe des stilbénoïdes				
Resvératrol	Antioxydante, Anti-inflammatoire Effets régulateurs des lipides, Cytotoxique, Apoptotique, Anti-cancéreuse, Antivirale Neuroprotectrice Antiproliférative, Anti-âge Anti-tyrosinase, Anti-angiogénique Cardioprotectrice, Nutraceutique	Divers	Divers	[77,183–189]
Resvératrol-4-*O*-*D*-(2′-galloyl)-glucopyranoside	Anti-cancéreuse, Apoptotique	Extrait EtOH/eau (70/30) à chaud	Racines (*Chine*)	[190]
Resvératrol 4-*O*-*D*-(2′-galloyl)-glucopyranoside Resvératrol 4-*O*-*D*-(6′-galloyl)-glucopyranoside	Antimicrobienne	Extrait MeOH/eau (70/30)	Plante entière (*Pérou*)	[191]
Polydatine	Antioxydante, Neuroprotectrice Effets régulateurs des lipides Anti-choc endotoxique, Hépatoprotectrice Anti-tyrosinase (inhibition mélanogenèse), Apoptotique, Anti-cancéreuse Anti-inflammatoire, Antivirale Antimicrobienne, Anti-artériosclérose Effets immunorégulateurs, Antidiabétique Cardioprotectrice	Divers	Divers	[192–200]
Polyflavanostilbene A	Antidiabétique (α-glucosidase)	_	Rhizomes	[201]
Resvératrol malonyl hexoside	Antioxydante (DPPH)	Extrait aqueux Extrait MeOH Extrait MeOH/eau (80/20) Extrait Acétone Extrait Acétone/eau (70/30) Extrait EtOH Extrait EtOH/eau (70/30) Extrait AcOEt/eau (90/10)	Rhizomes (*Slovénie*)	[202]
Resvératrol, Polydatine-2′-*O*-gallate, Polydatine	Anti-cancéreuse	Extrait AcOEt Extrait MeOH	Racines (*Chine*)	[203]
Trans-resvératrol, Polydatine, Sodium *trans*-resvératrol-3-*O*-β-*D*-glucopyranoside-6′′-sulfate, Sodium *trans*-resvératrol-3-*O*-β-*D*-glucopyranoside-4′′-sulfate, Sodium *trans*-resvératrol-3-*O*-β-*D*-glucopyranoside-2′′-sulfate, Sodium *trans*-resvératrol-3-*O*-β-*D*-glucopyranoside-4′-sulfate, Sodium *trans*-resvératrol-3-*O*-β-*D*-	Antivirale, Cytotoxique	Etrait EtOH/eau (70/30) à chaud	Racines (*Chine*)	[204]

glucopyranoside-5sulfate, Sodium *trans*-resvératrol-3-*O*-ß-*D*-glucopyranoside4'-sulfate				
Classe des quinones				
Physcion, Emodine, Citréoroséine, Anthraglycoside B	Anti-tyrosinase	Extrait EtOH	Plante entière (*Chine*)	[205]
Emodine, Emodine-8-*O*-ß-*D*-glucopyranoside	Oestrogénique	Extrait MeOH	Racines (*Japon*)	[206]
Emodine	Antibactérienne Anti-cancéreuse, Cytotoxique Antivirale, Anti-tyrosinase	Divers	Divers	[78,152,207,208]
Emodine 8-*O*-ß-*D*-glucoside	Neuroprotectrice, Antioxydante		Plante entière (*Chine*)	[209]
2-éthoxystypandrone ou 2-ethoxy-6-acetyl-7-methyl-juglone, Citreoroséine	Anti-cancéreuse	Extrait AcOEt, Extrait MeOH	Racines (*Chine*)	[203]
Classe des flavonoïdes				
(-)-épicatéchine	Antioxydante (DPPH)	Extrait aqueux Extrait MeOH Extrait MeOH/eau (80/20) Extrait Acétone Extrait Acétone/eau (70/30) Extrait EtOH Extrait EtOH/eau (70/30) Extrait AcOEt/eau (90/10)	Rhizomes (*Slovénie*)	[202]
Catéchine-3-*O*-gallate	Anti-cancéreuse	Extrait AcOEt, Extrait MeOH	Racines (*Chine*)	[203]
(+)-catéchine, (+)-catéchine-7-*O*-ß-*D*-glucopyranoside, (-)-épicatéchine-5-*O*-ß-*D*-glucopyranoside, Isotachioside, Tachioside	Antivirale, Cytotoxique	Etrait EtOH/eau (70/30) à chaud	Racines (*Chine*)	[204]
Autres classes				
Torachrysone-8-*O*-ß-*D*-glucopyranoside 4,6-dihydroxybenzofuran-3-one	Anti-cancéreuse	Extrait AcOEt Extrait MeOH	Racines (*Chine*)	[203]
(-)-lyoniresinol-2A-sulfate, Sodium (+)-isolaricireinol-2A-sulfate, Acide chlorogénique, 5,7-dimethoxyphthalide, Sodium 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoic acid methyl ester-4-sulfate, 1-(3-*O*-ß-*D*-glucopyranosyl-4,5-dihydroxyphenyl)-éthanone	Antivirale, Cytotoxique	Etrait EtOH/eau (70/30) à chaud	Racines (*Chine*)	[204]

Dans une étude antérieure menée sur le complexe d'espèces *Fallopia* [115], il a été montré que les hybrides *F. x bohemica* avaient des profils de métabolites spécialisés proches de *F. japonica*. Ces hybrides exprimaient les classes de composés décrites chez *F. japonica* et chez *F. sachalinensis* avec néanmoins des différences quantitatives. Une grande diversification des armes chimiques a pu être observés chez les hybrides. D'autre part, trois dianthrones (emodine dianthrone, fallopion, physcion dianthrone) avaient pu être mis en évidence chez *Fallopia* spp. plus fortement exprimées chez *F. japonica* et *F. x bohemica*. Ces travaux avaient ainsi suggéré une évolution des traits chimiques des divers taxons dans les zones envahies.

a) LA CLASSE DES STILBENOIDES

Dans le règne végétal, cette classe se retrouve par exemple chez les Vitacées comme *Vitis vinifera* ou encore chez les Polygonacées comme *F. japonica*. Les stilbénoïdes sont souvent considérés comme étant des phytoanticipines et des phytoalexines (composés de défense en réponse à un stress) [210]. Du grec *stilbos* signifiant *briller* [211], ces composés phénoliques de type 1,2-diphényléthylène, ont une forte absorbance à des longueurs d'onde comprises entre 220 et 307 nm. Ils sont formés de deux noyaux phényles reliés entre eux par un double pont éthène pouvant exister sous les forme *cis* (Z) ou la forme *trans* (E), généralement considérée comme la plus table et bioactive. Ces dernières peuvent être par exemple liées à des hétérosides amenant ainsi à une grande diversité structurale [210].

Le resvératrol (3,5,4'-trihydroxystilbène), est sans doute le stilbène le plus connu, largement étudié pour ses multiples activités biologiques et thérapeutiques. Il s'agit par exemple d'un antioxydant puissant, d'un agent aussi bien cardio-protecteur, anti-cancéreux, qu'antimicrobien [77,133,187,212]. Les principaux stilbènes identifiés et/ou isolés au sein de *F. japonica* sont présentés *Figure 26* [133]. Il a été montré dans une étude antérieure que des extraits éthanoliques de ses racines, obtenus par macération assistée par ultrasons, avaient des teneurs respectives en resvératrol et polydatine de 3,5 mg/g et 9,2 mg/g de matière sèche [139].

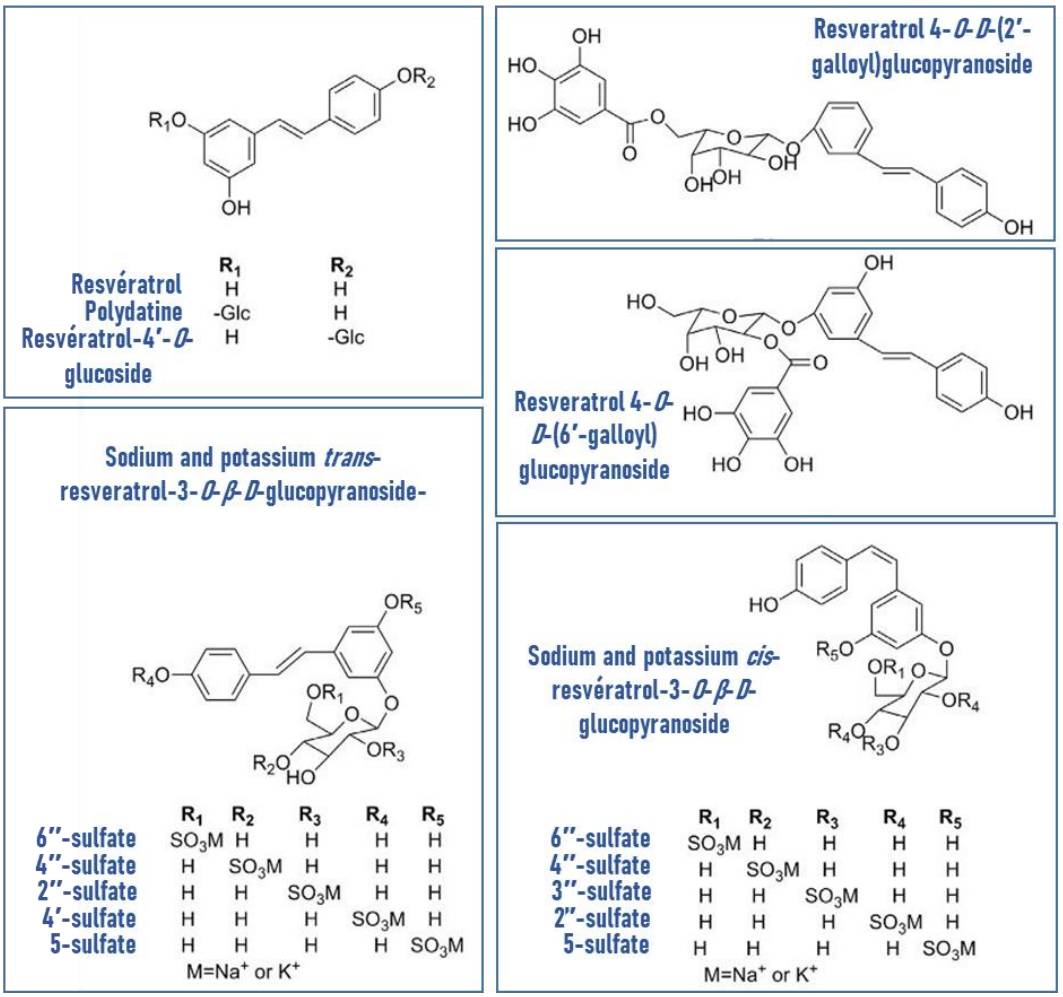


Figure 26. Principaux stilbènes identifiés ou isolés de F. japonica, adaptée de [133]. Glc = glucose.

b) LA CLASSE DES QUINONES

Les quinones sont constituées d'un noyau benzénique sur lequel deux atomes d'hydrogène sont remplacés par deux atomes d'oxygène, formant deux liaisons carbonyle. Elles existent dans la nature sous de nombreuses formes telles que les benzoquinones, les naphtoquinones, les anthraquinones, phylloquinones et les quinones polycycliques [213,214].

La première étude portant sur les quinoïdes et dérivés isolés et identifiés de *F. japonica* date des années 1950 [215]. La plupart d'entre elles sont des anthraquinones dont la plus connue est l'émodine, possédant de forts propriétés anti-cancéreuses, antimicrobiennes, antivirale ou encore cytotoxique [216]. L'émodine ainsi que les anthraquinones physion, citréoroséine ou encore l'anthaglycoside B ont également présenté une activité anti-tyrosinase intéressante. L'émodine-8-*O*-ß-*D*-glucoside a quant à elle montré des effets neuroprotecteurs et antioxydants importants. Ou encore l'émodine-8-*O*-ß-*D*-glucopyranoside avait une capacité œstrogénique. Les différentes quinones retrouvées chez *F. japonica* sont présentées ci-dessous *Figure 27* [115,133].

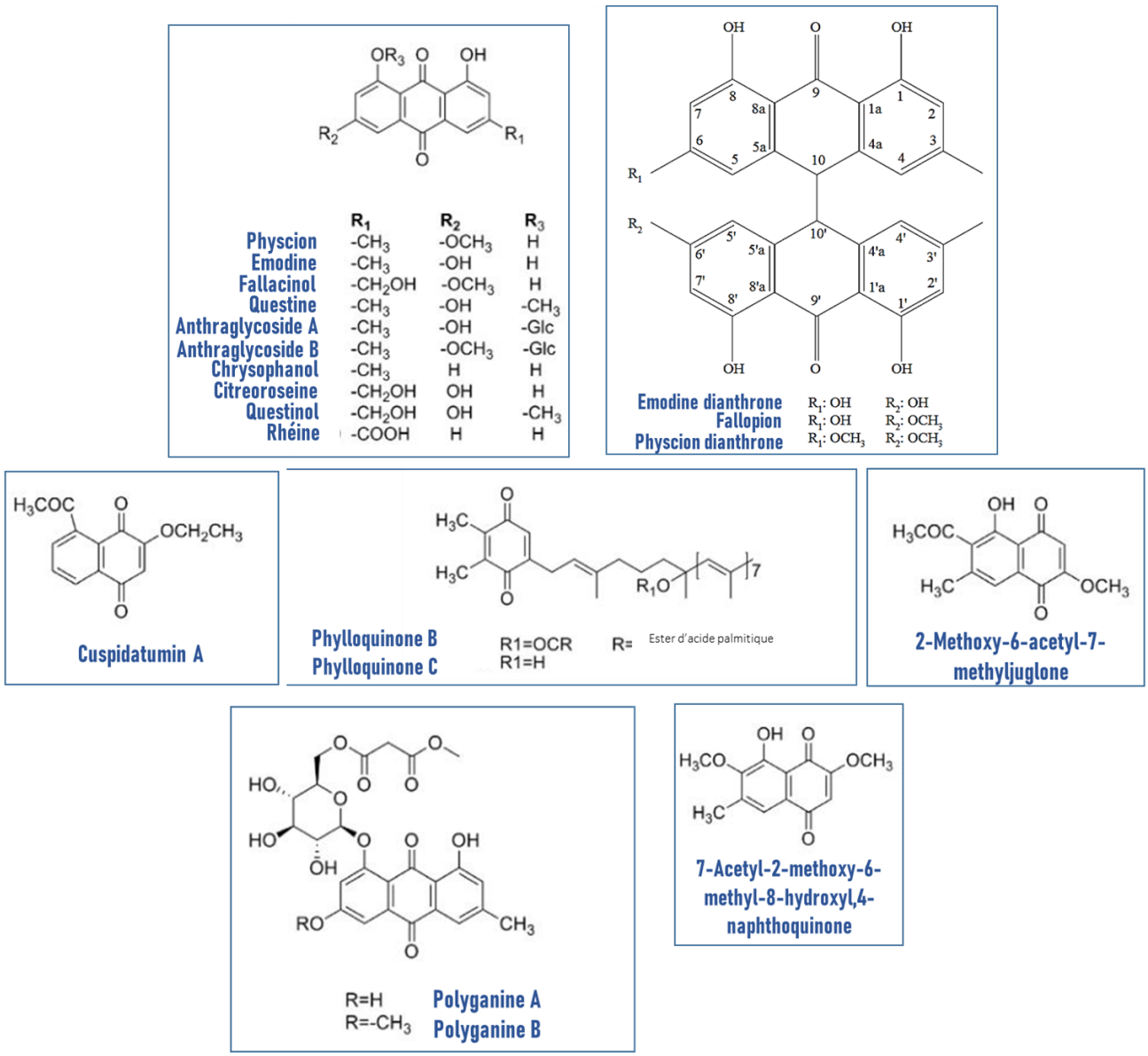
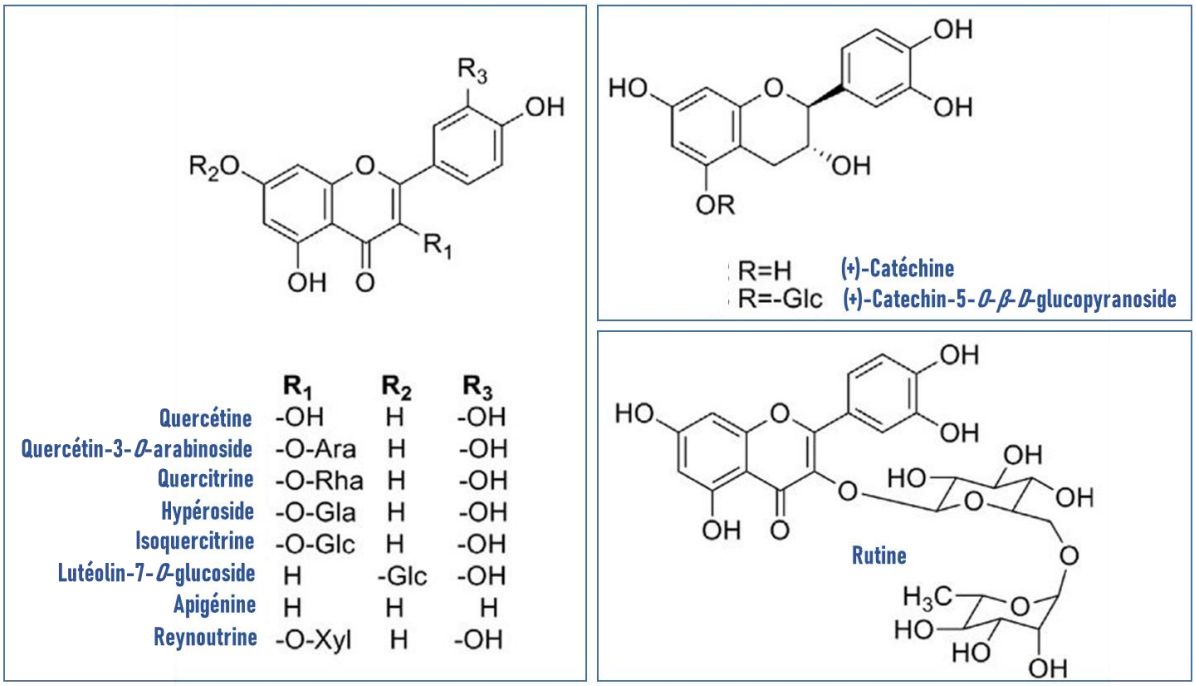


Figure 27. Principales quinones identifiées ou isolées de F. japonica, adaptée de [115,133]. Glc = glucose.

c) LA CLASSE DES FLAVONOIDES

Les flavonoïdes appartiennent à la grande famille des polyphénols et présentent généralement un fort caractère antioxydant. Ils se caractérisent par un degré élevé de diversité chimique fourni par des modifications du squelette initial. Ils ont tous le même élément structural de base à savoir deux cycles benzéniques reliés par une chaîne linéaire de 3 carbones constituant souvent un troisième cycle. Ils se divisent en plusieurs sous-classes principales, selon ce troisième cycle [217].

Les principaux flavonoïdes identifiés et/ou isolés chez *F. japonica* sont regroupés *Figure 28* [133]. Il y a par exemple la quercétine et ses dérivés glycosylés (quercitrine et rutine) qui sont des ♦*flavonols* avec un squelette 3-hydroxy-2-phényl chromén-4-one , la catéchine et ses dérivés qui sont des ♦*flava-3-nols* , ou encore la lutéoline et l'apigénine et leurs dérivés qui sont des ♦*flavones* avec un squelette 2-phénylchromén-4-one. Les flavonoïdes présents chez *F. japonica* ont notamment présenté des propriétés antioxydantes, antivirales et anti-cancéreuses [133,134].



	R_1	R_2	R_3
Quercétine	-OH	H	-OH
Quercétin-3-*O*-arabinoside	-O-Ara	H	-OH
Quercitrine	-O-Rha	H	-OH
Hypéroside	-O-Gla	H	-OH
Isoquercitrine	-O-Glc	H	-OH
Lutéolin-7-*O*-glucoside	H	-Glc	-OH
Apigénine	H	H	H
Reynoutrine	-O-Xyl	H	-OH

Figure 28. Principaux flavonoïdes identifiés ou isolés de F. japonica, adaptée de [133].

Ara = arabinose ; Rha = rhamnose ; Gla = galactose ; Glc = glucose ; Xyl = xylose.

C. PRESENTATION D'*AMBROSIA ARTEMSIIFOLIA*

1. DESCRIPTION BOTANIQUE

♦ **Origine** Amérique du Nord

♦ **Genre** *Ambrosia*

♦ **Famille** *Asteraceae* [118]

♦ **Noms vernaculaires**

Ambroisie à feuilles d'armoise, Petite herbe à poux du Canada (France), Common ragweed (Amérique)

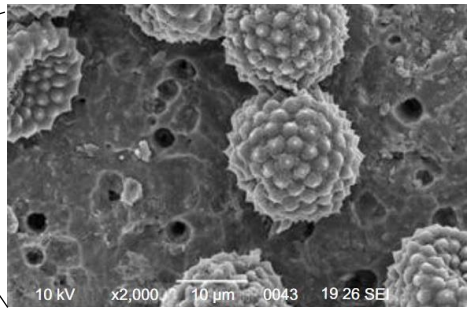
♦ **Caractéristiques**

Plante dressée, annuelle, monoïque, velue ou pubescente, formant de véritables buissons. Herbacée de 20 cm à plus d'1 m. Ligneuse à la base et rameuse dans le haut.

♦ **Mode de reproduction**

Pollinisation anémophile, 3000 graines, 1 milliard de grains de pollen par an libérés des anthères à la mi-août et mesurant 20 - 25 µm de diamètre pour un volume de 8000 μm^3 et un poids de 10 ng (*Figure 29*). Portée par le vent d'environ 100 km. D'autres grains, isolés dans les hautes altitudes, pourront quant à eux être transportés sur plusieurs centaines de km.

Figure 29. Image MEB de pollen extraite de l'article de M. Turkalj et collaborateurs relatif à la rhinite allergique [543].



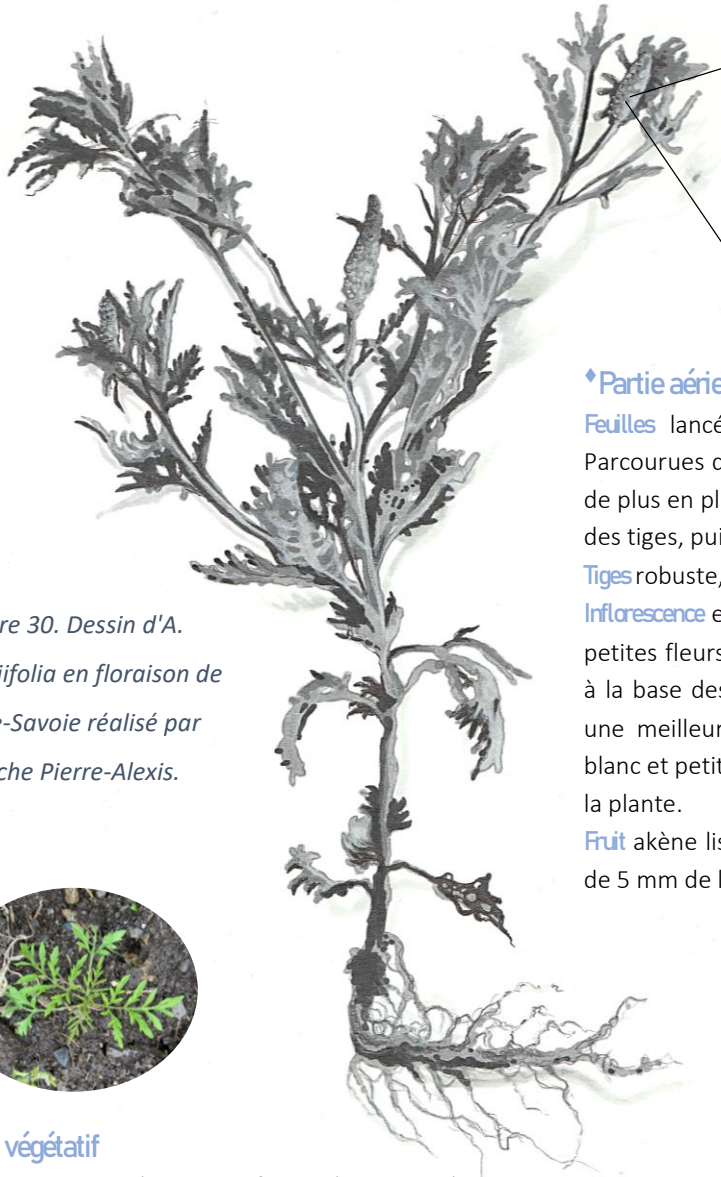


Figure 30. Dessin d'A. artemisiifolia en floraison de Haute-Savoie réalisé par Letiche Pierre-Alexis.

♦ **Partie aérienne**

Feuilles lancéolées, vertes, pubescentes ou presque glabres. Parcourues de nervures blanchâtres qui se divisent en segments de plus en plus nombreux. Minces, opposées décussées à la base des tiges, puis alternes.

Tiges robuste, ramifiée, sillonnée et souvent rougeâtre.

Inflorescence en chandelier, constituée de nombreux capitules de petites fleurs unisexuées verdâtres. **Capitules femelles** peu visibles, à la base des feuilles supérieures sous les capitules mâles pour une meilleure rentabilité de reproduction. **Capitules mâles** vert-blanc et petits, disposés en épis terminaux dressés au sommet de la plante.

Fruit akène lisse et cylindrique avec 5 à 6 épines courtes marron de 5 mm de long.

♦ **Partie racinaire**

Racine pivotante, grêle, très résistante ce qui rend son arrachage dif-ficile lorsque la plante commence à être haute.



♦ **Cycle végétatif**

Germination en avril-mai sous forme de jeunes plants. De juillet à la mi-août, croissance vigoureuse. Floraison (*Figure 30*) à partir de juillet jusqu'en octobre et production de graines en octobre-novembre. Disparaît vers décembre, devient terne et marron.

♦ **Risque de confusion**

Avec *A trifida* Avec *A psilostachya*

Avec Armoise vulgaire (*Artemisia vulgaris*)

Avec Armoise annuelle (*Artemisia annua*)

2. ORIGINE DE SON INTRODUCTION & REPARTITION GEOGRAPHIQUE

A. artemisiifolia a été fortuitement introduite en France dans les années 1860. C'est par la culture du trèfle violet (*Trifolium pratense*) qu'elle a atteint l'Europe, contaminant leurs graines par ses akènes. Elle n'a ensuite cessé de se propager à travers les continents européen, asiatique et océanique [218]. Elle est aujourd'hui naturalisée dans le couloir rhodanien. L'augmentation de son aire de répartition est conditionnée par un certain nombre de facteurs comme l'évolution des pratiques agricoles ou le changement climatique [14,219,220].

A. artemisiifolia possède une grande résistance à la salinité [221]. C'est pourquoi elle prospère principalement dans les habitats ouverts perturbés où les terres ont été retournées, les terrains vagues en friches, les champs agricoles, les jachères, les bords de route et le long des voies ferrées, les chantiers de construction, les zones de remblais et accotements routiers, ainsi que les bancs de graviers des rivières (*Figure 31*). Cette espèce à faible compétitivité, se contente ainsi d'espaces dédaignés par la majorité des espèces végétales car ces espaces sont riches en chlorure de sodium [33,218].



Figure 31. A. artemisiifolia présente dans les deux Savoies en bord de route dans la commune d'Hauteluce (A) ; et dans des terrains agricoles des communes de Cruet et de la Motte-Servolex (respectivement B et C).

3. IMPACTS NEGATIFS SANITAIRES, ENVIRONNEMENTAUX ET ECONOMIQUES

A. artemisiifolia provoque des conséquences négatives ♦[1]sanitaires, ♦[2]environnementales et ♦[3]économiques [218,220,222].

♦[1]Il s'agit d'une espèce particulièrement allergisante qui occasionne des réactions allergiques massives chez l'Homme se traduisant par des manifestations respiratoires, cutanées et oculaires [223–225]. C'est la plus dangereuse d'Europe, produisant une très grande quantité de pollen, emporté par le vent. L'espèce est d'ailleurs

souvent qualifiée de polluant biologique, responsable d'une pollution de l'air atmosphérique ou d'une pollution pollinique [226]. Le déplacement de véhicules, de terre contaminées ou de graviers, d'épandages de compost, ayant été en son contact ou en contenant peuvent être des vecteurs de dispersion. *A. trifida* et *A. psilostachya* sont aussi toutes deux allergènes. La quasi-totalité de France est impactée par ce fléau avec une très forte concentration de l'espèce dans la région Auvergne-Rhône-Alpes (les régions lyonnaise et grenobloise, la vallée du Rhône, le pays Roannais et les Savoies) [33]. Actuellement, 33 millions de personnes sont sensibilisées en Europe [227].

♦[2]De réels problèmes agronomiques sont en recrudescence, liés à sa concurrence très forte à certaines plantes cultivées. Elle peut présenter des effets inhibiteurs significatifs sur la germination des graines et la croissance primaire des cultures [228,229]. Elle s'adapte à la hauteur de tonte [230], résiste à certains herbicides, domine dans les champs qui ne sont plus cultivés. Elle est fréquemment retrouvée dans les cultures de tournesol, de soja ou de maïs, participant ainsi activement à la dépréciation des rendements agricoles dans ces cultures [222]. Dans les cultures comme le tournesol qui est aussi une *Asteraceae* du même genre, aucun herbicide efficace n'est actuellement disponible. La rotation des cultures doit alors être adaptée afin de réduire au maximum la banque de semences du sol en graines. Dans un travail antérieur, l'huile essentielle de *Nepeta rtanjensis*, contenant de la népétalactone, était particulièrement efficace pour inhiber l'enracinement et la croissance de ses racines ainsi que pour supprimer l'activité de la superoxyde dismutase [231]. Il a également été montré que *S. canadensis* pouvaient inhiber sa germination [118].

♦[3]En Auvergne-Rhône-Alpes, 10 à 15% de la population est potentiellement allergique à l'ambroisie, générant des coûts médicaux estimés à 40,6 millions d'euros par an pour cette seule région A selon l'Observatoire Régional de la Santé Rhône-Alpes (ORS). La lutte contre cette espèce et sa surveillance (télédétection) sont une priorité. Sa destruction a d'ailleurs été rendue obligatoire par arrêté préfectoral dans plusieurs départements français. Bien médiatisée, cette plante mobilise depuis quelques années toutes les structures institutionnelles nationales et régionales ainsi que tous les acteurs des communes concernées par sa présence [232].

4. UTILISATIONS TRADITIONNELLES

Dans la mythologie gréco-romaine, l'*ambroisie* était une eau primordiale huileuse servant aux dieux de boisson, de nourriture et d'onguent ; leur conférant ainsi l'immortalité [233]. *A. artemisiifolia* est une herbe médicinale appréciée par les amérindiens pour ses effets thérapeutiques pluriels.

Ses feuilles étaient utilisées comme désinfectant, antiseptique [234], fébrifuge, vermifuge [235], pour les maladies de peau ou celles pulmonaires. Ses sommités fleuries servaient d'anti-diarrhéique, d'astringent ou d'antiémétique. En infusion, *A. artemisiifolia* s'employait pour le traitement des éruptions cutanées, les irritations du cuir chevelu ou encore les gonflements liés aux rhumatismes et douleurs articulaires. Ses racines s'utilisaient

comme aide gynécologique dans les troubles menstruels ou pour éviter les attaques ou accidents vasculaires cérébraux [21].

En République Dominicaine [236], *A. artemisiifolia* faisait partie des 20 plantes médicinales locales les plus prescrites ; poussant à l'état sauvage ou étant cultivés dans les jardins familiaux. Les Indiens employaient ses feuilles pour prévenir les processus inflammatoires de divers blessures [237]. Il a été découvert récemment que le peuple ethnique des Apatani vivant au Nord de l'Inde, l'utilisait très couramment comme ingrédient dans la préparation d'un sel brunâtre-noir ethnomédicinal nommé *Gonde Unio* [238].

Bien qu'*A. artemisiifolia* présente des propriétés intéressantes en santé humaine, les études phytochimiques antérieures menées sur l'espèce explorent principalement son caractère allergisant et rendent compte des molécules majoritairement responsables de cet effet néfaste [222–224,227]. Ces dernières sont résumées dans la section suivante.

5. CHIMODIVERSITE

La constitution en *métabolites primaires* d'*A. artemisiifolia* dont ses principaux allergènes protéiques, est rapportée (*Tableau 3*). Des échantillons de ses différents stades végétatifs [237,239,240], ont mis en évidence leurs compositions en éléments nutritifs. Les résultats moyennés des échantillons ont révélé des teneurs en cendres, lipides, fibres de cellulose ou glucides et en protéines respectivement de 11,4%, 1,5%, 30,3% et 12,0%.

Tableau 3. Métabolites primaires décrits chez A. artemisiifolia. Les organes concernés sont précisés entre parenthèses.

Lipides	Glucides	Protéines	Acides aminés
Acides gras [241,242] *(Plante entière en fleurs)* Alcools aliphatiques [242] *(Plante entière en fleurs)* Phytostérols [243] ß-sitostérol, stigmastérol, ambrosinal A, ambrosinal B [244] Lipides divers [245] *(Pollen)* Riche en huile [237] *(Graines)* Matière grasse brute [237] *(Plante entière à différents stades végétatifs)*	Carbohydrates divers [245] *(Pollen)* Glucides totaux [237] *(Plante entière à différents stades végétatifs)*	Endopeptidase [246] *(Pollen)* (Enzyme de type protéolytique catalysant l'hydrolyse de la liaison peptidique qui unit les acides aminés à l'intérieur de la chaîne polypeptidique) Protéines diverses et acides nucléiques [245] *(Pollen)* 52 protéines dont 22 identifiées comme allergènes [224,247] *(Pollen)* Protéines allergènes (Amb1-Amb10, CCD, CPI et protéases) [223] *(Pollen)* Protéines totales [237] *(Plante entière à différents stades végétatifs)*	Aminoacides divers [248] *(Pollen)*

Les allergènes moléculaires majeurs identifiés de son pollen sont des protéines à capacité de liaison aux immunoglobulines E à savoir Amb a1 et Amb a2, appartenant à la famille des pectate-lyases. *A. artemisiifolia*

contient également d'autres types d'allergènes comme les protéines de transfert lipidique, profilines ou polcalcines dont certains peuvent être glycosylés (Amb a3, Amb a4, Amb a7). Par ailleurs, les allergènes (Amb a1, Amb a2, Amb a6 et Amb a10), verraient leur allergénicité ou leur expression modulée par la pollution [223]. D'autres facteurs de stress (polluants atmosphériques, élévations en CO_2 et NO_2, sécheresse) peuvent influer sur l'allergénicité de son pollen [219,249,250].

A. artemisiifolia possède diverses activités biologiques & thérapeutiques, dues à ses *métabolites spécialisés*. Les études antérieures portent notamment sur sa partie aérienne. Très peu de données sont actuellement disponibles sur sa racine et ses potentielles propriétés (*Tableau 4*). Les extraits bruts étudiés de ses organes aériens ont été le plus souvent obtenus par macération classique, à l'aide de solvants aqueux et/ou alcooliques. Ils se sont révélés principalement antioxydants, antimicrobiens, antiparasitaires, fongicides, anti-germinatifs, herbicides ou encore hypolipémiants et hépatoprotecteurs au moyen de tests *in vitro* et/ou *in vivo*. Des solvants plus apolaires tel l'hexane ont également permis d'accéder à la classe des *sesquiterpènes lactones*, marqueurs caractéristiques chez les *Ambrosia* [225]. Ces molécules jouent un rôle majeur dans les réactions de type dermatites de contact, rhinites & autres symptômes du rhume des foins, ou dans ses effets allergisants et irritants. Son *huile essentielle* riche en sesquiterpènes (62,51%), germacrène D (32,92%), *β*-pinène (15,14%), limonène (9,90%) et caryophyllène (4,49%), était antibactérienne, antimycotique [251]. Elle pouvait être également phytotoxique et herbicide. Seuls l'activité anti-germinative et effets allélopathiques ont été explorés sur un extrait brut de ses racines.

L'ensemble des travaux antérieurs effectués ont permis d'identifier plusieurs classes moléculaires. Les principales sont les *classes des acides phénoliques, des flavonoïdes et des sesquiterpénoïdes dont les sesquiterpènes lactones* (décrites dans les sections suivantes) [118]. *A. artemisiifolia* renferme aussi des composés des classes des coumarines comme la scopolétine, des métalloles comme le thiophène et le dithiophène, ou encore des acides organiques à chaîne courte (oxalique, succinique, malique, citrique, lactique). Des composés plus spécifiques à savoir la spermidine et dérivés, appartenant à la classe des phénolamides ont été identifiés dans sa partie aérienne dont son pollen. Les sesquiterpènes lactones ont été particulièrement étudiées de manière isolée ou purifiée (*Tableau 4*) [226,227,252–257]. Elles s'avéraient anti-protozoaires, antiparasitaires, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, hépatoprotectrices, antiprolifératives, anti-cancéreuses et cytotoxiques. Elles étaient aussi herbicides, larvicides et molluscicides. D'autres molécules isolées de ses feuilles, appartenant aux triterpénoïdes (α- et *β*-amyrine acétate) et à la classe des acides phénoliques, avaient une activité intéressante stimulant l'alimentation des insectes *Ophraella communa*, qui aiderait dans le contrôle de l'espèce [43].

Dans une récente étude menée *in vivo* sur des souris [227], il a été montré des effets protecteurs sur le foie et sur le taux de triglycérides lors de la consommation orale d'*A. artemisiifolia*. Cependant, des effets toxiques sur les reins et le cerveau, indiquée par le changement significatif du niveau de carbamides et du poids relatif des organes des mammifères, ont également été trouvés. N'ayant pas été évaluée sur des cellules humaines normales, sa consommation comme plante médicinale ou comme aliment est peu conseillée.

Tableau 4. Travaux antérieurs réalisés sur A. artemisiifolia (2 pages).

Nombre et/ou nom(s) de molécule(s) identifiée(s) (*classe moléculaire*)	Activité biologique observée	Type d'extrait	Organe(s) (*Provenance*)	Référence(s)
Activités réalisées sur extraits bruts				
51 (*volatils*)	Antimicrobienne	Huile essentielle	Partie aérienne en fleurs (*Belgrade*)	[251]
		Percolation EtOH 70%	Partie aérienne (*Roumanie*)	[258]
	Antiparasitaire Fongicide	Extrait aqueux	Feuilles (*Palestine*)	[259]
(*acides phénoliques, coumarines*)	Antimicrobienne, Antifongique Effets allélopathiques	Extrait aqueux	Feuilles (*Corée*)	[260]
(*sesquiterpenoïdes, sesquiterpènes lactones, triterpénoïdes, métalloles, acides phénoliques*)	Effets allélopathiques Anti-germinative	Extrait $CHCl_3$	Racines (*Louisiane*)	[243]
		Extrait aqueux	Feuilles (*Roumanie*)	[228]
60 (*volatils*)		Huile essentielle	Partie épigée (*Géorgie*)	[261]
34 (*volatils*)	Phytotoxique, cytotoxique, bioherbicide	Huile essentielle	Partie aérienne (*Chine*)	[262]
(*acides phénoliques, flavonoïdes, acides organiques, coumarines*)	Herbicide	Extrait aqueux	Feuilles (*Serbie*)	[263]
	Anti-inflammatoire, antiarthritique	Extrait EtOH 80%	Feuilles (*Mexique*)	[264]
29 (*sesquiterpènes lactones*)	(Tests de toxicité)	Extrait Hexane	Purée d'herbes	[227]
(*acides phénoliques, flavonoïdes, coumarines*)	Hypolipidémiante , Hépatoprotectrice	Extrait EtOH 95%	Partie aérienne	[265]
(*acides phénoliques, flavonoïdes, acides organiques*)	Antioxydante (DPPH)	Extrait EtOH/eau (30/70, 50/50 et 70/30) Infusion et Décoction aqueuses	Plante entière (*Roumanie*)	[266]
	Antioxydante (FRAP, DPPH)	Extrait Acétone 70%	Sommets herbacés fleuris (*Serbie*)	[267]
(*acides phénoliques, flavonoïdes, phénolamides*)	Antioxydante (DPPH, ABTS)	Extrait Hexane Percolation EtOH 70%	Pollen (*Serbie*)	[268]
	Antioxydante (SOD, POD, CAT)	Extrait tampon phosphate 50 mM	Feuilles (*Chine*)	[269]
	Antioxydante (GPx, SOD, DPPH)		Feuilles	[270]
Activités réalisées sur molécules isolées/purifiées				
Classe des sesquiterpènes lactones				
Cumanine, Péruvine	Activité hypotensive		Période de bourgeonnement	[265]
Cumanine	Anti-cancéreuse, Anti-protozoaire Anti-inflammatoire	Extrait CH_2Cl_2/MeOH (50/50)	Partie aérienne (*Argentine*)	[271–273]
Psilostachyine C	Anti-cancéreuse, Anti-protozoaire			[272,274,275]
Péruvine	Anti-cancéreuse, Anti-protozoaire Antiparasitaire			[272,276–279]
Péruvine	Irritant, Anti-germinative	Extrait MeOH 80%	Pousses (*Japon*)	[280]
Psilostachyine, Psilostachyine C, Péruvine, Cumanine	Antiprolifération, Cytotoxique, Cytostatique	Extrait CH_2Cl_2/MeOH (50/50)	Partie aérienne (*Argentine*)	[271,272,281]
Psilostachyine A, Psilostachyine C	Anti-cancéreuse, Antimitotique Anti-microtubule	Extrait aqueux	Extrait N35791, *National Cancer Institute Natural products Repository* (*États-Unis*)	[282,283]
Psilostachyine A, Psilostachyine B	Anti-protozoaire, Insecticide			[272,274,277–279,284,285]
Ambrosine, Dihydroambrosine	Antimicrobienne, Génotoxique	Extrait Acétone	Pollen (*Serbie*)	[286]
Ambrosine	Anti-cancéreuse, Molluscicide Effet antiarythmique			[287–290]
Paulitine, Isopaulitine	Anti-cancéreuse, Antimalarique, Cytotoxique			[227]

Isabéline	Antimicrobienne, Herbicide Phytotoxique, Anti-germinative	Extrait MeOH	Plante entière (*Italie*)	[291,292]
Coronopiline	Anti-cancéreuse, Larvicide			[252,293–295]
Dihydrocoronopiline	Antibactérienne			[227,296]
Damsine	Anti-cancéreuse, Anti-protozoaire Antituberculeuse, Antifongique Effet antiarythmique			[227,288]
Isoalantolactone	Anti-cancéreuse, Antibactérienne Larvicide, Antituberculeuse			[226,227,252–257]
Dihydroisoalantolactone	Larvicide			[227,297]
Psilostachyine, Psilostachyine B	Molluscicide	Extrait MeOH	Partie aérienne en fleurs (*Chine*)	[298]
Autres classes				
Acide ambrosique	Irritant, anti-germinative	Extrait MeOH 80%	Pousses (*Japon*)	[280]
α-amyrine acétate, β-amyrine acétate Acide chlorogénique, Acide 3,5-dicaffeoylquinique	Stimulant alimentaire coléoptères	Extrait MeOH	Feuilles *Herbiseed Co.*, semées dans pots (*Angleterre*)	[43]
1α,6β,9β-trihydroxy-5,10-bis-*epi*-eudesm-3-ène-1-*O*-α-*L*-arabinopyranosyl-6-*O*-β-*D*-glucopyranoside 1α,6β,9β-trihydroxy-5,10-bis-*epi*-eudesm-3-ène-6-*O*-β-*D*-glucopyranoside Spermidine et dérivés	Neuroprotective	Extrait EtOH 70%	Plante entière (*Corée*)	[299]
Axillarine	Molluscicide	Extrait MeOH	Partie aérienne en fleurs (*Chine*)	[298]

a) LA CLASSE DES ACIDES PHENOLIQUES

Les acides phénoliques appartiennent à la grande famille des polyphénols, possédant au minimum une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils se caractérisent par ailleurs par leur importante activité antioxydante. Plusieurs composés de cette classe ont pu être identifiés au sein d'*A. artemisiifolia*, principalement dans sa partie aérienne *Figure 32* [260]. Ils sont notamment associés aux propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, herbicides et anti-germinatives ou même hypolipémiantes [268].

Les deux acides chlorogénique et 3,5-dicafféoylquinique (3,5-DCQA) isolés de ses feuilles participer à stimuler l'alimentation d'*Ophraella communa* [43]. Dans ses racines, un ester d'acide caféique a aussi pu être identifié : il s'agit du caféate de méthyle. L'extrait total en contenant présentait une activité anti-germinative corrélée à des effets allélopathiques importants [243].

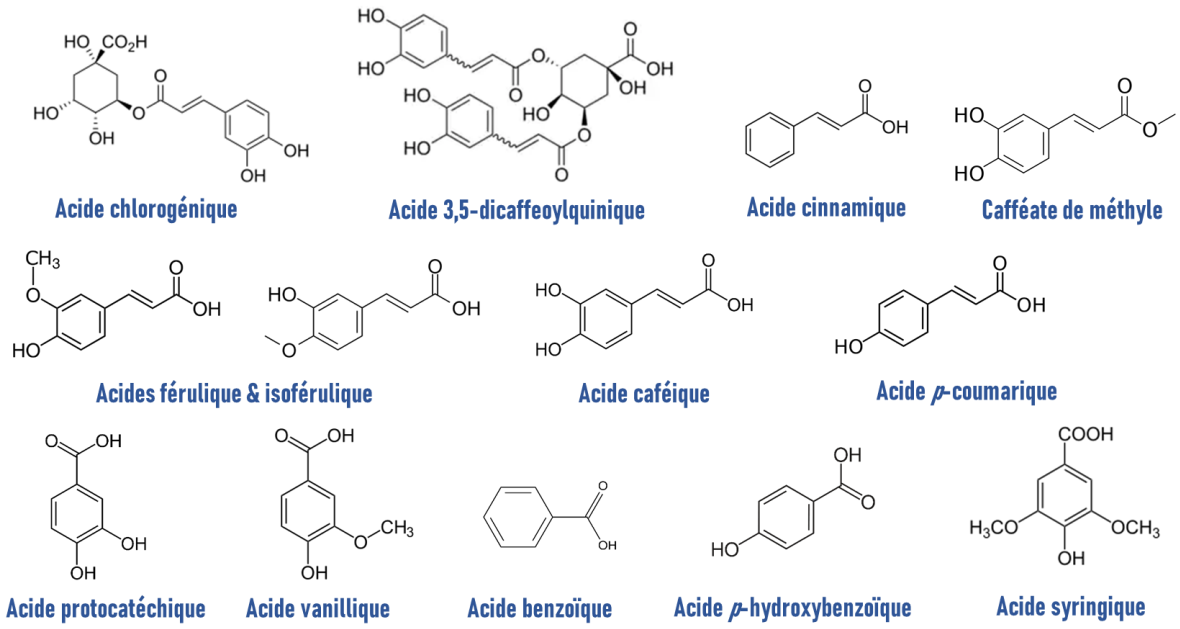


Figure 32. Principaux acides phénoliques identifiés ou isolés de A. artemisiifolia [260].

b) LA CLASSE DES FLAVONOIDES

Les principaux flavonoïdes identifiés et/ou isolés chez *A. artemisiifolia* sont regroupés *Figure 33* [217]. Sont présentes différentes sous-classes telles que les ♦*flavonols* (*ex :* quercétine, isorhamnétine, kaempférol et leurs dérivés), les ♦*flavones* (*ex :* lutéoline, apigénine) ou encore les ♦*flavanones* (*ex :* naringénine) [217]. Au vue des tests d'activités biologiques et thérapeutiques réalisés dans les travaux antérieurs (*Tableau 4*), ils semblent participer aux activités globales antioxydantes, herbicides et hypolipidémiantes des extraits bruts [266]. Il a été montré d'autre part que les composés isolés axillarine, tamarixétine, isoquercitrine et isorhamnétine-3-rutinoside avaient une activité molluscicide intéressante [298].

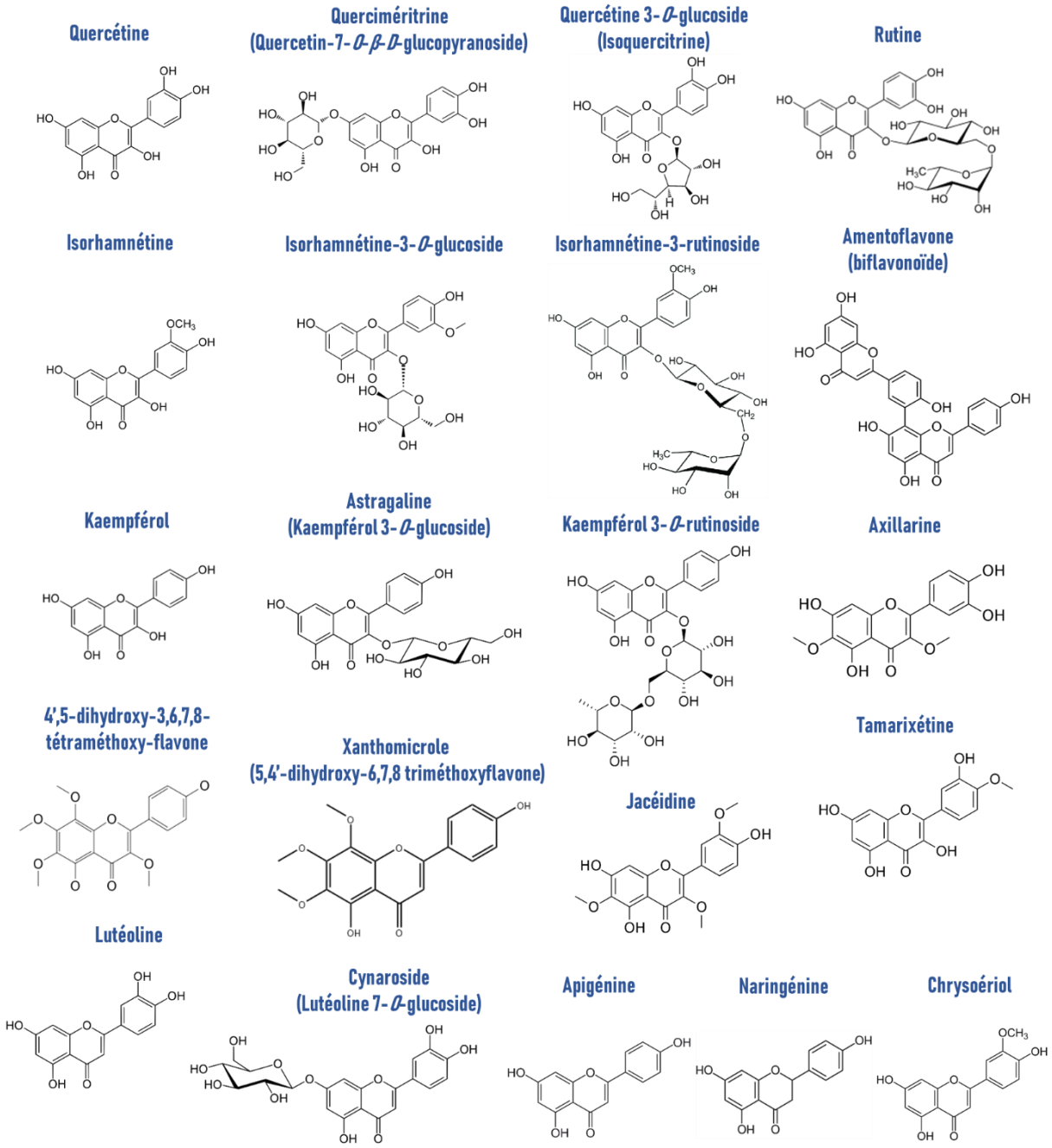


Figure 33. Principaux flavonoïdes identifiés ou isolés chez A. artemisiifolia [217].

c) LA CLASSE DES SESQUITERPENES LACTONES & AUTRES SESQUITERPENOIDES

Les sesquiterpènes lactones, qui font parties de la grande famille des terpénoïdes, sont des molécules particulièrement présentes chez les *Asteraceae*. Elles sont constituées de squelettes (poly)-cycliques à 15 atomes de carbone comportant une ou plusieurs *γ*-butyrolactones. De nombreuses sesquiterpènes lactones ont pu être isolées d'*A. artemisiifolia* (*Figure 34*), ayant notamment des activités anti-cancéreuse, anti-protozoaire (maladies tropicales) et antiparasitaire, herbicide, anti-germinative ou encore antimicrobienne [227]. D'autres hydrocarbures sesquiterpèniques non lactoniques ont également été identifiées à savoir *α*-guaiène, *β* -patchoulène, *α*-bulnesène, bergamotène et *β*-bisabolène, associés aux effets allélopathiques et anti-germinatifs de l'espèce. L'acide ambrosique quant à lui est particulièrement irritant. Enfin, les psilostachyines A et B, identifiées dans un extrait méthanolique de la plante entière révélaient des propriétés molluscicides [298].

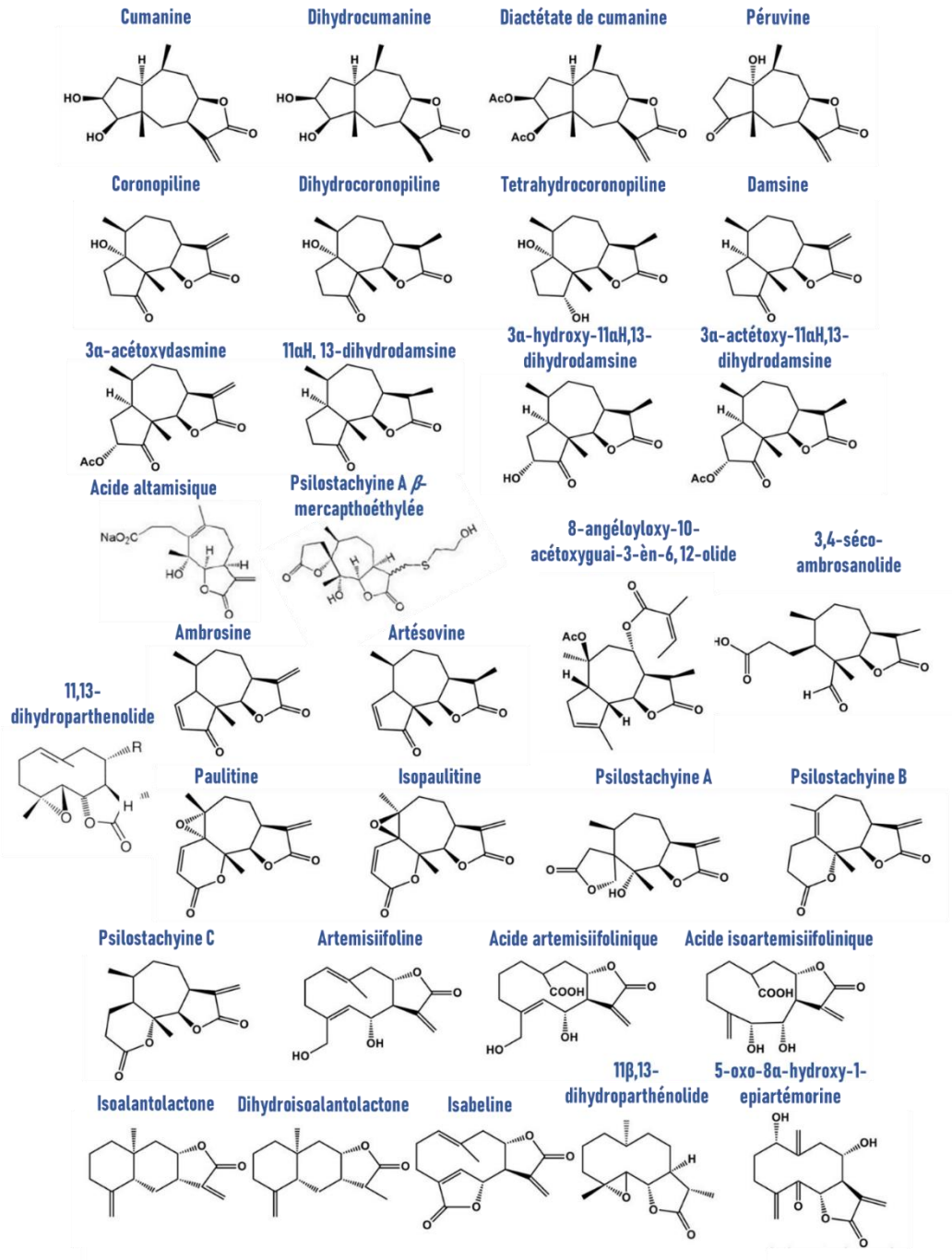


Figure 34. Principales sesquiterpènes lactones identifiées ou isolées chez A. artemisiifolia [227].

D. PRESENTATION DE *SOLIDAGO CANADENSIS*

1. DESCRIPTION BOTANIQUE



Figure 35. Dessins des organes découpés du S. canadensis savoyard réalisés par Letiche Pierre-Alexis.

♦ **Origine** Amérique du Nord ♦ **Genre** *Solidago* ♦ **Famille** *Asteraceae*

♦ Noms vernaculaires

Verge d'or du Canada (France), Canadian goldenrod (Amérique)

♦ Caractéristiques

Plante vivace herbacée, mesurant jusqu'à 250 cm de hauteur, avec des pousses aériennes annuelles et des rhizomes souterrains persistants (*Figure 35*).

♦ Mode de reproduction

Forme des colonies très denses favorisées par une reproduction par graines et par rhizomes qui leur assurent une expansion prolifique. Ses graines sont disséminées par le vent parfois sur de longues distances [306].

♦ Cycle végétatif

Floraison juin-octobre. Graines dispersées progressivement au cours de l'automne et de l'hiver. Un à plusieurs rhizomes émergent près de la base des pousses mourantes en automne, conduisant ainsi à un système de rhizomes ramifiés enracinés principalement à la base des pousses anciennes et actuelles. A cette même base, les racines atteignent une profondeur minimale de 20 cm. Chaque rhizome a le potentiel de produire une seule tige aérienne issue de l'apex du rhizome au printemps suivant.

♦ Partie aérienne

Feuilles vertes et minces, alternées, linéaires, pointues, trinervées de 9 à 15 cm de long et 1 à 3 cm de large. Plus grandes au milieu de la tige, devenant plus petites vers l'inflorescence. Lancéolées, pubescentes dessous, souvent acuminées, avec des marges dentelées.

Tiges grêles et vertes, ramifiées que dans l'inflorescence, glabres à la base, pubescentes au moins dans la moitié supérieure, et souvent rougeâtres.

Inflorescence en panicule pyramidale et capitules unilatéralement disposés sur les branches de la grappe très petits et nombreux de 4 à 8 mm de diamètre (en moyenne 1443 capitules par pousse). Les bractées de l'involucre sont linéaires, obtuses ou aiguës. **Fleurs** couleur jaune vif. **Fruit** akène pubescent de 0,9 à 1,2 mm de long, avec un pappus de 2 à 2,5 mm.

♦ Partie racinaire

Souvent, rhizomes variant en longueur de 3 à 6 cm, avec angles de ramification de 40° à 60° par rapport à la direction du rhizome parental [300,302].

♦ Risque de confusion

Avec *S. gigantea* Avec *S. virgaurea*

Avec Inule de Suisse (*Inula helvetica*)

Avec Verge d'or graminifoliée (*Euthamia graminifolia*)

2. ORIGINE DE SON INTRODUCTION & REPARTITION GEOGRAPHIQUE

S. canadensis a été introduit en 1645, en Angleterre. Attrayant et facile à cultiver, il a été largement utilisé par les jardiniers comme plante ornementale et mellifère [300,301]. Sa propagation a commencé à partir de quelques localités d'Europe centrale vers 1850 [302]. Sa phase importante d'expansion a débuté au milieu du XXème siècle, envahissant avec succès les zones tempérées d'Europe [303,304].

Dans l'aire de répartition européenne, il est présent du niveau de la mer à des altitudes moyennes (jusqu'à 800 mètres). *S. canadensis* occupe à présent une très grande partie du territoire français [305]. Le plus fréquemment, il colonise les milieux rudéralisés c'est-à-dire les bords de voies de communication, les friches urbaines et industrielles, les champs, clairières et prairies humides abandonnés, mais également les cours d'eau et les zones alluviales lorsque la nappe s'est abaissée (*Figure 36*). Fort de son adaptabilité écologique, il est capable de former initialement de nombreuses populations satellites, puis produit des clones de plantes individuelles à l'aide de ses rhizomes souterrains pour combler les lacunes. Enfin, sa colonisation conduit à des peuplements monospécifiques denses et de grande taille supplantant les espèces indigènes [306]. Les clones individuels forment des grappes denses d'une à plusieurs pousses, selon l'âge du clone [300]. Enfin, son hybridation avec des espèces proches comme *S. gigantea*, renforce son pouvoir invasif [307].



Figure 36. S. canadensis présent dans les Savoies sur un chantier de restauration du ruisseau des Glaires dans la commune de Saint Georges d'Hurtières (A) ; et en bords de route dans les communes de la Motte-Servolex et de Veigy-Foncenex (respectivement B et C).

3. IMPACTS NEGATIFS ECOLOGIQUES, ENVIRONNEMENTAUX ET SOCIO-ECONOMIQUES

S. canadensis et plus largement *Solidago* sp. américains représentent une grande menace pour la biodiversité tout particulièrement. Ils engendrent de nombreuses conséquences largement avérées ♦[1]écologiques et environnementales ainsi que ♦[2]socio-économiques [308–311].

♦1Ils ont des impacts sur le fonctionnement des écosystèmes, sur les communautés végétales indigènes, sur les interactions avec les espèces indigènes animales et végétales ou même les espèces/habitats à fort enjeux de conservation. Très compétitifs, ils ont une forte capacité à modifier la composition chimique du sol en détournant nutriments et minéraux ainsi qu'en libérant des substances allélopathiques [312,313]. Par l'exsudation d'allélochimiques, ses racines et rhizomes affectent les agents pathogènes tels que *Pythium ultimum* et *Rhizoctonia solan* [308,309]. Ils peuvent également influer significativement la fonction et la structure des communautés microbiennes du sol (bactéries aérobies, actinomycètes, champignons), d'une manière bénéfique [310,311]. *S. canadensis* a par ailleurs, démontré une bonne tolérance au stress induits par les métaux lourds [306,314].

♦2Ils diminuent les rendements globaux et la valeur fourragère des prairies, impacts socio-économiques non négligeables [29].

4. UTILISATIONS TRADITIONNELLES

S. canadensis est une plante médicinale connue pour ses usages ethnopharmacologiques amérindiens. Ses fleurs ou racines étaient le plus couramment employées par les peuples autochtones. L'espèce s'utilisait pour ses propriétés analgésiques, sédatives, émétiques, fébrifuges, diurétiques, anti-inflammatoires, antiseptiques antispasmodiques ou encore anticoagulantes [315,316].

Actuellement, son huile essentielle est vendue notamment pour ses actions anti-inflammatoire, antimicrobienne, antihypertensive, hépatoprotectrice, spasmolytique ou encore diurétique. En aromathérapie énergétique, elle est aussi employée en cas de grande fatigue, insomnie ou nervosité [317]. Il existe également des médicaments contenant la plante ayant des effets antispasmodiques, diurétiques et anti-inflammatoires comme *Prostanorm* pour le traitement des maladies de la prostate ; *Marelin* et *Fitolizin* servent quant à eux pour traiter la lithiase urinaire [316]. Des gélules contenant des extraits secs de *S. canadensis*, *Bidens tripartita* et *Agrimonia eupatoria*, possèdent une activité néphroprotectrice et antifibrotique [318].

S. canadensis est par ailleurs consommée sous forme de miel. Le nectar de ses inflorescences est abondant permettant une récolte efficace [319]. Il existe une corrélation significative entre les composants chimiques des fleurs et le miel des *Solidago* sp., de sorte que l'étude de la composition phytochimique de ses inflorescences est très actuelle. Une évaluation comparative de la qualité de la production apicole ont été rapportées sur les différences morphométriques des inflorescences de *S. canadensis* et *S. gigantea* et a ainsi révélé l'amplitude de leur variabilité [320].

La section suivante rassemble et résume les différents travaux réalisés sur *S. canadensis*.

5. CHIMIODIVERSITE

Les *métabolites primaires* constitutifs de *S. canadensis* sont présentés (*Tableau 5*) [321]. Sa tige en mélange avec de la cellulose, se sont avérés augmenter la stabilité thermique d'environ 75 °C par rapport à la cellulose pure [322]. Ses feuilles et inflorescences contiennent de l'α-tocophérol (famille de la vitamine E), en quantité importante (48,8 $mg.kg^{-1}$), possédant une forte activité antioxydante au sein de la plante. Elles ont de plus, des teneurs en poids en cendres, lipides, glucides ou carbohydrates et protéines respectivement de 6,7%, 5,1%, 4,0% et 12,2% [316].

Tableau 5. Métabolites primaires décrits chez S. canadensis. Les organes concernés sont précisés entre parenthèses.

Lipides	Glucides	Protéines	Acides aminés
Acides gras [316] *(Feuilles et inflorescences)* Myristique, arachidique, heptadécanoïque, linoléique, lignocérique, caprylique, stéarique, palmitoléique, palmitique, eicosénoïque, tétracosénoïque, béhénique, laurique, linolénique, arachidonique, oléique, caprique, erucique, dicosadiènoïque, ginkgolique Phytostérols Stigmastérol, stigmasta-7,16-dien-3-ol Vitamine E [316] *(Feuilles et inflorescences)* *α*-tocophérol	Sucres simples [323,324] *(Plante entière, Fleurs)* *D*-fructose, *β*-pyranose, *α*-pyranose, maltose, sucrose, saccharose, lactose, *D*-(+)-turanose, *D*-mannose, *D*-glucose, *D*-mannitol, *D*-pinitol (cyclitols), *α*-furanose, *β*-furanose, *D-chiro*-inositol, *myo*-inositol, *scyllo*-inositol, rhamnose [324] *(Fleurs)*, arabinose, galactose, xylose, fucose, rhamnogalacturonane, arabinogalactane Dérivés [316] *(Feuilles et inflorescences)* Vitamine C ou acide ascorbique, acide quinique, acide citrique, acide malique, acides uroniques totaux [324] *(Fleurs)* Sucres complexes [321,322] *(Tiges, tronc)* Cellulose	Protéines totales [316] *(Feuilles et inflorescences)*	*(Feuilles et inflorescences)* Acide aspartique, acide glutamique, valine, leucine, isoleucine, lysine, thréonine, phénylalanine, histidine, sérine, proline, glycine, alanine, tyrosine, arginine, tryptophane, méthionine, cystéine [316]

S. canadensis contient une riche diversité de *métabolites spécialisés* lui conférant de nombreuses activités biologiques et thérapeutiques [316]. Les travaux antérieurs portent en grande majorité sur sa partie aérienne (feuilles & inflorescences). Ce sont essentiellement l'hydrodistillation ainsi que la macération avec ou sans agitation ou ultrasons qui ont été utilisées. Les solvants employés le plus généralement étaient aqueux et/ou alcooliques. Son applicabilité à l'aide de modèles *in vitro* et/ou *in vivo* est présentée dans le *Tableau 6*.

Les extraits totaux produits se révélaient antioxydants, antimutagènes [325], antimicrobiens, anti-inflammatoires, antidiabétiques, molluscicides, algicides ou encore phytotoxiques. Un pouvoir moussant intéressant et une bonne capacité à réduire la tension superficielle de l'eau ont été trouvés notamment dûe aux *saponines* de l'espèce [326,327]. Les principales canadensissaponines (saponines triterpéniques) identifiées chez *S. canadensis* sous la forme de bayogénines glycosides, sont présentées *Annexe 2* [325,328–330].

Les études menées ont également permis d'identifier les *classes des acides phénoliques, des flavonoïdes et des diterpénoïdes de types labdane ou clérodane* (décrites dans les sections suivantes) [325]. Des caroténoïdes tels que les isomères de lutéine [331] et différents terpénoïdes comme la longispinogénine [332] ont aussi été

trouvés. Quelques polyacétylènes ont également été identifiés à partir de ses organes souterrains, en très faible quantité [333]. Il y a le (*Z*)-8-dehydromatricaria ester, le (*Z*)-dehydromatricaria lactone ou (*4Z*)-2,4-decadiene-6,8-diyn-4-olide, le (E)-dehydromatricaria lactone ou (*4E*)-2,4-decadiene-6,8-diyn-4-olide, le methyl 10-[(*Z*)-2-methyl-2-butenoyloxy]-(*2Z,8Z*)-2,8-decadiene-4,6-diynoate (type tiglate) et des dérivés d'esters matricaires isomères de type angélates (*Annexe 3*) [333–336]. Ces composés ont une forte activité anti-germinative sur les espèces voisines.

De nombreuses études ont porté sur son huile essentielle (*Tableau 6*). Ses inflorescences en contenaient de 0,1 à 0,4% et ses feuilles de 0,1 à 0,7%. Y ont été mises en évidenve des propriétés antifongiques, antibactériennes, antioxydantes, insecticides, analgésiques ou encore anticancéreuses & antiprolifératives ainsi que cytotoxique [321,337–341]. L'α-pinène (1,3 - 61,2%), le limonène (0,5 - 22,5%), l'acétate de bornyle (3,4 - 29,8%) et le germacrène D (1,8 - 39,2%) étaient les principaux composés détectés dans les échantillons. L'huile essentielle de ses inflorescences avait le pourcentage maximal d'hydrocarbures monoterpéniques, tandis que celle de ses feuilles présentait le pourcentage cumulé maximal d'hydrocarbures sesquiterpéniques et monoterpéniques [316,342].

D'autres études menées sur les molécules isolées ou purifiées ont permis de compléter les activités biologiques observées sur les extraits totaux. Par exemple, dans un extrait 80% EtOH, des lignanes ont pu être isolées de sa partie aérienne à savoir le 8-déhydroxyméthylvisanol, l'acide 9-*O*-[3-*O*-acétyl-*β*-*D*-glucopyranosyl]-4-hydroxy-cinnamique, le visanol ou encore le 9-aldéhydevibsanol. Ces molécules participent à son activité hypolipidémique. Certains diterpènoïdes labdanes comme le solidagénone ont montré leur implication dans les propriétés antidiabétiques et anti-hyperglycémiantes ainsi qu'antibactériennes [343]. Le kaempferol-3-*O*-*β*-*D*-glucoside quant a lui semble participer à ses effets allélopathiques prononcés [344].

Et pourquoi ne pas utiliser *S. canadensis* pour contrôler et réguler les solidages américains ? Les résultats de cette étude de 2022 ont confirmé l'effet autoallélopathique des extraits aqueux de diverses espèces *Solidago* sur leur propre croissance et développement. Des recherches supplémentaires sont cependant nécessaires pour identifier les substances responsables de cette activité [345].

L'espèce ne présente à ce jour pas de toxicité particulière pour l'homme ni l'animal [324,337].

Tableau 6. Travaux antérieurs réalisés sur S. canadensis (2 pages).

Nombre et/ou nom(s) de molécule(s) identifiée(s) (*classe moléculaire*)	Activité biologique observée	Type d'extrait	Organe(s) (*Provenance*)	Référence(s)
Activités réalisées sur extraits bruts				
(*volatils*)	Antibactérienne, Antimutagène	Extrait Hexane Extrait EtOH 50%	Partie aérienne (tiges, feuilles, fleurs) (*Pologne*)	[346]
(*volatils*)	Antifongique	Extrait aqueux Extrait EtOH 96% Huile essentielle	Feuilles, Fleurs (*Slovénie*)	[186]
	Antibactérienne Antioxydante	Décoction aqueuse Extrait EtOH	Plante entière (*Chine*)	[347]
	Antibactérienne	Extrait aqueux	Feuilles, pousses, fleurs et racines (*États-Unis*)	[348]
32 (*volatils*)	Antimicrobienne	Huile essentielle	Feuilles et inflorescences (*Slovaquie*)	[338]
(*volatils*)		Extrait alcoolique	Racines (*Irak*)	[349]
12 (*volatils*)	Antimicrobienne, Analgésique	Huile essentielle	Feuilles (*Inde*)	[337]
	Antimicrobienne Antioxydante (DPPH, ORAC)	Extrait EtOH 50%	Feuilles et écorces (stades végétatif, floraison et maturité) (*Chine*)	[350]
(*acides phénoliques, flavonoïdes*)	Antioxydante (DPPH, FRAP, CUPRAC), Antimicrobienne Anti-diabétique (α-amylase)	Extrait EtOH 50% Extrait aqueux acidifié Extrait MeOH acidifié	Miel, Fleurs (*Pologne*)	[351]
	Antioxydante (CUPRAC) Phytotoxique	Extrait aqueux	Partie aérienne (stades végétatif et floraison), rhizomes et racines (fin du stade végétatif) (*Pologne*)	[345]
51 (*volatils*)	Antimicrobienne Antioxydante (DPPH, sur cellules), Cytotoxique	Huile essentielle	Inflorescences (*Roumanie*)	[339]
74 (*flavonoïdes, polyphénols, saponines, diterpénoïdes et autres composés phénoliques*)	Antioxydante (DPPH), Antimutagène	Extrait MeOH 70%	Parties aérienne et racinaire (stade floraison) (*Pologne*)	[325]
	Antioxydante (DPPH)	Infusion MeOH Infusion EtOH Infusion aqueuse	Feuilles et inflorescences (*Slovaquie*)	[316]
(*acides phénoliques, flavonoïdes*)		Extrait MeOH Décoction, Infusion, Extrait (EtOH 40% ou 70% ou 96%	Partie aérienne (*Hongrie*)	[352]
	Antioxydante (DPPH, ABTS, FRAP)	Extrait aqueux	Miel (*Hongrie*, *Slovaquie* et *Pologne*)	[353]
	Anti-inflammatoire		Herbe (*Californie*)	[354]
	Phytotoxique, Anti-germinative Effets allélopathiques	Extrait aqueux	Feuilles, tiges, fleurs, graines et racines (stades levée, floraison et végétatif) (*Lituanie*)	[355,356]
52 (*volatils*)		Huile essentielle Extrait MeOH	Partie aérienne (stade floraison) (*Slovaquie*)	[340]
	Anti-germinative Effets allélopathiques	Extrait aqueux	Feuilles, inflorescences, tiges, racines, rhizomes (*Slovenie*)	[357]
40 (*polyacétylènes, diterpènes*)		Exsudat	Racines (*Suisse*)	[313]

		Extrait aqueux	Parties aérienne et racines (*Chine*)	[358]
		Infusion,Décoction, Extrait aqueux	Feuilles (*Pologne*)	[359,360]
66 (*volatils*)	Insecticide	Huile essentielle	Feuilles, inflorescences et racines (stade floraison) (*Hongrie*)	[341]
15 (*esters, alcools, et phénols*)	Molluscicide	Extrait EtOH 70%	Partie aérienne (*Chine*)	[361]
	Algicide Effets allélopathiques	Extrait EtOH 95%	Plante entière (*Chine*)	[362]
92 (feuilles) et 114 (inflorescences) (*volatils*)	Antiproliférative, Cytotoxique	Huile essentielle	Feuilles, inflorescences (stade floraison) (*Lituanie*)	[363]
46 (*volatils*)	Anti-cancéreuse, Cytotoxique	Huile essentielle	Feuilles (*Chine*)	[364]
53 (*volatils*)	Cytotoxique	Huile essentielle	Inflorescences (*Chine*)	[365]
(*volatils*)		Huile essentielle	Fleurs et partie aérienne (*Egypte*)	[366]
20 (*terpénoïdes, polyacétylènes*)	Anti-germinative, Cytotoxique	Extrait CH_2Cl_2	Rhizomes (*New York*)	[367]
(*acides phénoliques, flavonoïdes*)	Diurétique	Extrait MeOH Décoction, Infusion, Extrait (EtOH 40% ou 70% ou 96%)	Partie aérienne, herbe	[368]
(*Saponines*)	Pouvoir moussant Capacité à réduire la tension superficielle	Extrait MeOH 80%	Feuilles, Fleurs (*Pologne*)	[327]
Activités réalisées sur molécules isolées/purifiées				
Classe des acides phénoliques				
Acide chlorogénique, Acide néochlorogénique Acide 3,5-*O*-dicaffeoylquinique, Acide 3,4-dicaféoylquinique	Antioxydante (ABTS)	Extrait MeOH/H_2O (70/30)	Feuilles et fleurs (*Lituanie*)	[369,370]
Acide chlorogénique, Acide caféique, Acide caféoylshikimique-glucoside	Antioxydante (inhibiteur de glutathion-S-transférase)	Extrait MeOH/H_2O (50/50)	Partie aérienne (*Hongrie*)	[371]
Classe des flavonoïdes				
Quercétine hexoside hexoside, Rutine, Hypéroside, Isoquercitrine Quercétine 3-*O*-6''-acetyl-hexoside	Antioxydante (ABTS)	Extrait MeOH/H_2O (70/30)	Feuilles et fleurs (*Lituanie*)	[369,370]
kaempferol-3- *O*-*β*-*D*-glucoside	Effets allélopathiques	Extrait EtOH 70%	Paille de plante entière (*Chine*)	[344]
Quercétine, Kaempférol, Isorhamnétine, Isoquercitrine, Rutine, Narcissine, Astragaline, 6''-acetyl-isoquercitrine, Quercitrine, Isorhamnétine-*O*-*β*-*D*-glucoside	Antioxydante (activateur de glutathion-S-transférase)	Extrait MeOH/H_2O (50/50)	Partie aérienne (*Hongrie*)	[371]
Autres classes				
8-dehydroxymethylvisanol, Acide 9-*O*-[3-*O*-acetyl- *β*-*D*-glucopyranosyl]-4-hydroxy-cinnamique, Visanol, 9-aldehydevibsanol	Hypolipidémique	Extrait EtOH 80%	Partie aérienne (*Chine*)	[372]
Solidagol, Acide 3-*β*-acétoxycopalique, Acide sempervirénique, Acide 6-*β*-angeloyloxykolavénique, Acide 6-*β*-tigloyloxykolavénique, Longispinogénine	Nutraceutique	Extrait MeOH	Partie aérienne (*Etats-Unis*)	[373]
solidagénone, *13R*-présolidagénone, *13S*-présolidagénone	Antidiabétique, Anti-hyperglycémiante (*α*-glucosidase, *β*-glucosidase, *α*-amylase), Inhibitrice maladie d'Alzheimer, Antibactérienne	Extrait EtOH	Racines (*Hongrie*)	[343]
Lupéol, Acétate de lupéyle, Acide ursolique, Cycloarténol, Palmitate de cycloartényle, Acétate d' *α* -amyrine, Stigmastérol, 3*β*-(*3R*-acétoxyhexadécanoyloxy)-lup-20(29)-ène, 3*β*-(3-cétohexadécanoyloxy)-lup-20(29)-ène, 3*β*-(3R-acétoxyhexadécanoyloxy)-29-nor-lupan-20-one, 3*β*-(3-cétohexadécanoyloxy)-29-nor-lupan-20-one	Anti-lyase de l'ADN polymérase *β*	Extrait MeOH 90%	Tiges, racines (*Etats-Unis*)	[374]
Solicanolide	Anti-cancéreuse, Cytotoxique	Extrait MeOH 80%	Fleurs (Saint Félicien-Québec, Canada)	[375]
Methyl 10-(2-methyl-2-butenoyloxy-(2Z,8Z)-2,8-decadiene-4,6-diynoate, Dehydromatricaria ester, Dehydromatricaria lactone	Anti-germiative		Tiges souterraines (*Japon*)	[333,335]
Methyl 10-(2-methyl-2-butenoyloxy-(2Z,8Z)-2,8-decadiene-4,6-diynoate		Extrait MeOH/$CHCl_3$ (50/50)	Racines (*Japon*)	[336]

a) LA CLASSE DES ACIDES PHENOLIQUES

Les acides phénoliques sont des composés intéressants pour prévenir les maladies liées au vieillissement en neutralisant les radicaux libres de l'organisme. Ceux présents chez *S. canadensis* sont présentés (*Figure 37*) [316]. Dans les études antérieures (*Tableau 6*), les extraits bruts de ses différents organes ou même son miel en comportant pouvaient être particulièrement antioxydants, antidiabétiques (*α*-amylase) et antimicrobien [316].

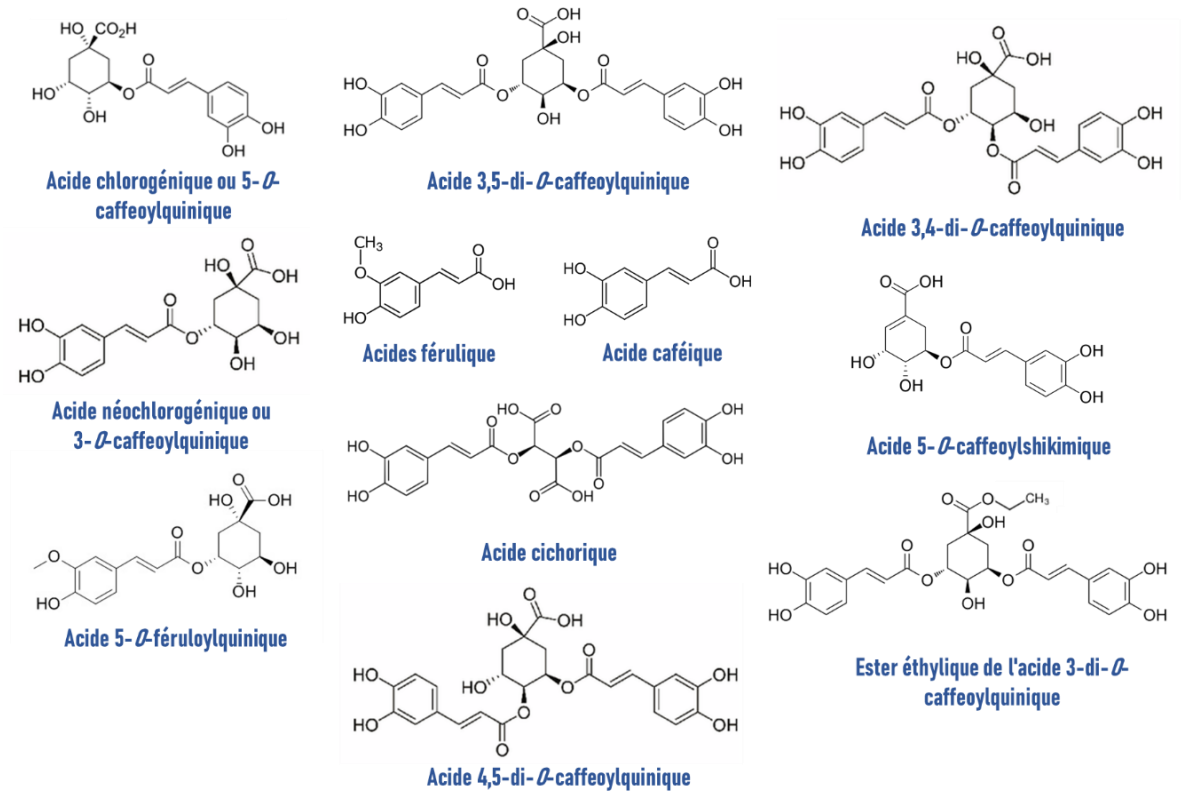


Figure 37. Acides phénoliques présents chez S. canadensis [316].

Dans cette étude lituanienne par exemple [369], ont été comparés les profils antioxydants des feuilles et des inflorescences de *S. virgaurea*, *S. gigantea*, *S. canadensis* ainsi que de l'hybride *S. × niederederi*. Le test HPLC-ABTS couplé à UPLC-QTOF-MS a été appliqué pour l'élucidation et la détermination des composés bioactifs. L'acide chlorogénique et l'acide 3,5-DCQA ont été identifiés comme marqueurs principaux de piégeage des radicaux dans les organes des quatre espèces de *Solidago*. Généralement, la capacité antioxydante totale des composés détectés était significativement plus élevée chez les solidages américains. Il avait été rapporté dans cet autre travail [376] que ces mêmes espèces exposaient le même profil phytochimique de constituants phénoliques avec des différences quantitatives significatives.

b) LA CLASSE DES FLAVONOIDES

Les principaux flavonoïdes identifiés chez *S. canadensis* sont présentés *Figure 38*. Il a en particulier des ♦*flavonols* à savoir l'isorhamnétine, le kaempférol, la quercétine et leurs nombreux dérivés glycosylés. Ils possèdent un squelette 3-hydroxy-2-phényl chromén-4-one. Ils se sont principalement avérés être de puissants antioxydants [316,371]. L'astragaline isolée était un potentiel composé allélochimique. Elle a inhibé de façon dose-dépendante la croissance des pousses d'*Echinochloa colonum*, une mauvaise herbe des cultures de riz, de maïs ou encore de cotonniers [344].

D'autre part, un des rôles des flavonoïdes dans la stratégie d'invasion de *S. canadensis* a pu être mis en évidence [377]. Lorsqu'ils pénètrent dans la rhizosphère (exsudats), ils peuvent interagir avec le cation ammonium, libre ou immobilisé sur les surfaces chargées négativement des particules de sol. De nouveaux composés polaires sont alors formés. En présence d'eau, ils sont capables de diffuser activement. La rutine par exemple provoque une chimiotaxie positive chez *Pseudomonas putida* (des rhizobactéries stimulant la formation du système racinaire et entrant en compétition avec les microorganismes phytopathogènes). La formation d'un système développé de racines latérales et adventives contribue ainsi à l'utilisation des couches superficielles les plus riches en nutriments du sol habitées [309,377].

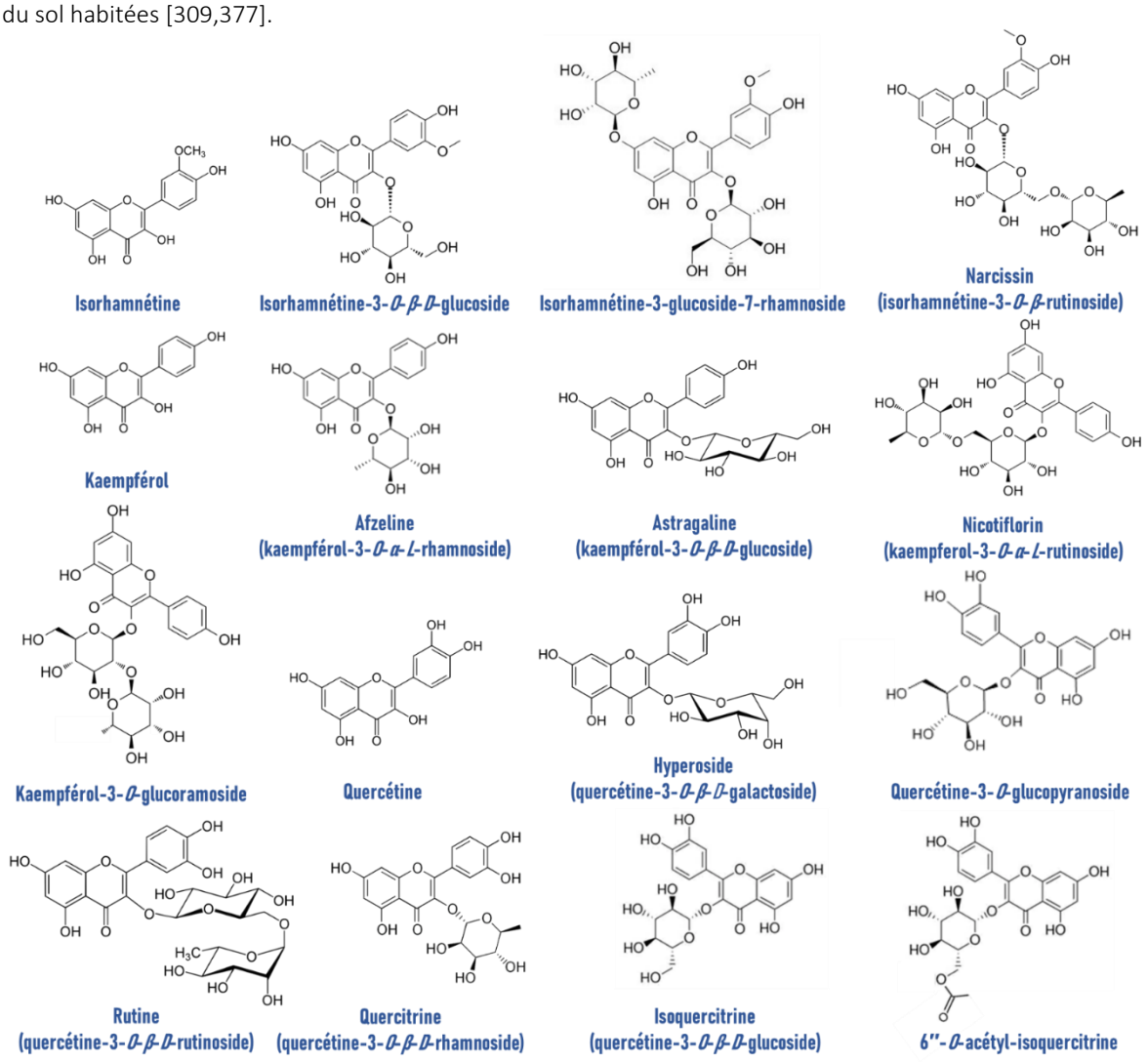


Figure 38. Principaux flavonoïdes identifiés chez S. canadensis [316,371].

c) LA CLASSE DES DITERPENOIDES DES TYPES LABDANE & CLERODANE

Les *diterpènes de type labdane* ont pour squelette une décaline bicyclique. Ils peuvent être classés en deux catégories selon la stéréochimie relative du cycle décaline et la jonction des cycles ; ou selon la configuration absolue du méthyle en position C_{20} (*trans*-décaline les plus répandues, et *cis*-décaline). L'acide 3-*β*-acétoxycopalique a montré un fort potentiel nutraceutique, agissant comme agent masquant potentiel d'amertume. Il avait une activité inhibitrice contre l'activation du récepteur d'amertume humain [373]. La solidagénone, la *13R*-présolidagénone et la *13S*-présolidagénone, isolées récemment des racines de *S. canadensis* ont des capacités anti-hyperglycémiantes (*α*-glucosidase, *β*-glucosidase, *α*-amylase), et/ou neurobiologiques (acétylcholinestérase, butyrylcholinestérase). Ce sont également de bons antimicrobiens [343]. Enfin, le solicanolide issu de ses fleurs, a présenté des propriétés anticancéreuses et cytotoxiques très intéressantes [334].

Les *diterpènes de type clérodane* sont des diterpènes bicycliques notament représentés chez les Lamiacées. Présents chez *S. canadensis*, ils participent à inhiber la croissance des espèces végétales voisines avec lesquelles il est en compétition, ou à défendre contre les infections et herbivores [313,378]. Ils ont également des propriétés antidiabétiques, anti-hyperglycémiantes et antimicrobiennes [343]. Le principal principe amer des racines est l'acide 7-acétoxykolavénique [378].

Les principaux diterpénoïdes identifiés chez *S. canadensis* sont présentés ci-dessous (*Figure 39*).

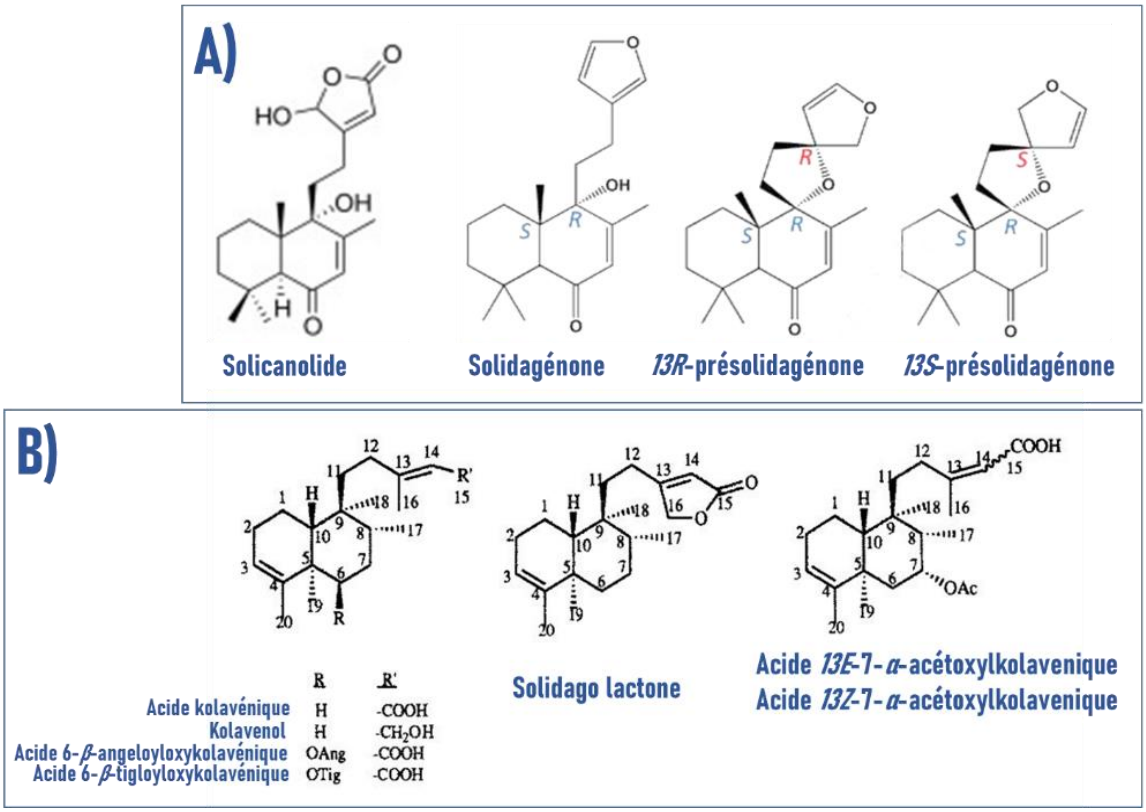


Figure 39. Diterpènes de type labdane (A) et de type clérodane (B) présents chez S. canadensis [313,343,378].

IV. ETUDE DES EXTRAITS VEGETAUX NATURELS

A TECHNIQUES D'EXTRACTION

Afin d'extraire de manière spécifique les métabolites d'intérêt présents dans une matrice complexe, il est important de choisir la technique la mieux adapter possible, devant également permettre des résultats reproductibles. Les paramètres s'y rapportant tels que la température du milieu, la durée d'extraction, le nombre de cycles d'extraction, l'agitation employée, la puissance de chauffage, la pression, ou encore le solvant et le ratio matrice végétale/solvant doivent aussi être judicieusement ajustés selon la nature du végétal étudié et l'activité biologique recherchée [379]. Enfin si le maximum de molécules ciblées est extrait, à partir du minimum de matière première alors les conditions d'extraction sont optimales. Parmi les modèles d'extraction disponibles, la distillation par la vapeur (pour l'obtention d'huiles essentielles par exemple) et l'extraction par solvant (aqueux et/ou organique) sont les plus usitées [380–382].

L'extraction par solvant peut être liquide-liquide ou solide-liquide, ce dernier étant préféré pour les produits naturels. Il consiste à mélanger le solide (matrice végétale) avec le solvant. Les techniques conventionnelles incluent la décoction, l'infusion, la percolation, l'extraction au soxhlet et la macération [383]. Bien que simples, ces méthodes sont longues, énergivores et nécessitent beaucoup de solvants, parfois toxiques, ce qui peut altérer les molécules extraites. Son efficacité dépend du choix du solvant, qui doit être sélectif, inerte par rapport aux métabolites à extraire et relativement volatil pour être évaporé ensuite. Les solvants polaires conviennent aux métabolites hydrophiles, tandis que les apolaires sont adaptés aux métabolites lipophiles. Les solvants organiques couramment utilisés, comme le dichlorométhane ou le méthanol (MeOH), dérivent souvent du pétrole en raison de leur faible point d'ébullition et de leur enthalpie de vaporisation. Cependant, leur utilisation est critiquée en raison de leurs impacts sur la santé et l'environnement [381,382].

La prise de conscience générale de mieux gérer l'environnement et les ressources naturelles, ainsi que le durcissement de la réglementation européenne (règlement REACH ou *Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals*, directives européennes pour réglementation des émissions des composés organiques volatils ou COV, directives 2004/73/CE) ont obligés les chercheurs et industriels de tous les secteurs à s'orienter vers des alternatives plus respectueuses de l'environnement, moins dangereuses et moins polluantes. Ainsi le concept de *chimie verte et durable* proposé par l'IUPAC ou *International Union of Pure and Applied Chemistry*, a été introduit au début des années 1990, développée autour de 12 principes (*Figure 40*) [384].

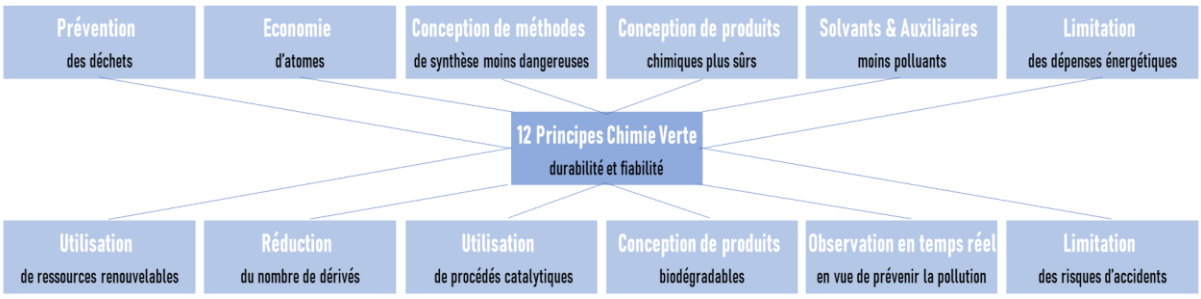


Figure 40. Présentation des douze principes développés selon le concept de chimie verte, adaptée de [384].

De nouvelles techniques d'extraction dites d'éco-extraction telles que les extractions assistées par ultrasons ou micro-ondes sont développées selon six principes (*Figure 41*) et deux axes [385]. Le premier consiste à développer des procédés d'extraction innovants réduisant la consommation énergétique ainsi que les volumes de solvants nécessaires. Le deuxième axe repose sur l'utilisation de ressources végétales renouvelables et de solvants alternatifs, issus de ressources renouvelables (agrosolvants, fluides supercritiques, eau chaude pressurisée ou subcritique, solvants fluorés, liquides ioniques) [385,386].

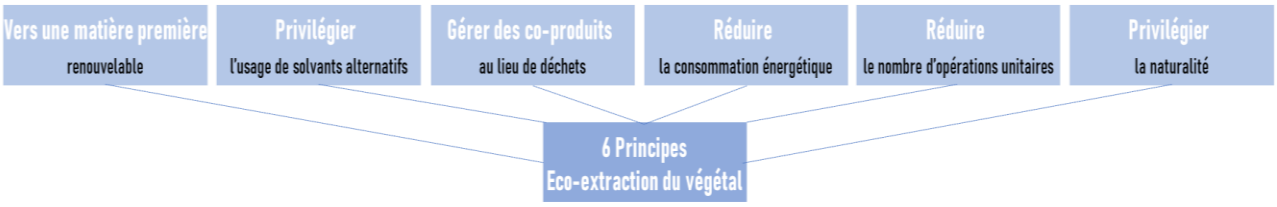


Figure 41. Présentation des six principes associés à l'éco-extraction des végétaux, adaptée de [385].

L'utilisation d'un solvant alternatif doit garantir une efficacité et une sélectivité équivalentes sans présenter de risques, tout en restant abordable. Ces solvants sont souvent biodégradables, non toxiques et non inflammables, mais ils peuvent avoir des inconvénients tels qu'une forte viscosité, un point d'ébullition élevé, un coût élevé ou une odeur prononcée. L'eau (H_2O), par exemple, est une alternative écologique pour l'extraction des métabolites polaires, tandis que l'ajout d'un solvant moins polaire comme l'éthanol (EtOH) permet d'augmenter la gamme de polarité des métabolites extraites [381,385].

Ces techniques d'éco-extraction offrent alors de nombreux avantages : réduction de la durée d'extraction et de la consommation de solvant, augmentation des rendements d'extraction et de la reproductibilité ; sans altérer les qualités de l'extrait végétal. Elles peuvent également être automatisées ou encore être plus sélectives [381,387].

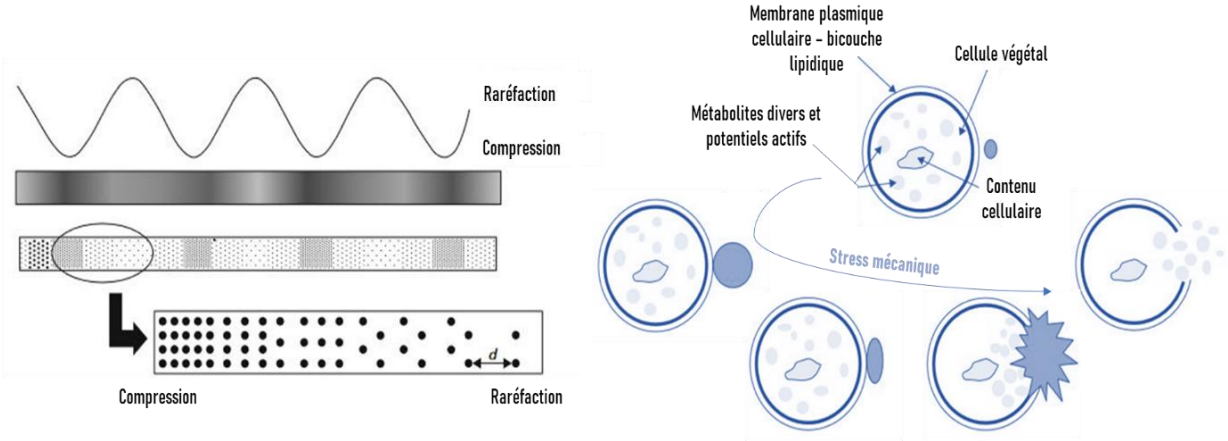
1. CAS PARTICULIER DE LA MACERATION ASSISTEE PAR ULTRASONS

L'extraction par macération est l'une des méthodes les plus anciennes et des plus classiquement mise en œuvre pour extraire les molécules naturelles solubles, le plus souvent non-volatiles. Le solvant, mis en contact avec la matrice végétale doit diffuser à travers ses membranes cellulaires, solubiliser ensuite les métabolites qui y sont contenus et ainsi s'enrichir en métabolites. La plante peut être broyée plus ou moins finement pour faciliter le processus (augmentation de la surface de contact avec le solvant). Le tout peut être agité et/ou chauffé. Afin de récupérer l'extrait végétal produit, un procédé de séparation est ensuite réalisé (décantation, centrifugation ou filtration). Cependant, la macération est généralement longue et nécessite de grande quantité de solvant [383].

La macération assistée par ultrasons est une méthode dite d'activation. Il s'agit d'une macération modifiée dans laquelle l'extraction est facilitée par l'usage des ultrasons. Ces derniers sont des ondes mécaniques

ayant la capacité de déformer le milieu (solide, liquide ou gazeux) dans lequel elles se propagent avec une fréquence supérieure à la limite maximale d'audibilité de l'oreille humaine soit 20 kHz. Il existe deux types d'ultrasons : les ultrasons à faible puissance et à forte fréquence (2 à 10 MHz) servant d'outil de diagnostic et contrôle dans le domaine médical ; et les ultrasons de puissance utilisés par exemple pour extraire les arômes, accélérer des réactions chimiques ou produire des émulsions. Ces derniers peuvent être soit de basse fréquence (20 à 200 kHz) soit de haute fréquence (supérieure à 200 kHz) ou très haute fréquence (supérieure à 1 MHz) [388,389].

Les ultrasons de puissance rendent possible le déplacement des molécules de liquide autour de leur point d'équilibre ou les déplacements convectifs nommés vents ultrasonores. Des oscillations sont créées provoquant la formation de zones de compression et de dépression (*Figure 42, a*). Aussi, la macération assistée par ultrasons repose sur le phénomène de cavitation. Il s'avère qu'en dessous d'un seuil caractéristique du liquide ou solvant considéré, les forces qui maintiennent sa cohésion sont vaincues, induisant la formation, la croissance voire l'implosion de bulles de cavitation microscopiques qui contiennent de la vapeur de solvant et gaz dissous (*Figure 42, b*) [390].



a) Formation par l'onde sonore de zones de compression et raréfaction

b) Croissance puis implosion d'une bulle de cavitation sous l'application d'un champ ultrasonore, libérant métabolites et potentiels actifs

Figure 42.Macération assistée par ultrasons reposant sur le phénomène de cavitation, adaptée de [390].

Leur comportement (stabilité ou instabilité-implosion) dans le milieu va alors dépendre de leur taille, et de la nature du champ ultrasonore appliqué. L'implosion de ces cavités va engendre un stress mécanique favorisant la rupture des membranes cellulaires du végétal. A sein de chaque bulle considérée comme un microréacteur, se produisent des microenvironnements à températures et pressions très élevées, respectivement de l'ordre de 5 000 Kelvins et 1 000 bars. Cette rupture va augmenter la solubilisation des divers métabolites dans le solvant, et permettre d'accélérer la vitesse de l'extraction et améliorer les rendements d'extraction [390]. En particulier lorsque l'eau est utilisée comme solvant car elle diffuse difficilement dans les cellules de la plante. L'efficacité de l'extraction dépend par ailleurs de la fréquence de l'équipement (bain à ultrasons ou sonde

ultrasonore à l'échelle laboratoire), de la durée et de la température d'ultrasonication ou de sonication. Des étapes d'optimisation peuvent alors être alors nécessaires [390].

Différents types d'équipements générant des ultrasons peuvent être mis en place. Des effets d'irradiation directs sont réalisés lorsque la longueur d'onde sonore agit directement sur les échantillons tandis que des effets indirects se produisent à travers les conteneurs avant d'atteindre l'échantillon. A l'échelle laboratoire, les sources d'ultrasons les plus couramment utilisées sont le bain et la sonde, associées respectivement à des effets d'irradiation indirects et directs sur les échantillons [388,389,391,392].

A l'échelle industrielle, les systèmes à bains et à sonde sont employés (discontinus ou continus). Il existe des réacteurs de 30 à 1 000 L. Les systèmes de pompe, couplés à ces réacteurs, permettent le remplissage des échantillons dans le bain à ultrasons, l'agitation et la récupération des échantillons après opération. Les systèmes continus ont un grand potentiel dans le traitement de grandes quantités avec un volume de réacteur restreint, fournissant ainsi une puissance maximale par volume. Les puissances de tels dispositifs peuvent aller jusqu'à 16 000 W. Des bains à ultrasons à grande surface rayonnante et un système d'agitation ont aussi été développés pour des applications industrielles [388,393].

2. CAS PARTICULIER DE LA MACERATION ASSISTEE PAR MICRO-ONDES

Le rayonnement par micro-ondes a été introduit dans les années 1950, avec le physicien Percy Spencer. Dans les années 1980, le pouvoir énergétique des micro-ondes pour l'extraction des ingrédients alimentaires a été décrit pour la première fois par Ganzler et Lan [394]. Ils irradiaient par micro-ondes sur de courtes périodes interrompues par des périodes de refroidissement, la matière végétale en contact de solvants tels que le MeOH ou l'hexane pour extraire respectivement les métabolites polaires ou apolaires. De plus le MeOH absorbe en grande partie les microondes et l'hexane, transparent, possède une constante diélectrique faible, ce qui permet d'avoir un chauffage moins fort et d'éviter la dégradation des éventuelles molécules thermosensibles. Durant les années suivantes, de multiples travaux ont été menés sur l'extraction végétale par micro-ondes, donnant lieu à plusieurs brevets tel que celui de l'équipe canadienne en 1990 portant sur l'extraction de produits naturels assistée par micro-ondes [393,395–397].

Cette technologie s'est ensuite largement implantée dans les domaines agro-alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques souhaitant utiliser des ingrédients plus naturels, sûrs et éco-conçus. Elle comprend trois catégories de techniques qui sont la distillation par micro-ondes, l'extraction combinant l'hydrodiffusion et la gravité et l'extraction par solvant assistée par micro-ondes comme la macération assistée par micro-ondes (MAE, *microwave-assisted extraction*). Dans le cas des EVEE, des travaux utilisant le chauffage par micro-ondes ont été menés par exemple pour neutraliser des graines de plantes exotiques par magnéto-neutralisation visant à trouver de nouvelles méthodes de gestion [398,399].

Les micro-ondes ou hyperfréquences sont des radiations non-ionisantes faisant partie du spectre électromagnétique (*Figure 43*) [395]. Elles se situent plus particulièrement entre le spectre des radiofréquences et les infrarouges. Leur rayonnement en effet, est caractérisé par des fréquences variant de 300 GHz à 300 MHz. Il s'agit d'ondes décimétriques à millimétriques possédant donc des longueurs d'ondes de 1 mm à 10 dm. De manière plus spécifique, le domaine des micro-ondes se divise en rois sous-bandes qui sont : la bande des ultra-hautes fréquences - ondes décimétriques allant de 0,3 à 3 GHz ; la bande des supra-hautes fréquences - ondes centimétriques allant de 3 à 30 GHz ; et la bande extra-hautes fréquences - ondes millimétriques allant de 30 à 300 GHz. La fréquence 2, 450 GHz est la plus courante par exemple les fours à micro-ondes domestiques ayant généralement une puissance comprise entre 600 et 1 200 W et une longueur d'ondes à vide de 12.2 cm [395].

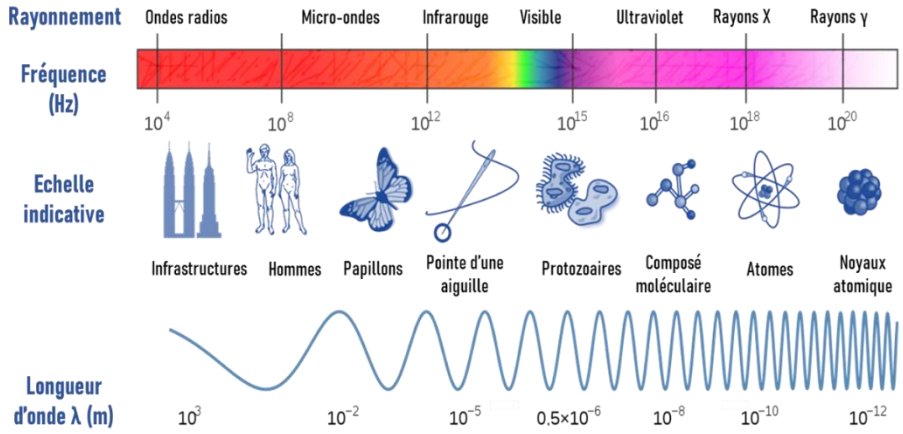


Figure 43. Domaine des micro-ondes dans le spectre électromagnétique, adaptée de [395,400].

Les micro-ondes, agissant sur de courtes distances dans la matière, induisent deux mécanismes de chauffage en relation avec leur fréquence dans la bande des ultra-hautes fréquences. Ces mécanismes, généralement concomitants, dépendent du solvant utilisé ainsi que de la charge et de la taille des ions dans la matrice végétale. Le premier mécanisme, la conduction ionique ou polarisation ionique, résulte de la migration oscillatoire des ions sous l'influence d'un champ électrique à haute fréquence. Les collisions entre les ions et autres molécules entraînent la conversion de leur énergie cinétique en chaleur. Le second mécanisme repose sur la rotation dipolaire, qui dépend de la présence de molécules polaires telles que l'eau. Sous l'effet d'un champ électromagnétique oscillant, ces molécules tendent à s'aligner par rapport au champ, générant des frottements internes et de la chaleur. Ce chauffage se produit de manière localisée, induisant un stress thermique et des pressions élevées qui favorisent la rupture des membranes cellulaires végétales [397], accélérant ainsi le transfert de métabolites dans le solvant environnant. Ce transfert de chaleur diffère de celui du chauffage par conduction conventionnel. (*Figure 44*) [395,400].

A l'échelle laboratoire, les systèmes de four à micro-ondes commercialisés sont constitués de divers éléments structuraux dont les principaux sont le [♦1]magnétron, le[♦2]guide d'ondes, l'[♦3]enceinte d'application ou applicateur, le ou les [♦4]réacteur(s) et les [♦5]éléments d'adaptation des micro-ondes à la charge et de protection du magnétron [393,395,396,401].

♦1Elément du générateur de micro-ondes, le magnétron se compose d'un tube sous vide poussé où deux électrodes sont disposées et entre lesquelles est appliquée une différence de potentiel élevée. La cathode est généralement entourée d'un filament hélicoïdal en tungstène ou thorium, et l'anode creuse cylindrique est munie de cavités résonnantes de formes variables selon le magnétron. Un champ magnétique continu perpendiculaire au champ électrique appliqué entre les deux électrodes est produit par un aimant permanent ou un électroaimant. Le magnétron transforme ainsi l'énergie électrique en rayonnement micro-ondes et permet de délivrer des puissances de quelques kilowatts (kW). La puissance émise dépend de la valeur de la différence de potentiel entre la cathode et l'anode ainsi que de la valeur du champ magnétique. En conséquence, le contrôle de la puissance émise peut être réalisé en faisant varier la tension d'alimentation et en maintenant constant le champ magnétique ou en fixant la tension d'alimentation et en faisant varier le champ magnétique [396].

♦2Le guide d'ondes transporte l'énergie micro-ondes engendrée par le magnétron vers l'applicateur. Il s'agit d'un conducteur cylindrique ou d'un tube métallique parallélépipédique recouvert d'un métal conducteur. Sa génératrice est choisie comme axe de propagation. Les modes de propagation des ondes TM (transverse magnétique) ou TE (transverse électrique) sont alors envisageables. Cependant, pour ne permettre qu'un seul mode de propagation, une standardisation de la dimension du guide a été introduite soit pour une fréquence de 2 450 MHz, 86,5 mm × 43,5 mm [396,401].

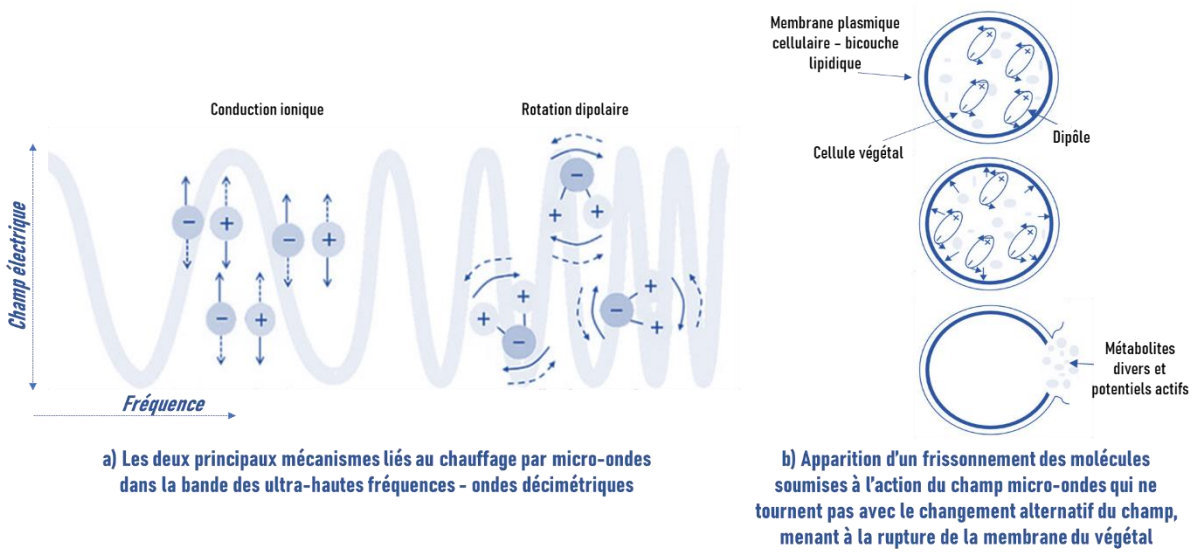


Figure 44. Mécanismes de l'extraction assistée par micro-ondes du végétal, adaptée de [390,400].

♦3 L'applicateur correspond à une cavité fermée dans laquelle est introduit l'échantillon à chauffer. La configuration de l'applicateur dépend notamment des caractéristiques diélectriques de l'échantillon à traiter, du mode d'extraction (en batch ou en continu), de la nécessité ou non de chauffer l'échantillon par conduction à partir d'une double enveloppe ou de travailler sous vide. Cette enceinte d'application peut être de trois types c'est-à-dire monomode, multimode ou encore stéréomode selon le mode de propagation des ondes [396]. La cavité monomode, de par ses faibles dimensions géométriques, maintient un seul mode de propagation connu, orienté par le guide d'ondes. L'énergie électromagnétique emprisonnée se réfléchit sur les parois et donne lieu à

des ondes dites stationnaires. Il est alors aisé de positionner l'échantillon dans la zone la plus favorable, garantissant une bonne homogénéité en température et un transfert d'énergie maximal. En revanche, dans le cas d'une cavité multimode, la position de l'échantillon au sein même de la cavité ainsi que son volume sont des paramètres critiques car ils conditionnent l'uniformité en température de l'échantillon. En effet, cet applicateur est bien plus volumineux engendrant une dispersion aléatoire des ondes électromagnétiques à l'intérieur. Le champ électrique n'est pas stable comme dans une cavité monomode et sa distribution varie. Il rend donc difficile le contrôle de leur propagation. Afin que l'ensemble du contenu de l'échantillon soit irradié de façon homogène et pour éviter les points chauds, son agitation est alors nécessaire. Enfin, l'applicateur stréréomode, quant à lui, permet des traitements thermiques plus homogènes et un meilleur rendement énergétique qu'avec les cavités multimodes, tout en permettant le traitement de quantités d'échantillons plus importantes qu'avec les cavités monomodes [395,396,401].

♦[4]Le réacteur, dans lequel l'échantillon est disposé, ont des volumes variant de quelques dizaines de millilitres à quelques centaines de millilitres, certains pouvant même contenir jusqu'à un litre. Ce dispositif doit être préférablement dans un matériau transparent vis-à-vis des micro-ondes comme le quartz, le téflon ou le verre. Pour éviter les suppressions, certains réacteurs sont équipés de systèmes de sécurité. L'extraction dans le réacteur pourra se faire soit à pression atmosphérique (ouvert surmonté d'un condensateur de vapeurs), soit sous atmosphère pressurisée (fermé). Dans ce deuxième cas, il est possible d'opérer à des températures supérieures au point d'ébullition des solvants employés [395,401].

♦[5]Plusieurs éléments d'adaptation et de protection tels que les adaptateurs d'impédance renvoyant l'onde réfléchie vers l'échantillon à traiter, les circulateurs déviant l'onde réfléchie vers une charge à eau sans perturber l'onde incidente ou encore les pistons de court-circuit disposés à l'extrémité du guide d'ondes peuvent contribuer à ce que le magnétron ne s'endommage pas par l'onde réfléchie se propageant en sens inverse à travers le guide d'ondes [396].

Par ailleurs, dans les systèmes élaborés, une mesure de la température peut être réalisée soit par sonde infrarouge en paroi externe du réacteur soit par fibre optique plongeante dans le milieu. Grâce à un asservissement sur la puissance incidente, il est ainsi possible de maintenir une consigne en température. La mesure de la puissance réfléchie par un capteur permet de même d'ajuster automatiquement la position du piston afin de maximiser la puissance absorbée par la matière à chauffer tout au long du procédé. De plus, le choix du mode d'irradiation (dynamique, pulsé ou puissance fixe) est important dans l'expérience. Le mode dynamique va réguler lui-même la puissance à émettre en fonction de la température consigne. Le mode pulsé régule une température par une puissance en créneaux et est couplé à un refroidissement. Le mode puissance fixe permet de fixer une puissance à une valeur durant toute l'expérience [395,396,401].

Il s'avère néanmoins que ce procédé d'extraction s'industrialise difficilement (procédés de type *batch* ou continu)[393,396,401]. La mise à l'échelle de ce procédé pour des productions importantes demeure un obstacle majeur à un développement à grande échelle de l'extraction. Le procédé de type *batch* est confronté à la faible pénétration des micro-ondes dans le liquide se traduisant par une inhomogénéité en température dès lors que le

volume du réacteur est supérieur à quelques centaines de mL [401]. Cependant, la société *SAIREM* propose actuellement des équipements industriels en continu pour l'extraction de végétaux. Ils permettent de traiter environ 100 kg/h avec une large gamme de solvants. La matière première est transportée par une vis d'alimentation et le solvant est géré *via* un système de pompe. Le flux de solvant peut se faire dans le même sens ou en sens inverse à la matière première. La puissance d'irradiation est transmise aux plantes par quatre entrées de micro-ondes contrôlées de façon indépendante [395].

3. OPTIMISATION DE L'EXTRACTION PAR PLAN D'EXPERIENCES

a) PRINCIPE ET AVANTAGES DU PLAN D'EXPERIENCES

La science expérimentique est applicable à de nombreux domaines et industries dès lors que le lien existant entre une grande d'intérêt (Y) et des variables (x_i) pouvant modifier la valeur de y est recherché ; se rapportant à la fonction $Y = f(x_i)$ [402]. La méthodologie du plan d'expérience sert à l'optimisation du choix et de l'organisation/enchaînement des essais expérimentaux. Elle est aussi utile à la visualisation de l'évolution et du niveau d'influence des réglages réalisables des paramètres influents sélectionnés au préalable [403]. Ceci visant à acquérir le maximum d'informations avec le moins d'essais et la meilleure précision possible sur les réponses calculées selon le modèle choisi. Il s'agit d'une démarche rigoureuse qui implique de suivre scrupuleusement les règles établies mathématiquement et qui peut s'avérer plutôt rapide (trois à quatre fois plus efficaces que les démarches habituelles de conduite d'essais pour des résultats identiques) à un moindre coût. Enfin, c'est un outil de réflexion et d'analyse permettant de mener l'expérimentation souhaitée avec clarté, fiabilité et sûreté [404].

Un plan d'expérience consiste en une série organisée d'essais visant à étudier les effets des variables ou des facteurs d'un système sur une ou plusieurs grandeurs d'intérêt, également appelées réponses. Chaque facteur, qu'il soit qualitatif ou quantitatif, est défini avec un nombre spécifique de modalités ou de niveaux. Le domaine d'étude est délimité par des valeurs minimales et maximales pour chaque facteur. L'objectif est de faire varier simultanément les niveaux des facteurs à chaque essai. Pour faciliter cette démarche, des logiciels statistiques comme *Minitab* ou *Ellistat* sont souvent utilisés, surtout lorsque le nombre de facteurs ou de niveaux est important. Ces logiciels requièrent l'utilisation de variables sans dimension, souvent codées sous forme de matrices ou de tableaux. Les niveaux inférieur et supérieur des facteurs sont généralement représentés respectivement par -1 et +1. Ensuite, un certain nombre de points expérimentaux sont répartis dans le domaine d'étude, selon le type de plan utilisé. Chaque point expérimental est associé à une réponse, modélisée par une expression polynomiale plus ou moins complexe, où des coefficients sont attribués à chaque facteur en fonction de leur effet sur la réponse. Cette hiérarchisation des coefficients permet de déterminer la causalité entre les conditions expérimentales et la réponse observée. L'ensemble des réponses forme ce qu'on appelle la surface de réponse. Le modèle obtenu permet finalement d'analyser l'influence de chaque facteur étudié, y compris leurs interactions, et de déterminer les paramètres optimaux pour obtenir la meilleure réponse possible [402–404].

L'approche méthodologique présentée offre de nombreux avantages par rapport à une méthode traditionnelle ou exhaustive, souvent en contradiction avec les principes de la chimie verte. Tout d'abord, elle permet de travailler dans des conditions contrôlées et reproductibles, ce qui réduit le nombre d'essais nécessaires tout en garantissant des résultats fiables, ce qui se traduit par une économie de temps d'opération. De plus, cette méthode permet d'étudier un grand nombre de facteurs, y compris leurs éventuelles interdépendances, et de déterminer les facteurs ayant des effets significatifs grâce à une quantification précise, ce qui permet d'établir une hiérarchie entre eux. Enfin, elle se révèle être moins chronophage et moins coûteuse [403,404].

b) CAS PARTICULIER DU PLAN POUR SURFACE DE REPONSE COMPOSITE CENTRE

Le plan d'expérience pour surface de réponse ou plan du second degré a été adopté afin d'évaluer l'influence des facteurs (x_i) sur les deux grandeurs d'intérêt choisies (Y_1 et Y_2). Il permet de mieux appréhender/optimiser les réponses et d'établir des modèles mathématiques de second ordre pour des variables continues. Cette méthode vise à la recherche des niveaux optimaux des paramètres expérimentaux pour atteindre un niveau de réponse souhaité. Le plan d'expérience pour l'étude des surfaces de réponse vient facilement après un premier plan de criblage destiné à distinguer les facteurs les plus influents ou à la suite de plans factoriels. Il existe par ailleurs, divers types de plans du second degré dont les principaux sont les plans composites, les plans de Doehlert, les plans de Box-Behnken, les plans hybrides, les plans de Mozzo, les plans de Rechtschaffner ou encore les plans de D-optimaux. Ces plans d'expérience sont fructueux dès lors qu'il y a proximité d'un minimum ou d'un maximum [404].

Dans ces travaux plus précisément, a été sélectionné le plan composite centré complet, en supposant des courbures dans les surfaces de réponse. Couramment mis en place dans le domaine de l'extraction du végétal, il est notamment adapté à une acquisition progressive des résultats et apporte des précisions significatives quant aux effets des grandeurs d'intérêt *via* les valeurs de leurs coefficients. Ce plan d'expérience offre également un bon rapport coût/efficacité [405]. Il se constitue de trois parties c'est-à-dire d'un plan factoriel complet ou fractionnaire avec k facteurs à deux niveaux (-1 et +1) avec $n_f = 2^{k-p}$, d'au minimum un point expérimental situé au centre du domaine d'étude (niveau 0 : n_0) et enfin de points axiaux localisés sur les axes de chaque facteur (niveaux $-\alpha$ et $+\alpha$) avec $n_\alpha = 2k$. n_f représente alors le nombre des sommets du domaine d'étude défini par le cube ou l'hypercube des points expérimentaux. Les quatre points aux axes forment le plan en étoile avec $\alpha = n_f^{1/4}$, leurs coordonnées dépendant du critère d'optimalité choisi (généralement de presque orthogonalité ou d'isovariance par rotation). Ils mettent en évidence la courbure éventuelle de la réponse (si effets non-linéaires alors courbure). Le minimum d'incertitude est visé. Cinq niveaux sont donc requis par facteur étudié (*Figure 45*) [404].

Le nombre d'essais équivaut par ailleurs à $2^{k-p} + 2k + n_0$ ou $n_f + n_\alpha + n_0$. Il suffit d'effectuer les expériences correspondant au plan en étoile et de réaliser les calculs sur la totalité des essais. Géométriquement, il y a autant

de dimensions qu'il y a de facteurs. Avec trois variables ou plus, il faut tracer le graphique pour deux facteurs, les autres sont fixés à leur optimum ou à leur valeur centrale. La qualité d'un plan dépend des essais, du modèle et est mesurée sous forme matricielle par $(X'X)^{-1}$ [402,404]

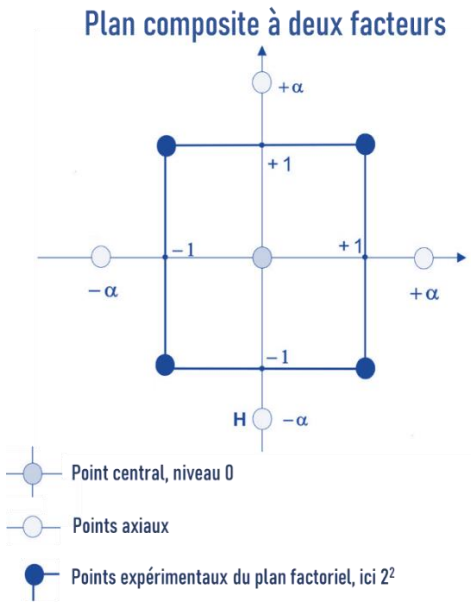


Figure 45. Exemple d'un plan composite à deux facteurs, adaptée de [404].

Les effets des différents facteurs (linéaires et quadratiques ou de second ordre) et de leurs interactions peuvent être modélisés selon la régression [402,404] :

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{j=1}^{k} \beta_j x_{ij} + \sum_{j=1}^{k} \beta_{jj} x_{ij}^2 + \sum_{j=1}^{k} \sum_{l=j+1}^{k} \beta_{jl} x_{ij} x_{il} + \varepsilon_i$$

Avec Y_i la grandeur d'intérêt mesurée, la constante $\boldsymbol{\beta}_0$ correspondant à la valeur de Y au centre du domaine d'étude ($Y_0 = \boldsymbol{\beta}_0$), k le nombre de facteurs soit $k = 4$ dans les cas à l'étude, $\boldsymbol{\beta}_j$ et $\boldsymbol{\beta}_{jj}$ respectivement les coefficients linéaire et quadratique du facteur j, x_{ij} le niveau du facteur j, $\boldsymbol{\beta}_{jl}$ le coefficient rapporté à l'interaction entre les facteurs j et l, x_{il} le niveau du facteur l et enfin ε_i des résidus (erreur pure et erreur d'ajustement).

Sous forme matricielle, l'équation peut s'écrire $Y = X\boldsymbol{\beta} + \varepsilon$. L'équation de surface de réponse se distingue alors de l'équation d'un plan factoriel par l'ajout des termes au carré rendant la modélisation d'une courbure dans la réponse possible. L'erreur pure permet, à partir des points centraux, de savoir si le travail effectué est satisfaisant. Une erreur d'ajustement significative incite à changer de modèle, à ajouter des termes quadratiques par exemple. Les effets d'interactions de troisième et quatrième ordre relativement rares, ont été considérés comme négligeables et n'ont de ce fait pas été intégrés à l'équation. L'interaction entre deux variables quantitatives rend compte de l'effet de la variable x_1 sur Y qui dépend de l'autre variable x_2. Les effets quadratiques

présents en pratique [402,404]. Quelques exemples de surfaces de réponses pour deux facteurs x_1 et x_2 sont donnés *Figure 46* [406].

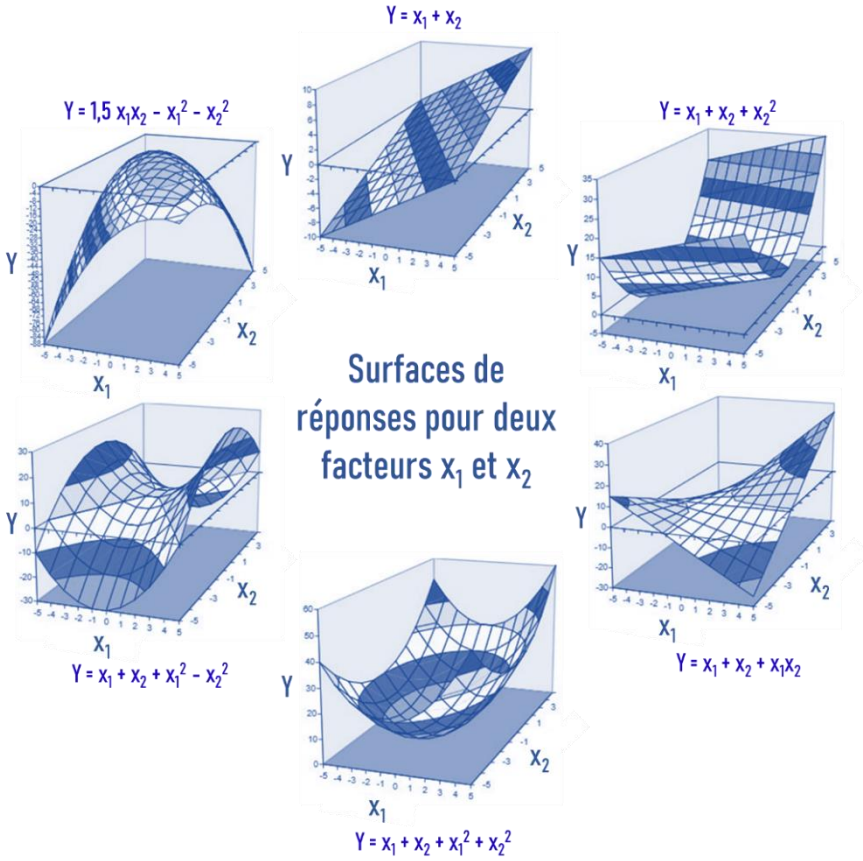


Figure 46. Exemples de surfaces de réponses pour deux facteurs mis en jeu, adaptée de [406].

L'interprétation du plan d'expérience consiste à trouver/préciser les divers coefficients et par conséquent à résoudre un système de *n* équations (s'il y a *n* réponses) et *p* inconnues (s'il y a *p* coefficients). Afin d'obtenir les valeurs β_0, β_1 et β_{11} se rapportant à un facteur (*Figure 47*) [406] avec $Y = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_{11} x^2$, il est possible d'écrire :

$$\begin{cases} Y_{(0)} = \beta_0 \\ Y_{(+1)} = \beta_0 + \beta_1 + \beta_{11} \\ Y_{(-1)} = \beta_0 - \beta_1 + \beta_{11} \end{cases}$$

Et ainsi :

$$\beta_1 : Y_{(+1)} - Y_{(-1)} = 2\beta_1 \Longrightarrow \beta_1 = \frac{Y_{(+1)} - Y_{(-1)}}{2}$$
$$\beta_{11} : Y_{(+1)} + Y_{(-1)} = 2\beta_0 + 2\beta_{11} \Longrightarrow \beta_{11} = \frac{Y_{(+1)} + Y_{(-1)}}{2} - \beta_0$$

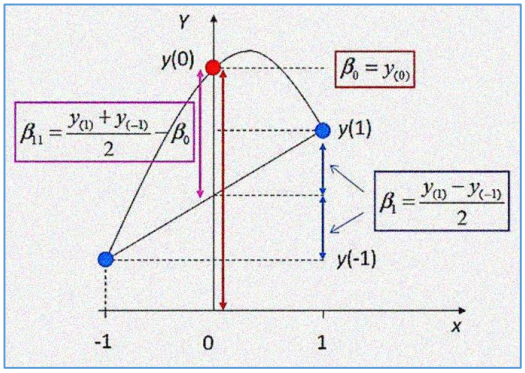


Figure 47. Interprétation des coefficients en régression quadratique, adaptée de [406].

B. TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CARACTERISATION

1. LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE (ULTRA)-HAUTE PERFORMANCE

L'HPLC (ou *high performance liquid chromatography*) est l'une des méthodes séparatives les plus couramment employées, composée de sept modules aux fonctions précises (*Figure 48*). Il s'agit d'une technique de choix pour analyser les constituants non volatils et thermosensibles. La séparation de ces derniers est possible grâce à leurs différentes affinités vis-à-vis des phase mobile et stationnaire, contenue dans une colonne. Chacun des constituants est alors soumis respectivement à une force de mobilité ou éluante et une force de rétention [407,408].

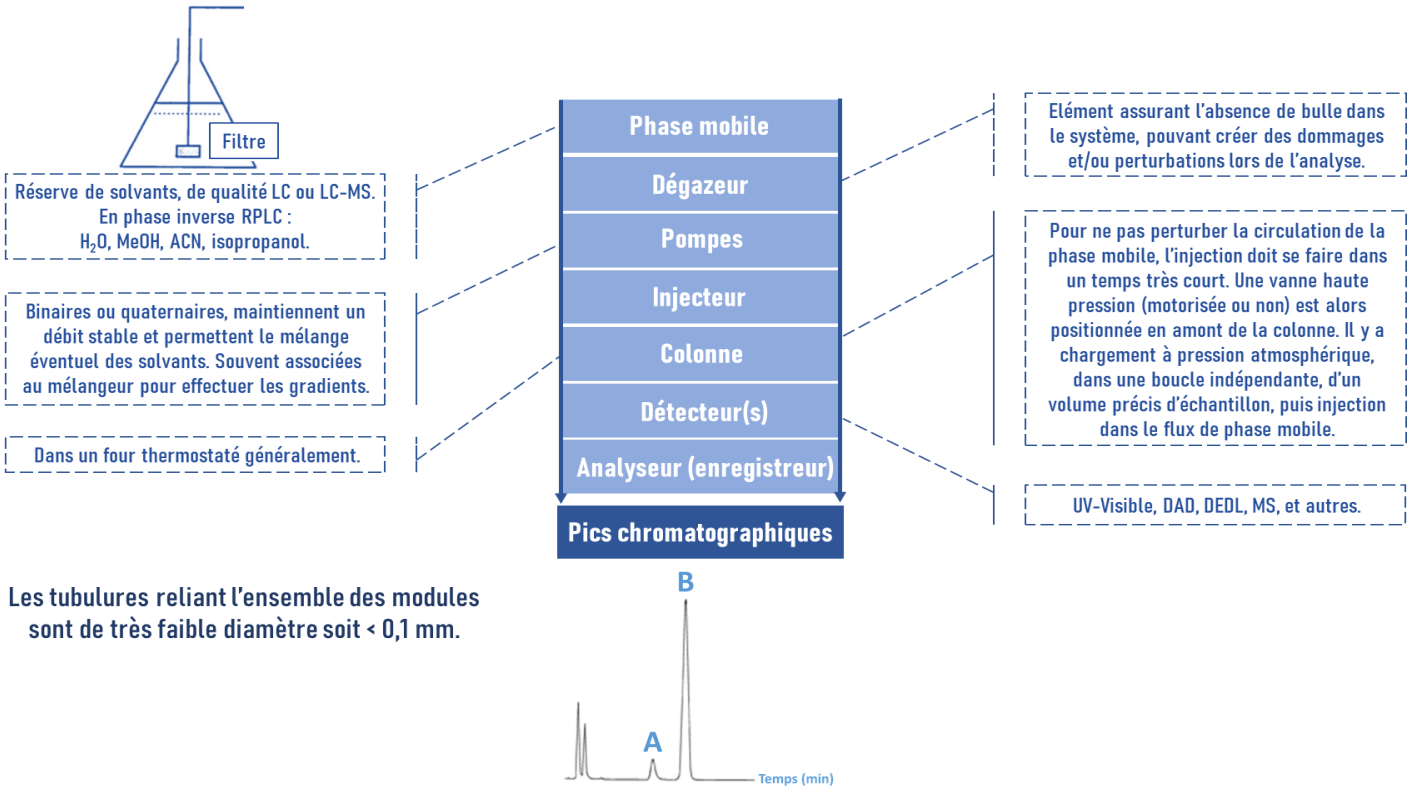


Figure 48. Fonctionnement d'un système HPLC, permettant l'obtention de pics chromatographiques [407,408].

Actuellement, une grande variété de colonnes (types de greffon et dimensions) est disponible, donnant accès à des modes de séparation pluriels : les chromatographies de partage sur phase polaire ou apolaire, d'adsorption, d'affinité, d'échange d'ions ou encore d'exclusion stérique. C'est cependant la chromatographie de partage qui est la plus souvent utilisée [407,408]. Elle est réalisable en mode normal (NPLC ou *normal phase liquid chromatography*), c'est-à-dire avec une phase mobile apolaire et une phase stationnaire polaire (gel de silice), soit en mode inverse (RPLC ou *reversed phase liquid chromatography*) où les polarités des phases se trouvent échangées (silice greffées par des chaînes linéaires de type C18 ou C8 classiquement) [409]. Dans le premier cas, les constituants polaires sont retenus dans la colonne et les apolaires sortent en tête (séparation des molécules hydrophobes) tandis que dans le second cas, ce sont les constituants polaires qui sont élués le plus rapidement

(séparation des molécules hydrophiles). Il y a également le mode alternatif d'interactions hydrophiles (HILIC ou *hydrophilic interaction liquid chromatography*), particulièrement adapté pour la séparation des constituants très polaires comme les glycoprotéines et/ou ionisables, difficilement analysables en RPLC. Les phases mobiles (mode isocratique ou mode gradient) sont principalement des mélanges eau-méthanol (H_2O-MeOH) ou eau-acétonitrile (H_2O-ACN), qui peuvent être acidifiés avec par exemple de l'acide formique ou de l'acide acétique afin d'obtenir une meilleure résolution de pics [407–409].

Basées sur le même principe que l'HPLC, la chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC ou *ultra high performance liquid chromatography*) est ces dernières années largement usitée, répondant aux exigences attendues par les autorités en matière de rapidité, de sélectivité, de sensibilité, et de coût d'analyse [410]. Il est d'ailleurs relativement aisé de transposer une méthode analytique HPLC classique en UHPLC, en prenant en compte notamment les paramètres liés à la géométrie la colonne (longueur, diamètre, taille des particules, volume mort) et les conditions expérimentales (débit, volume injecté). L'UHPLC est capable de délivrer la phase mobile à de très hautes pressions (environ 1 500 bars), et de travailler avec des volumes extra-colonne très réduits, de quelques microlitres [411]. Cette technologie permet de plus de diminuer le temps d'analyse à quelques minutes seulement et la consommation de solvants à la fois coûteux et polluants tout en augmentant significativement la résolution des pics chromatographiques et ainsi l'efficacité (*Figure 49*) [412]. Il est ainsi possible de cribler à haut débit des séries d'échantillons et de quantifier facilement les métabolites ciblés, d'autant plus que les logiciels associés à ces appareillages sont toujours plus performants.

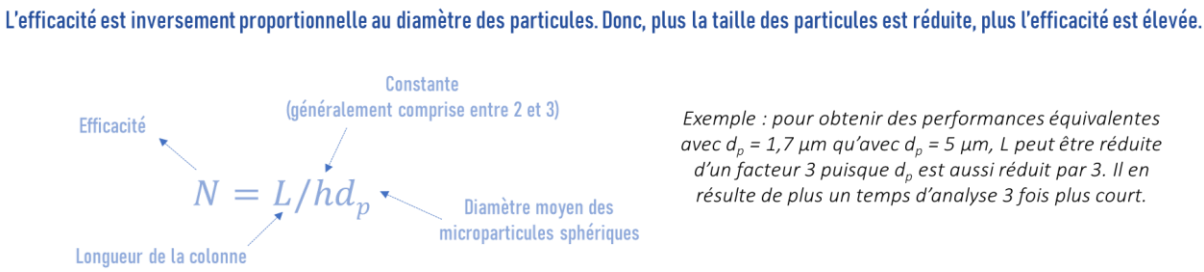


Figure 49. Intérêt de réduire la taille des microparticules sphériques de la phase stationnaire, contenue dans la colonne analytique, adaptée de [411,412].

2. LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (TLC/MS)

Depuis le début du XXIème siècle, les spectromètres de masse ont révolutionné l'usage de la CPL, à la fois très sensibles, sélectifs et quasi-universels. Ils peuvent en effet être couplés à de nombreuses techniques séparatives comme l'(U)HPLC, à l'(HP)TLC ou encore à l'(HP)TLC-bioautographie (voir la *section II. D. 2. de cette étude bibliographique*) [106,107]. Dans le premier cas, la difficulté principale du couplage est de concilier le flux de l'(U)HPLC avec le vide poussé du spectromètre de masse. Dans les deux cas suivants, le couplage se fait par le

biais d'une interface adaptée (*Figure 50*). L'opération se fait manuellement. Pour réaliser ce type d'analyse, des optimisations sont nécessaires (choix du solvant de transport, de la source, du mode d'ionisation positif ou négatif, des paramètres de tensions, débits de gaz au niveau de la source ou encore la gamme de balayage de masses) [413].

La pompe HPLC reliée à l'interface pousse le solvant vers cette dernière avec un faible débit (généralement 0,2 mL/min). L'interface permet alors de désorber le *spot* sélectionné que sur la plaque (HP)TLC en solubilisant son contenu (un ou plusieurs composés) dans le solvant. Ce dernier doit donc être approprié à la famille moléculaire ciblée (désorber les composés de la silice et aider à leur ionisation). Il peut s'agir d'H_2O, de MeOH, d'ACN ou de mélanges, avec ou sans additif, comme l'acide formique. Le contenu est ensuite dirigé vers une source d'ionisation à pression atmosphérique comme la source ESI ou *electrospray ionisation* (voir son principe *Annexe 4*) pour une analyse par MS. Avec l'ESI, il est possible d'ioniser des composés polaires de poids moléculaires faibles à élevés. Avec l'ACN l'ion moléculaire intact ainsi que des ions fragments sont obtenus [413,414].

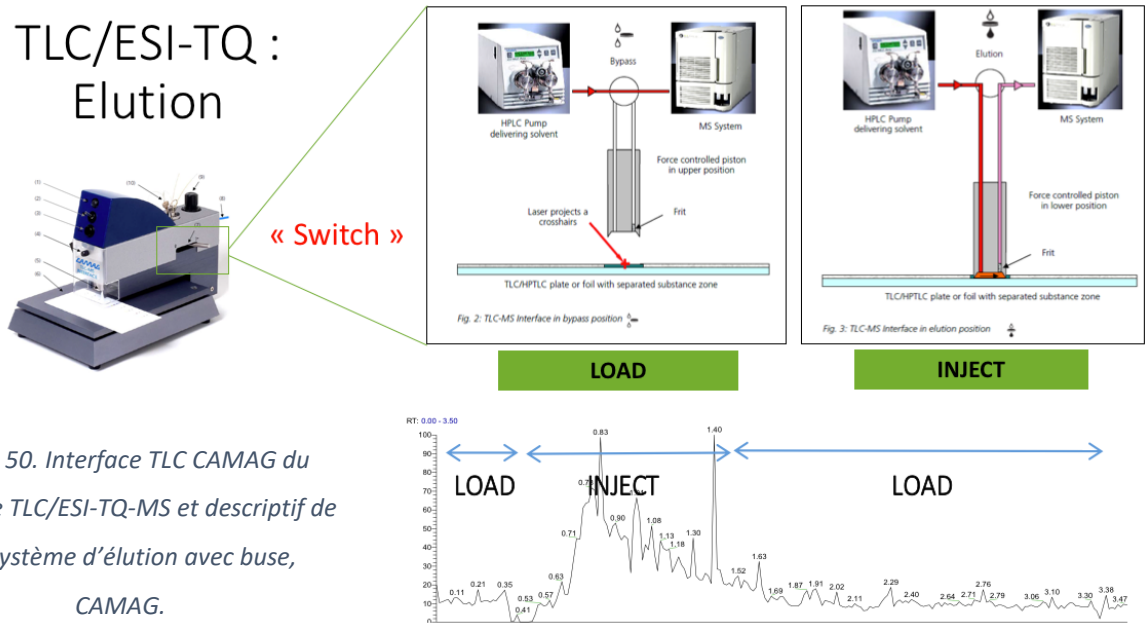


Figure 50. Interface TLC CAMAG du couplage TLC/ESI-TQ-MS et descriptif de son système d'élution avec buse, CAMAG.

L'avantage du couplage TLC/MS est de pouvoir analyser une grande diversité de composés, avec des mécanismes d'ionisation similaires aux couplages HPLC/MS. Son inconvénient majeur à l'inverse réside dans le fait qu'après désorption du *spot*, ce dernier ne peut être analysé qu'une seule fois et uniquement dans une seule configuration de conditions expérimentales. En effet, ce type de couplage est destructif. Par ailleurs, la résolution spatiale de la buse est faible (entre 2 et 4 mm) donc si deux composés ne sont pas suffisamment bien séparés (Rapport frontal ou *Rf* proches), ils peuvent être désorbés et analysés au même moment. Dans ce cas, il peut y avoir une perte d'informations importante (par exemple pour des isomères de position) [413,414]. D'autres inconvénients existent. Il est possible d'avoir du bruit de fond dû à la désorption simultanée de la silice ou encore des problèmes de suppressions d'ions [414].

TRAVAUX REALISES

I. CRIBLAGE ET EVALUATION DES ACTIVITES DERMO-COSMETIQUES DES EXTRAITS BRUTS

A INTRODUCTION

Dans les travaux antérieurs réalisés sur *F. japonica*, *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*, très peu d'activités protectrices dermo-cosmétiques d'extraits divers ont été testées (voir les sections 'chimiodiversité' de l'étude bibliographique). Les activités antioxydantes des trois espèces (notamment déterminée par voie chimique) ont souvent été déterminées. Néanmoins seule l'activité anti-tyrosinase de *F. japonica* a été mise en avant auparavant [140,164,205,267,369,370,415] parmi les cibles enzymatiques étudiées et visées dans ces travaux, impliquées dans le vieillissement de la peau (superoxyde dismutase, hyaluronidase, élastase, collagénase et tyrosinase). Ainsi, dans un objectif de valorisation chimique des trois espèces dans ce secteur, il a été question d'examiner les potentiels dermo-cosmétiques de leurs organes séparés et/ou rassemblés et de mettre en évidence les plus prometteurs.

Pour ce travail, cinq dosages chimiques (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, chélation du fer) et un dosage enzymatique (xanthine oxydase ou XOD) ont été mis en œuvre pour évaluer les activités antioxydantes des espèces. Il s'agit de la première fois où les trois EVEE sont évaluées sur la XOD. Le trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2carboxylique) a servi de référence (contrôle positif) pour l'intégralité des tests chimiques [80,82,416,417]. Les dosages enzymatiques impliquant la hyaluronidase, l'élastase, la collagénase et la tyrosinase ont quant à eux permis la détermination des potentiels de *F. japonica*, *A. artemisiifolia* et *S. canadensis* contre ces diverses cibles pour la première fois (exceptée l'activité anti-tyrosinase de *F. japonica* [205,418]). Des témoins positifs référencés ont été utilisés dans les mêmes conditions expérimentales et concentrations (identiques ou proches) permettant de confronter les résultats obtenus avec les extraits bruts produits ici et de valider l'ensemble des expériences. Pour la hyaluronidase, c'est l'épigallocatechine gallate (EGCG) qui a été employée [87]. Pour l'élastase, l'inhibiteur sélectif choisi était la N-Méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chlorométhyl cétone (A) [419,420]. Pour la collagénase, la 1,10-phénanthroline, monohydratée (B) a servi d'inhibiteur général de métalloprotéinase de la collagénase [421,422]. Enfin, la glabridine (Gla) était l'inhibiteur de référence de la tyrosinase usité [423]. Pour l'ensemble des activités biologiques, l'EtOH a constitué le contrôle négatif. Les efficacités des extraits des trois espèces ont pu être comparés entre elles mais également à celles d'autres plantes présentes dans la littérature [93,424]. En complément, une estimation du contenu en composés phénoliques totaux (TPC, *Total Phenolic Content*) et en flavonoïdes totaux (TFC, *Total Flavonoid Content*) a également été réalisée.

Cette première partie de travaux est ainsi consacrée au criblage et à l'évaluation des activités dermo-cosmétiques des extraits bruts obtenus par macération assistée par ultrasons. Quelques paramètres pouvant influencer le rendement d'extraction ont été étudiés avec *F. japonica*. Les paramètres les plus favorables déterminés ont alors été employés sur l'ensemble des organes ou parties de plantes à l'étude. L'EtOH a été choisi

comme solvant d'extraction éco-compatible dans l'objectif d'accéder à un panel de composés de polarités différentes. Il était d'autre part compatible avec les tests biologiques mis en œuvre. Enfin, la TLC a permis de surligner les principales classes de molécules présentes dans les différents organes et alors d'apprécier les similitudes et dissimilitudes de leurs empreintes moléculaires. Plusieurs travaux utilisant la TLC étaient disponibles sur les trois espèces et plus particulièrement chez *F. japonica* [136,145–147,202,267,343,425–430]. Chez *F. japonica* ont été étudiées notamment les flavan-3-ols, proanthocyanidines, caroténoïdes, stilbènes, flavonols et anthraquinones [136,145–147,202,425,427–430]. Chez *A. artemisiifolia* la présence potentielle d' acides phénoliques et flavonoïdes a été émise [267]. Et chez *S. canadensis*, ont été identifiés des labdanes diterpenes et polyacétylènes [343] ainsi que des acides phénoliques et flavonoïdes [426]. Plusieurs autres classes de molécules ont été évaluées par TLC ici (sucres, lipides, terpènes, composés phénoliques) pour lesquelles aucun travail antérieur n'était disponible avec cette approche. Le principe de déréplication (dépôts de standards déjà répertoriés dans la littérature) a été appliqué pour valider les hypothèses d'identification de molécules constitutives (corrélations de spots). Cette approche préliminaire a aidé à mettre en relation les efficacités des extraits bruts sur les diverses cibles à l'étude avec leurs compositions phytochimiques. Afin de confirmer les interprétations visuelles faites sur les organes des plantes (rassemblement de certains organes en vue de leur valorisation par exemple), des analyses non ciblées de la grande famille des composés polyphénoliques ont été réalisées avec le logiciel rTLC [431]. Cette application en libre-service permet de cartographier le regroupement des échantillons directement à partir de la photographie de la (ou les) plaque(s) d'analyses.

B. EVALUATION DE PARAMETRES INFLUENÇANT LE RENDEMENT D'EXTRACTION A PARTIR DE FEUILLES DE *FALLOPIA JAPONCA*

Dans une étude menée sur le rhizome de *F. japonica* [139], il a été montré qu'un extrait 50% EtOH (ratio solvant/matrice de 0,5/10, température d'extraction 50 °C et bain 40 kHz, puissance ultrasonore de 150 W), présentait des efficacités de transfert de masse et des rendements d'extraction plus élevés en comparaison à la macération classique. Ces travaux avaient permis d'obtenir des rendements respectifs en resvératrol, polydatine et émodine de 3,5 ; 9,2 et 7,8 mg/g. L'objectif de cette section de travaux était de déterminer les conditions les plus favorables (rendement global maximal) à partir, dans notre cas, des feuilles de *F. japonica*. La composition chimique de l'extrait n'est pas étudiée ici (voir *section suivante de travaux I. C.*).

Plusieurs paramètres pouvant avoir une influence sur le rendement d'extraction (temps de l'extraction 0-90 min, ratio matrice végétale (g)/volume EtOH (mL) en contact (0,5/5 ou 0,5/10), type de réacteur ou encore positionnement de l'échantillon au sein du bac à ultrasons) ont alors été évalués. La température a aussi pu être suivie à titre indicatif et mesurée tout au long du processus. La *Figure 51* ci-après illustre l'évolution du rendement d'extraction en fonction de la durée de sonication et selon le type de réacteur utilisé. L'évolution de la température moyenne prise dans les trois extraits produits (pour chaque point) dans le cas de l'utilisation du tube en verre de 12 mL y est également indiquée.

Selon les résultats obtenus dans la *Figure 51*, l'augmentation du rendement semble corrélée avec la montée en température. La même tendance est observée sur l'ensemble des réacteurs et sur les deux ratios testés. Deux phases semblent présentes. En effet, une première phase est visible de 0 à 60 min : la température de la solution et le rendement augmentent au fur et à mesure du temps. Dans le tube en verre, la température moyenne de la solution évolue de 31 °C à 15 min à 66 °C à 60 min pour le ratio 0,5/5 par exemple. Dans cet exemple de plus, les rendements d'extraction moyens sont évolutifs de 2,53 ± 0,56% à 15 min à 7,40 ± 1,32% au bout d'une heure. Et une seconde phase à partir de 60 min d'extraction est constatable : la pente de la température diminue et le rendement tend à se stabiliser dans chacune des expérimentations évaluées. La position de l'échantillon dans le bain à ultrasons n'a d'autre part pas d'impact significatif dans les conditions mises en œuvre ici, comme le suggèrent les valeurs obtenues sur les écarts types plutôt faibles. L'écart type maximal relevé était de 1,53%.

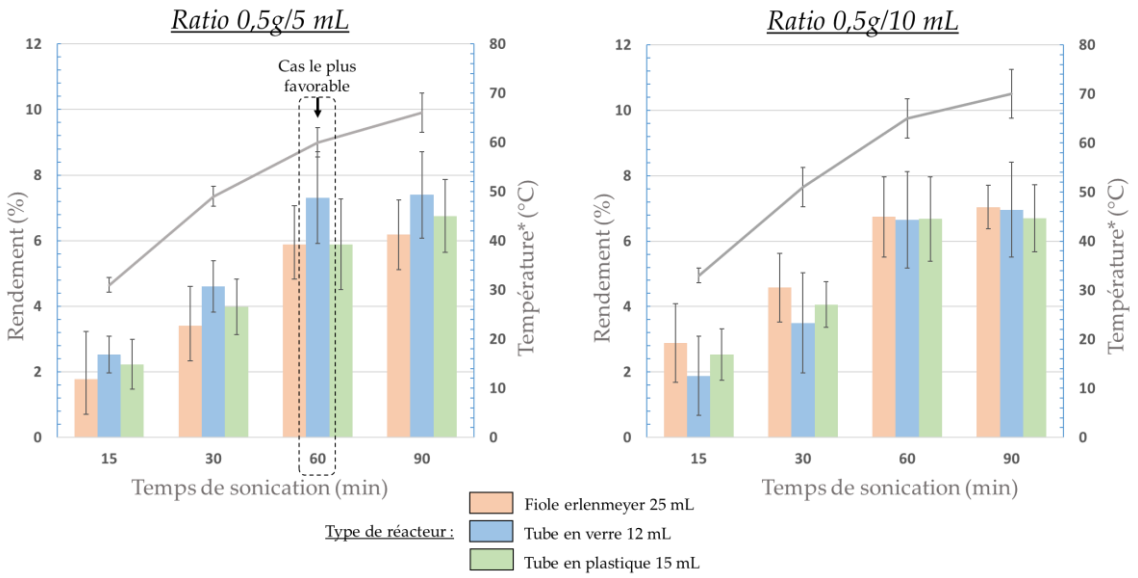


Figure 51. Evolution du rendement d'extraction en fonction de la durée de sonication et du type de réacteur. n = 3 expérimentations indépendantes avec positionnements dans le bac à ultrasons différents (± écart type).
**La température est donnée uniquement dans le cas du tube en verre.*

Pour le ratio 0,5/5, c'est le tube en verre qui permet d'extraire la plus grande quantité de matière tout au long du processus tandis que pour le ratio 0,5/10, cela est le cas avec la fiole erlenmeyer (en considérant uniquement les moyennes). Globalement (en considérant les écarts types qui se chevauchent), à chaque temps donné et pour chacun des deux ratios, les quantités de matières extraites avec les trois types de réacteurs sont du même ordre de grandeur. Pour exemple à 60 min (ratio 0,5/10), les moyennes étaient les suivantes 6,74 ± 1,23%, 6,65 ± 1,48% et 6,68 ± 1,29%, respectivement pour la fiole, le tube en verre et le tube en plastique. Le tube en plastique était coloré en fin de manipulation, il n'a pas été retenu pour éviter tout perte d'informations sur les molécules extractibles.

Les paramètres les plus favorables selon cette étude sont les suivants : tube en verre de 12 mL (positionnement aléatoire dans le bac à ultrasons avec ou sans voisins), 0,5 g de matière végétale au contact de 5 mL d'EtOH, 1 h de sonication. La moyenne des trois températures maximales relevées en solution correspond au bout de 60 min à 60 °C. Ces paramètres ont servi à l'obtention de l'ensemble des extraits de *F. japonica*, *A. artemisiifolia* et *S. canadensis* criblés et évalués pour leurs activités dermo-cosmétiques et pour leur compositions phytochimiques dans cette première partie de travaux.

C. COMPARAISON DE PROFILS POLYPHENOLIQUES D'EXTRAITS DIVERS DE *FALLOPIA JAPONICA*

Les composés polyphénoliques étant souvent liés ou responsables des activités des extraits naturels [217,380,432], il a été question dans cette étude de comparer la composition polyphénolique de l'extrait éthanolique de feuilles de *F. japonica* obtenu dans la section précédente à celles de six autres extraits de typologie de solvants couramment utilisés dans la littérature (hydroalcooliques ou organiques ; voir *Figure 52* pour leur composition) [92,172,202,433]. Ces extraits ont été préparés selon les mêmes conditions opératoires que précédemment et avec la même matière première ; en changeant donc uniquement la composition du solvant d'extraction. Les signatures phytochimiques des différents extraits sont présentées *Figure 52* et leurs richesses moléculaires discutées ensuite. Les rendements d'extraction sont aussi présentés dans cette même *Figure 52*.

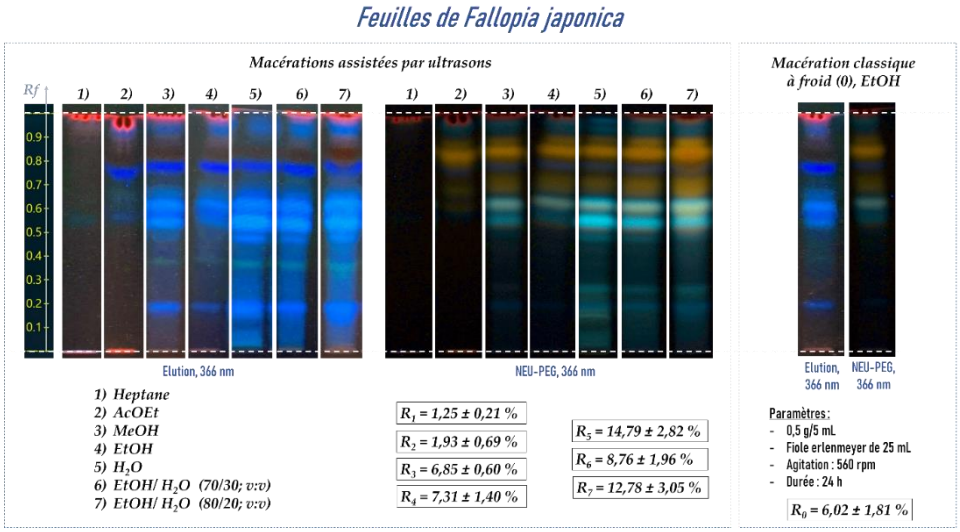


Figure 52. Extractions diverses des feuilles de F. japonica obtenues par macération classique ou assistée avec des ultrasons. Les rendements brutes ($R_{N°}$) sont donnés en %. n = 3 expériences indépendantes (± écart type). Phase mobile : AcOEt:AF:AcOH:H_2O (100:11:11:27) (v:v:v:v). Rf = Facteur de rétention. Dérivations chimiques NEU puis PEG.

Du plus fort au plus faible rendement obtenu dans le cadre de ce travail, les solvants peuvent être classés ainsi : H_2O > EtOH/ H_2O (80/20) > EtOH/ H_2O (70/30) > EtOH > MeOH > AcOEt > Heptane. L'ajout d'eau à l'EtOH permet d'obtenir des rendements plus importants tout en augmentant la plage de polarité des molécules extraites comme le suggèrent les trois profils polyphénoliques 5-7 en comparaison du profil polyphénolique 4. Ces observations sont cohérentes avec les études précédentes [139,172,434–436]. Dans une étude antérieure pour

exemple, un extrait de rhizomes de *F. japonica* obtenu par macération classique à l'AcOEt pendant 48 h avait un rendement de 2,85%, très proche de celui obtenu ici soit 1,93 ± 0,69% (bien que l'organe de la plante et la technique d'extraction soient différents) [172].

L'H_2O peut permettre d'accéder à des composés polaires tels que les sucres, les acides phénoliques ou encore les flavanols et anthraquinones [139,434–437]. Si toutes les classes de composés extractibles ne sont pas observées ici, les différences de rendements présentées pour les macérations hydroalcooliques suggèrent des différences de compositions chimiques ou des différences en termes de teneurs des composés communs extraits. En revanche, la réplicabilité sur les trois macérations hydroalcooliques est moins bonne (écarts types élevés) qu'avec les solvants organiques purs (exemple avec l'heptane où l'écart type a une valeur de 0,21% ; écart type plus faible).

Le profil phytochimique de l'extrait heptanoïque, qui est un solvant apolaire toxique, rend compte de la pauvreté de l'extrait en composés polyphénoliques. Seuls des spots rouges sont visibles à 366 nm en front de solvant pouvant être des chlorophylles apolaires. L'AcOEt est un solvant hydrophobe de polarité moyenne, peu toxique, qui donne accès à une plage relativement restreinte de composés polyphénoliques moyennement polaires à apolaires comme le suggère l'empreinte phytochimique 2 (*Rfs* 0,50 à 1,00). De plus, les spots sont diffus et mal définis. Le MeOH, solvant toxique, est souvent utilisé pour extraire les organes de *F. japonica* [202,433]. Il rend possible l'accessibilité à une large gamme de molécules de polarité différentes comme présenté *Figure 52*, profil phytochimique 3. Ce dernier est riche en composés polyphénoliques en comparaison aux profils 1 et 2 (heptane et AcOEt). Plusieurs composés semblent néanmoins communs entre les profils méthanolique et AcOEt sur la plage de polarité *Rfs* 0,5 à 1. Deux spots orangés aux *Rfs* 0,7 peu intense et 0,8 fort intense sont notamment observés ainsi qu'un spot bleu peu intense *Rf* 0,95 ou encore en front de solvant un spot rouge (coloration NEU-PEG ; NEU = amino-2-éthyle diphénylborate et PEG = polyéthylène glycol). A 366 nm, que ce soit lors de l'élution ou après révélation chimique, le profil 4 de l'extrait éthanolique est similaire à celui de l'extrait méthanolique 3. L'EtOH moins toxique que le MeOH, éco-compatible donne accès aux mêmes types de molécules polyphénoliques. Les rendements entre ces deux macérations sont par ailleurs très proches 7,31 ± 1,40% et 6,85 ± 0,60% respectivement pour l'EtOH et le MeOH.

Les profils polyphénoliques des extraits hydroalcooliques (*Figure 52*, 5-7) obtenus sont très proches entre eux. Si la grande majorité des molécules est commune pour les extraits EtOH et MeOH, l'ajout d'eau permet d'accéder à de nouvelles molécules polaires non présentes dans ces extraits (*Rfs* 0 à 0,3 notamment en NEU-PEG). L'eau seule présente cependant un profil en trainée avec une grande diffusivité des spots ; donnant probablement lieu à plus de co-élutions. Il se pourrait également que la plus forte intensité des spots comparée à celles des spots des deux autres extraits hydroalcooliques soit une résultante de teneurs plus importantes en composés. En fonction des actifs d'intérêt, il apparaît donc important d'évaluer cet ajout d'eau à l'EtOH afin de maximiser éventuellement leurs quantités (voir la seconde partie des travaux *II. B. 6.*). Enfin, les profils polyphénoliques obtenus par macération classique et par macération assistée par ultrasons sont semblables. Les quantités de

matière extraite pour les deux extractions éthanoliques sont du même ordre de grandeur, 6,02 ± 1,81% et 7,31 ± 1,40% respectivement ; avec des écarts types similaires. La moyenne des rendements des trois extractions est cependant plus haute pour la macération assistée par ultrasons, et ce dans un temps d'extraction bien plus faible (1 h au lieu de 24 h pour la macération sous agitation classique).

Qualitativement, l'extrait de feuilles de *F. japonica* produit, contiendrait après révélation NEU-PEG des composés de type acides phénoliques (spots bleus), des flavonoïdes (spots orangés), des anthraquinones (spots marrons) ou encore des chlorophylles (spots rouge). Les spots bleutés pourraient correspondre aux stilbènes resvératrol et polydatine par exemple *Rf*0,75 et le spot *Rf*0,80 pourrait correspondre à l'émodine. Ces résultats sont cohérents avec l'étude menée sur le rhizome de *F. japonica* [139], où ces trois composés (resvératrol, polydatine et émodine) avaient pu être extraits par ultrasons.

D. DETERMINATION DES ACTIVITES DERMO-COSMETIQUES

1. DETERMINATION DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES

a) DISCUSSION AUTOUR DES RESULTATS OBTENUS PAR VOIE CHIMIQUE

Parmi les trois EVEE à l'étude dans ces travaux, *F. japonica* est celle qui a le plus été étudiée pour ses propriétés antioxydantes contenant un des plus connu antioxydant (resvératrol) *via* la mise en œuvre de dosages multiples (DPPH, FRAP, ABTS, SOD, *etc.*) [143,159,161]. Ces pourquoi seuls les résultats obtenus avec le dosage DPPH sont présentés *Figure 53* pour cette plante tandis que l'ensemble de ceux acquis avec les dosages ABTS, CUPRAC, FRAP et la chélation du fer sont exposés en *Annexe 5*. Pour *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*, l'intégralité des résultats sont donnés *Figures 54* et *55*. Les essais de CUPRAC et de chélation du fer n'ont pas été rapportés dans la littérature pour *A. artemisiifolia*. De façon générale, les extraits bruts produits des trois espèces avaient de fortes capacités antioxydantes en accord avec les études précédentes réalisées [143,159,161,266–269,316,325,350,351,353,369].

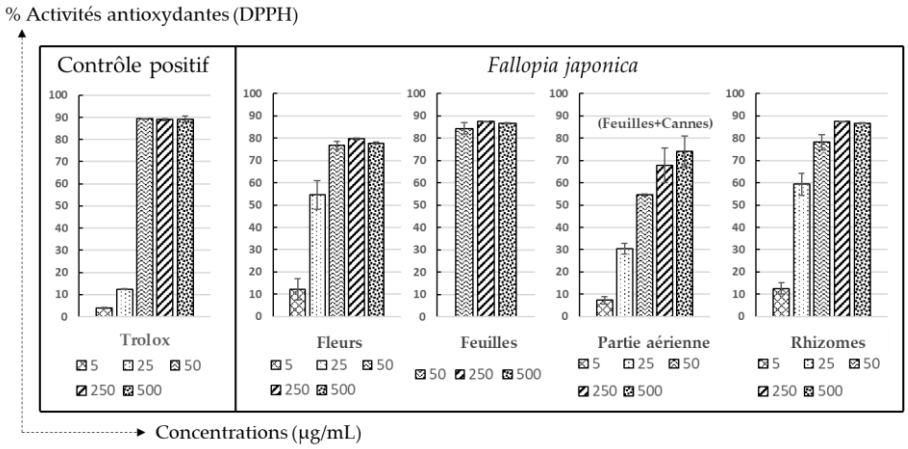


Figure 53. Evaluation des capacités antioxydantes DPPH de feuilles, de fleurs, de la partie aérienne et de rhizomes de F. japonica. n = 3 expériences indépendantes pour chaque concentration testées (µg/mL). Les barres d'erreur représentent ± écart type.

Pour *F. japonica*, l'extrait de rhizomes possède l'activité anti-radicalaire DPPH la plus importante par rapport à l'extrait de partie aérienne (composée de feuilles et cannes) pour toutes les concentrations testées (par exemple 86,72 ± 2,48% et 74,06 ± 7,01% à 500 g/mL, respectivement). Si on regarde les extraits des organes aériens séparés de l'espèce, à savoir de fleurs et de feuilles, il s'avère que les capacités antioxydantes sont améliorées pour les mêmes concentrations évaluées en comparaison de l'extrait de partie aérienne. Il se pourrait donc que les cannes associées aux feuilles diminuent le caractère protecteur global de l'extrait de partie aérienne. Sur les deux plus faibles concentrations évaluées (5 et 25 µg/mL), les extraits de partie aérienne et de rhizomes ont un pouvoir antioxydant supérieur au trolox dans les mêmes conditions (*Figure 53*). Ces résultats confirment ce qui avait été observé précédemment avec les extraits éthanoliques de la plante, bien que les protocoles opératoires puissent légèrement différés [143,159,161]. En effet, l'extrait de rhizomes s'était révélée être un meilleur antioxydant que l'extrait de partie aérienne [143]. Cependant, à 500 g/mL, il avait des pourcentages d'activité DPPH légèrement plus faible que dans notre travail (c'est-à-dire 65 à 75%), sinon en corrélation avec leur forte teneur en phénols et flavonoïdes [159,161].

Concernant les dosages ABTS, CUPRAC, FRAP et la chélation du fer (*Annexe 5*), les extraits de feuilles et de fleurs de *F. japonica* ont montré de forts pouvoirs antioxydants également ; comparables au trolox aux mêmes concentrations (50, 250 et 500 µg/mL). L'effet à ces trois plus hautes concentrations examinées est saturant et n'apporte que peu d'informations notamment si l'on voulait comparer les deux organes entre eux. Pour apprécier d'avantage l'effet dose-réponse, il aurait aussi fallu évaluer des concentrations plus faibles en extraits, par exemple 5 et 25 µg/mL (comparaison possible avec le trolox).

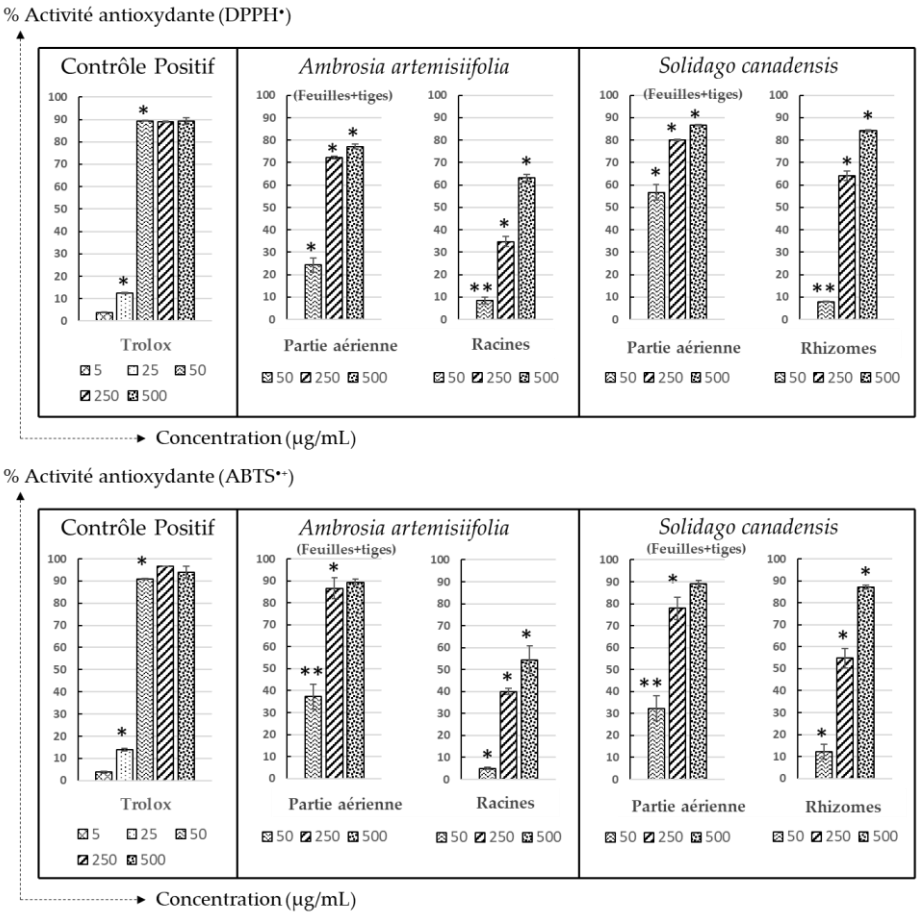


*Figure 54. Détermination des activités antioxydantes (DPPH, ABTS) des extraits d'A. artemisiifolia et S. canadensis. *significativement différent p < 0,05 et ** significativement différent de l'autre mais pas significativement différent entre eux. n = 3 expériences indépendantes pour chaque concentration (µg/mL). Les barres d'erreur représentent ± écart type.*

Les résultats présentés sur la *Figure 54* révèlent les mêmes tendances entre les deux tests basés sur le mécanisme de transfert d'un atome d'hydrogène et d'un électron (DPPH• et ABTS•+). En effet, *A. artemisiifolia* et *S. canadensis* ont des activités antioxydantes modérées (à 50 µg/mL) à fortes (> 50 µg/mL) par rapport au trolox, avec des effets dose-réponse. De plus, les parties aériennes (composées de feuilles et de tiges) sont de meilleurs antioxydants que leurs parties racinaires respectives (racines et rhizomes) aux mêmes concentrations. Ces dernières, bien que moins actives, représentent une source précieuse qui pourrait être combinée avec les organes aériens.

L'extrait de rhizomes de *S. canadensis* est plus antioxydant que l'extrait de racine d'*A. artemisiifolia*, aux trois concentrations testées. Cependant, il s'avère en comparant les parties aériennes entre elles que les résultats diffèrent légèrement d'un essai à l'autre. En effet, pour le dosage DPPH, la partie aérienne de *S. canadensis* présente une capacité antioxydante supérieure (à chaque concentration évaluée) à celle de la partie aérienne d'*A. artemisiifolia.* A 50 µg/mL, les pourcentages d'inhibition du DPPH sont respectivement de 24,3 ± 3,2% et 56,7 ± 3,4%. En revanche, pour le test ABTS, les extraits des parties aériennes des deux plantes ont des activités antioxydantes similaires, avec des pourcentages d'inhibition très proches sur toute la plage de concentration. Il a été précédemment montré que des écarts pouvaient apparaître entre les dosages DPPH et ABTS, notamment en raison de structures stéréochimiques et de stabilités différentes des radicaux ABTS•+ et DPPH•, de polarité ou encore de solubilité des extraits [416].

Pour les tests CUPRAC, FRAP et de chélation du fer, tous les extraits produits présentent de fortes capacités antioxydantes (*Figure 55*). A 250 et 500 µg/mL, les activités observées sont maximales, avec un effet plateau. Ainsi, il est préférable d'utiliser la concentration la plus faible (50 µg/mL) pour discuter des différences entre les organes. A 50 µg/mL, les extraits de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* et de *S. canadensis* ont des capacités antioxydantes similaires, proches du trolox. Par exemple, le contrôle positif, les extraits de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* et de *S. canadensis* ont respectivement des pourcentages de CUPRAC (à 50 µg/mL) de 92,6 ± 0,2%, 83,5 ± 1,1% et 86,5 ± 1,6%. Les parties aériennes des deux espèces sont également des antioxydants plus puissants que la RPA et la RPS comme c'est le cas pour les dosages DPPH et ABTS. De plus, à 50 µg/mL pour les dosages CUPRAC et de chélation du fer, l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* est plus actif que l'extrait de racines d'*A. artemisiifolia* comme pour les dosages DPPH et ABTS tandis que pour le dosage FRAP, l'extrait de racines d'*A. artemisiifolia* est un meilleur antioxydant que l'extrait de rhizomes de *S. canadensis*. Enfin, les résultats suggèrent que les antioxydants présents dans les quatre extraits peuvent facilement former un complexe métallique (test de chélation du fer). Les quatre extraits ont également des capacités élevées de réduction du cuivre (dosage CUPRAC) et du fer (dosage FRAP), suggérant que les antioxydants agissent également facilement par transfert d'électrons. Ces antioxydants pourraient avoir une structure spécifique comme celle des flavonoïdes et des acides phénoliques [438]. De plus, les dosages ABTS et CUPRAC tiennent compte à la fois des antioxydants hydrophiles et lipophiles, tandis que le dosage FRAP ne tient compte que des antioxydants hydrophiles ou le dosage DPPH que des systèmes hydrophobes [416].

Que ce soit pour *A. artemisiifolia* ou pour *S. canadensis*, plusieurs études antérieures confirment les résultats obtenus [266–269,316,325,350–353,369]. En effet, pour *A. artemisiifolia*, divers extraits de différents solvants et organes ont présenté de fortes activités antioxydantes, corrélées à des niveaux élevés de polyphénols et de flavonoïdes [266–269]. Un extrait aqueux des sommets herbacés fleuris d'*A. artemisiifolia* avait montré une inhibition DPPH de 85 et 90% à 50 et 250 µg/mL, respectivement. Ce même extrait avait également exprimé une capacité significative à réduire Fe^{3+} et donc, une capacité à donner des électrons, lors du test FRAP [267]. Dans cet autre exemple, un extrait de type *Tinctura solidaginis* présentait une inhibition de 67% à 50 µg/mL [352] ; légèrement inférieur à ce qui a été observé ici. Ceci pourrait être dû au solvant d'extraction qui est différent (70% EtOH et 100% EtOH dans notre cas) amenant à des compositions chimiques différentes.

Pour conclure sur les trois espèces, en considérant la concentration intermédiaire (250 µg/mL), les potentiels antioxydants sont déterminés comme étant dans l'ordre suivant : trolox > fleurs *F. japonica* > rhizomes *F. japonica* >ou= feuilles *F. japonica* > partie aérienne de *S. canadensis* > partie aérienne d'*A. artemisiifolia* > rhizomes de *S. canadensis* > racines d'*A. artemisiifolia* pour les dosages DPPH. Les organes des trois plantes sont globalement de très bons antioxydants.

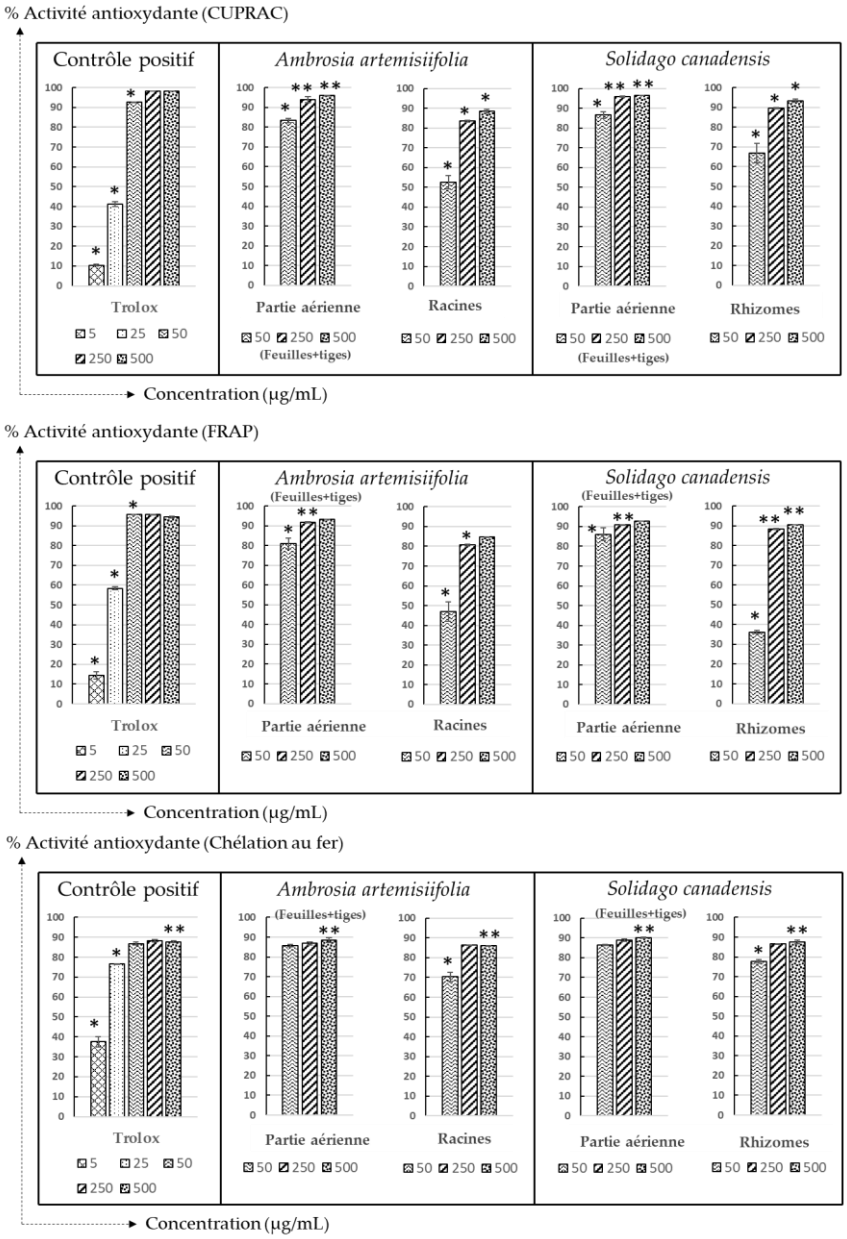


*Figure 55. Détermination des activités antioxydantes (CUPRAC, FRAP et chélation au fer) des extraits d'A. artemisiifolia et S. canadensis. n = 3 expériences indépendantes pour chaque concentration (µg/mL). Les barres d'erreur représentent ± écart type. *significativement différent p < 0,05 et ** significativement différent de l'autre mais pas significativement différent entre eux.*

b) DISCUSSION AUTOUR DES RESULTATS OBTENUS PAR VOIE ENZYMATIQUE

Dans ces travaux, ont été testés sur la xanthine oxydase pour la première fois (équivalent activité SOD) les extraits bruts des trois espèces à deux concentrations (20 et 80 µg/mL) afin d'évaluer leurs capacités protectrices contre les ROS (*Figure 56*).

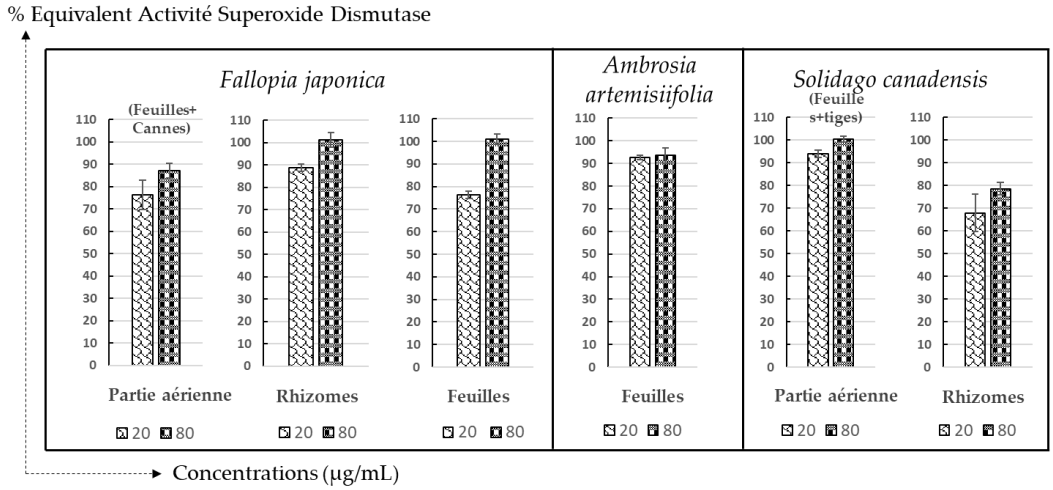


Figure 56. Equivalent activité superoxide dismutase des extraits éthanoliques bruts de F. japonica, A. artemisiifolia et S. canadensis de Savoie Mont Blanc. n = 3 expériences indépendantes pour chaque concentration testées (µg/mL). Les barres d'erreur représentent ± écart type.

Chez *F. japonica* l'inhibition de la XOD est plus prononcée pour l'extrait de rhizomes que celui sa partie aérienne, avec un effet dose-réponse. Les feuilles seules quant à elles ont une capacité protectrice similaire à plus forte (respectivement pour 20 et 80 µg/mL) que lorsqu'elles sont en association avec les cannes. L'extrait de rhizomes a donc une capacité SOD équivalente légèrement supérieure à celle de l'extrait de partie aérienne à la même concentration (20 µg/mL), soit 88,76 ± 1,65% et 76,53 ± 6,55%, respectivement.

A partir d'extraits méthanoliques de *F. japonica* récoltés à Kochi [439], les capacités antioxydantes des divers organes de la plante et du resvératrol ont été mis en évidence (rhizomes et tubercule > feuilles et tiges > resvératrol). Ces résultats précédents confirment notre tendance même si les solvants d'extraction sont divers. De plus, même si le resvératrol est un actif réputé du genre *Fallopia*, sa contribution antioxydante s'est avérée faible suggérant que d'autres molécules participaient à l'activité globale des extraits [439]. Dans une autre étude réalisée *in vivo* sur des souris avec un traitement induit par la doxorubicine cardiomyopathie de stress oxydatif [194], le resvératrol et sa forme glycosylée (polydatine) ont montré qu'ils augmentaient les niveaux de SOD, de catalase et de glutathion peroxydase dans le plasma et réduisaient considérablement la teneur en malondialdéhyde dans le tissu myocardique, une réflexion du stress oxydatif. De plus, la transformation mutuelle

in vivo entre la polydatine et le resvératrol a maintenu l'équilibre, ce qui peut alors signifier que la polydatine pourrait remplacer le resvératrol dans les antioxydants à usage clinique.

Chez *S. canadensis*, l'inhibition de la XOD est plus prononcée pour l'extrait de partie aérienne que l'extrait de rhizomes avec des effets dose-réponse. Ceci suggère que la partie aérienne de l'espèce présente de meilleures capacités antioxydantes que sa partie souterraine, comme cela a été observé auparavant avec les tests chimiques *in vitro*. A 20 µg/mL par exemple, l'extrait de partie aérienne a une activité de 93,9 ± 1,7% et celui de rhizomes de 67,9 ± 8,2%. Dans cette étude, il a été montré que l'extrait éthanolique de feuilles de *S. canadensis* avaient une activité antioxydante plus élevée que celui de ses écorces ; appuyant nos résultats [296].

Chez *A. artemisiifolia*, les feuilles seules ont une capacité protectrice importante égalant celle de la partie aérienne de *S. canadensis* soit à 20 µg/mL, 92,5 ± 0,9%. Il est probable que les feuilles d'*A. artemisiifolia* aient présenté des activités antioxydantes selon les divers tests chimiques réalisés, proches de celles observées pour sa partie aérienne. Dans une étude antérieure où divers plantes médicinales jordaniennes on été évaluées *in vitro* pour leurs pouvoirs inhibiteurs de la xanthine oxidase, une inhibition de cette dernière oxydoréductase de 49,5%, à 200 µg/mL avait été trouvée chez *Achillea fragrantissima* (Forssk.) Sch. Bip. faisant partie des *Asteraceae* (tout comme *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*). En comparaison avec nos résultats sur ces deux plantes, l'inhibition de cette espèce jordanienne était bien plus faible pour une concentration 10 fois supérieure testée. Une *Solanaceae* (*Hyoscyamus reticulatus L.*) quant a elle avait une inhibition se rapprochant davantage de nos résultats mais toujours pour une concentration 10 fois plus haute [440]. Ceci pourrait être dû aux protocoles opératoires des tests qui sont légèrement variants ou simplement aux types de plantes.

2. EVALUATION DES EFFETS INHIBITEURS

a) SUR LA HYALURONIDASE

Sur la hyaluronidase ont été criblés les extraits bruts des organes seuls ou en mélange de *F. japonica*, *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*. Quelques exemples d'électrophérogrammes obtenus dans ce travail avec l'électrophorèse capillaire sont donnés dans la *Figure 57*. Les résultats obtenus sur la cible enzymatique hyaluronidase sont présentés dans la *Figure 58*.

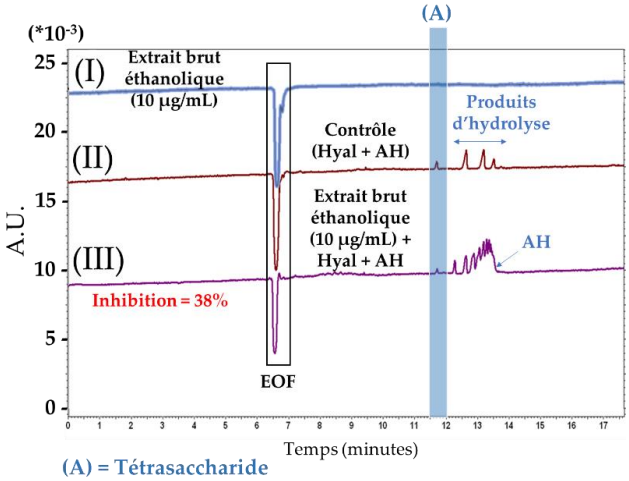


Figure 57. Exemples d'électrophérogrammes (I-III) montrant l'effet inhibiteur sur la hyaluronidase d'un extrait éthanolique brut de partie aérienne de F. japonica. (I) Extrait à 10 µg/mL ; (II) Dosage enzymatique en l'absence de l'extrait et (III) Dosage enzymatique en présence de l'extrait à 10 µg/mL. Hyal : hyaluronidase et AH : acide hyaluronique. Identification des pics : flux électroosmotique (EOF) à 6,5 min et pic (A) : tétrasaccharide migrant à 11,7

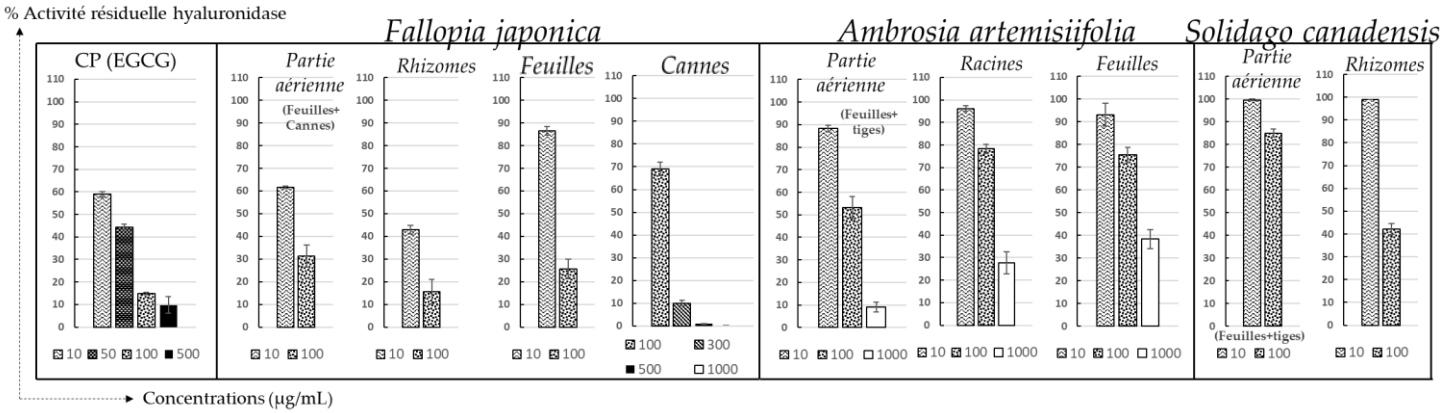


Figure 58. Evaluation de l'activité résiduelle hyaluronidase des extraits de F. japonica, A. artemisiifolia et S. canadensis. CP = contrôle positif et (EGCG) = gallate d'épigallocatéchine. n = 3 expériences indépendantes pour chaque concentration (µg/mL). Les barres d'erreur représentent ± écart type.

Sur la hyaluronidase (*Figure 58*), les résultats révèlent des différences d'efficacités significatives entre les extraits des trois espèces. L'intégralité des extraits a répondu de manière dose-dépendante tout comme le témoin positif choisi (EGCG [87]). En observant les diverses activités résiduelles à la concentration la plus faible (10 µg/mL), les inhibitions les plus élevées observées (de 100 à 0%) sont chez *F. japonica*. L'extrait de ses rhizomes dépasse même l'inhibition observée de l'EGCG soit à 10 µg/mL 42,90 ± 1,84% pour 58,92 ± 1,19%, respectivement. A 100 µg/mL, les feuilles de *F. japonica* ont une activité résiduelle hyaluronidase légèrement supérieure à celle de la partie aérienne de la plante (25,60 ± 4,30%) alors que ses fleurs en ont une plus faible (69,00 ± 3,04%). Les fleurs n'étant pas présentes dans la partie aérienne ici (exclusivement composée de feuilles et cannes), cela pourrait expliquer pourquoi la partie aérienne a une efficacité plus proche de celle des feuilles. Par ailleurs, les électrophérogrammes (*Figure 57*) représentent l'extrait brut éthanolique de la partie aérienne de *F. japonica* à 10 µg/mL (I), le dosage enzymatique se déroulant normalement en l'absence de l'extrait végétal (II) et en la présence de 10 µg/mL de l'extrait brut (III), confirmant l'absence d'interférents avec le tétrasaccharide (pic A), le produit final de l'hydrolyse de HA. Les concentrations à 50 et 500 µg/mL n'ont pas été testées cependant avec l'observation du contrôle positif, il semble que la même tendance pourrait être observée.

Si *F. japonica* présente une activité activité anti-hyaluronidase forte, les efficacités observées chez *A. artemisiifolia* et *S. canadensis* peuvent être considérées comme faibles à modérées. A la concentration la plus faible testée, *A. artemisiifolia* et *S. canadensis* ont des comportements très proches entre elles avec des activités résiduelles hyaluronidase très faibles à nulles, allant de 87% à 100%. A 100 µg/mL en revanche, les inhibitions enzymatiques sont plus importantes. C'est l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* qui est le plus fort inhibiteur montrant une activité résiduelle de 42,20 ± 2,39%, suivi par l'extrait de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* avec 53,18 ± 5,03%. L'extrait de feuilles d'*A. artemisiifolia* quant à lui, présente une activité anti-hyaluronidase similaire à celle de l'extrait de rhizomes de *S. canadensis*. La proportion des tiges par rapport à la proportion de feuilles dans la partie aérienne d'*A. artemisiifolia* étant bien plus conséquente, il se pourrait que ce soient les tiges qui lui donnent ce fort caractère inhibiteur contre la hyaluronidase. Enfin, la partie aérienne de *S. canadensis* ne dévoile qu'une faible inhibition, proche de celle des racines et feuilles d'*A. artemisiifolia*. Pour obtenir une efficacité

semblable au témoin positif EGCG à 500 µg/mL soit 9,81 ± 3,70%, il faut utiliser une concentration deux fois plus élevée en extrait de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* (9,11 ± 2,11% à 1 000 µg/mL). *F. japonica* atteint une activité résiduelle hyaluronidase de cet ordre à seulement 100 µg/mL (extrait de rhizomes : 15,64 ± 5,43%). Par ailleurs, pour *A. artemisiifolia* et *S. canadensis* de potentiels anti-hyaluronidases faibles à modérés, il a été question dans la suite de nos travaux (voir la troisième partie *III. B.*) de tester leurs capacités sur la lipase, cible enzymatique du domaine de la nutraceutique, complémentaire à la hyaluronidase [101,441,442].

Dans une étude antérieure criblant et évaluant les activités anti-hyaluronidases de 22 extraits (70% EtOH) de plantes halophytes différentes [424], les deux extraits les plus prometteurs étaient (dans la concentration testée 1 000 µg/mL) celui de *Salicornia europaea* avec une activité résiduelle hyaluronidase de 27,30 ± 1,24% et celui de *Chenopodium glaucum* avec 42,27 ± 2,36%. Avec 10 µg/mL (soit 100 fois moins que la concentration testée dans l'étude [424]), l'extrait de rhizomes de *F. japonica* atteint 42,90 ± 1,84%, proche de celle de *Chenopodium glaucum*. L'extrait de rhizomes de *F. japonica* a une activité plus faible que celle de *Salicornia europaea* à 100 µg/mL seulement.

b) SUR L'ELASTASE

Les résultats obtenus sur l'élastase sont présentés *Figure 59*. Le contrôle positif N-méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Valchlorométhyl cétone (ou CP(A)) utilisé ici est connu comme un fort inhibiteur de cette cible [419,420]. La concentration la plus élevée testée pour ce dernier était de 5 µg/mL, soit la moitié de la concentration la plus faible testée pour les extraits. Il s'avère qu'à 5 µg/mL, son inhibition est bien supérieure à celle observée pour les extraits à 10 µg/mL. Probablement donc que pour une concentration doublée en CP(A), son inhibition serait encore plus élevée et la différence avec celles des extraits encore plus grande.

Sur l'élastase, c'est également *F. japonica* qui montre le meilleur potentiel et notamment sa partie aérienne et ses rhizomes ou le mélange de ces deux parties (répondant tous de façon dose-dépendante). Pour avoir une efficacité similaire à celle observée à 0,5 µg/mL pour le témoin positif (77,42 ± 2,14%), l'extrait de partie aérienne à 50 µg/mL (100 fois plus concentré par rapport à 0,5 µg/mL) ou l'extrait de rhizomes à 10 µg/mL (20 fois plus concentré par rapport à 0,5 µg/mL) pourraient être utilisés dans les conditions de dosage proposées avec des efficacités respectives de 76,49 ± 5,95% et 80,42 ± 4,73%. Dans cette étude antérieure où 22 extraits d'halophytes diverses ont été criblés pour leur capacité anti-élastase, le meilleur candidat était la *Salicornia europaea* avec une activité résiduelle élastase de 25,12 ± 4,84% à 1 000 µg/mL. En comparaison, l'extrait de partie aérienne de *F. japonica* présente à 100 µg/mL une activité proche de 16,16 ± 3,58% néanmoins pour une concentration 10 fois moindre. A 100 µg/mL dans une autre étude, un extrait de racines de *Cymbidium* présentaient une activité résiduelle élastase d'environ 65% [93]; faisant de l'extrait de partie aérienne *F. japonica* un meilleur candidat.

Pour les deux autres espèces *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*, les organes de même type ont un comportement similaire vis-à-vis de l'élastase. Les résultats obtenus révèlent des effets dose-réponse sur

l'ensemble des organes, exceptés pour les extraits de parties racinaires. De fait, ces derniers expriment un effet dit non-monotone [443,444] (en forme de 'U inversé' ou 'en cloche'). Ces résultats sont surprenants et assez différents de ce qui a pu être observé chez *F. japonica* ou le témoin positif. Ils tradusient, pour ces échantillons de racines ou rhizomes, le passage d'un effet activateur aux faibles concentrations à un effet inhibiteur à fortes concentrations [445]. En regardant les extraits de parties aériennes, bien que présentant un effet dose-réponse qualifié de monotone quant à eux, montrent une certaine similitude à ce qui a été observé avec les extraits de parties racinaires : une activation à faible dose puis une inhibition de plus en plus prononcée à forte dose. Ce type de phénomène doses-réponses non monotones représente un enjeu crucial dans l'évaluation des risques et des seuils de toxicité, difficiles à modéliser et sujets aux controverses [445]. Si l'activation de l'élastase n'est pas recherchée, à forte dose elle laisse place à des effets bénéfiques recherchés sur cette cible. D'autre part les mélanges ont un potentiel plus élevé que les parties de plantes séparées. Pour exemple chez *A. artemisiifolia*, les activités résiduelles élastase sont de 32,25 ± 6,44%, 60,35 ± 5,20% et 84,93 ± 5,37% respectivement pour le mélange, la partie aérienne et les racines. Enfin, les tiges se rapprochent davantage des parties aériennes que les feuilles, ce qui est cohérent avec leur plus forte abondance dans la partie aérienne. Pour conclure sur cette cible, la totalité des extraits présentent de faibles potentiels anti-élastase.

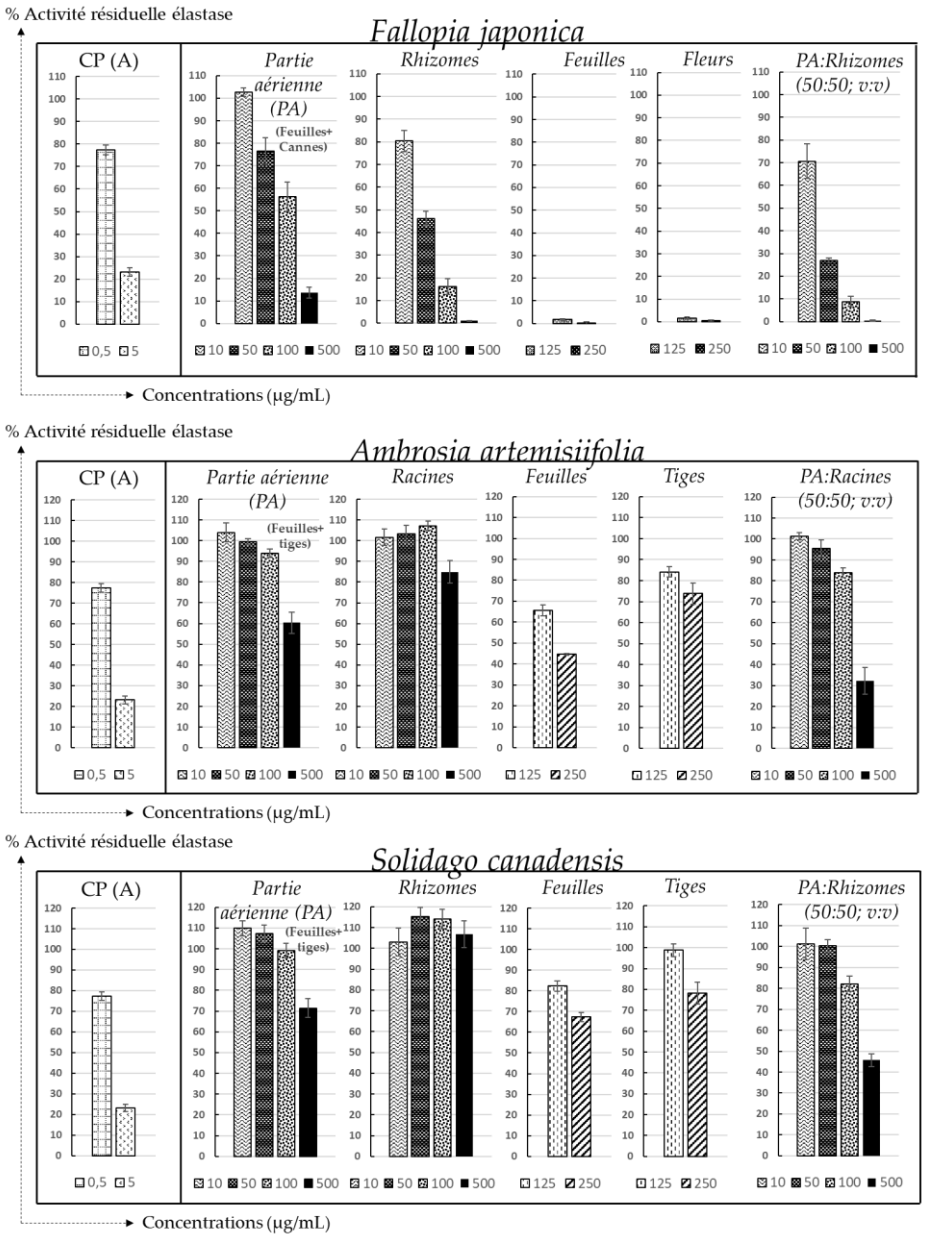


Figure 59. Evaluation des activités résiduelles élastase des extraits bruts de F. japonica, A. artemisiifolia et S. canadensis. CP = contrôle positif ; (A) = N-Méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chlorométhyl cétone. n = 3 expériences indépendantes pour chaque concentration (µg/mL). Les barres d'erreur représentent ± écart type.

c) SUR LA COLLAGENASE

Les résultats obtenus sur la cible enzymatique sont présentés *Figure 60*. La 1,10-phénanthroline, monohydratée (B) a servi d'inhibiteur général de métalloprotéinase de la collagénase [421,422]. Les comportements des trois espèces étudiées sur cette cible sont relativement différents entre eux. Une nouvelle fois, c'est *F. japonica* qui présent le plus fort potentiel des espèces. En effet, la collagénase est fortement inhibée par les extraits de partie aérienne et de rhizomes de *F. japonica* ou de leur mélange, avec un effet dose-réponse observé (rhizomes) ou un effet plateau (partie aérienne et mélange). À 10 µg/mL, ces extraits sont de meilleurs inhibiteurs de la collagénase que le témoin positif 1,10-Phénanthroline, monohydrate (CP(B)), d'autant plus que la concentration testée de ce dernier est légèrement supérieure (12,6 µg/mL). Leurs activités résiduelles sur l'enzyme sont de 4,98 ± 0,92% (partie aérienne), 12,01 ± 1,65% (rhizomes) et 17,49 ± 4,37% (contrôle positif). Les organes testés séparément de *F. japonica* (feuilles et fleurs) présentent des inhibitions maximales au même titre que la partie aérienne. Les deux concentrations testées (200 et 400 µg/mL) sont d'ailleurs comprises entre les deux concentrations les plus fortes examinées pour la partie aérienne (100 et 500 µg/mL), ce qui paraît cohérent.

En considérant les extraits réalisés à partir d'*A. artemisiifolia* et *S. canadensis*, les résultats révèlent des activités résiduelles collagénase faibles et modérées respectivement. Les extraits d'*A. artemisiifolia* manifestent un effet non-monotone surprenant : propriétés activatrices qui diminuent avec la concentration qui augmente [443,444]. Les deux concentrations hautes testées (200 et 400 µg/mL) pour les organes séparés (feuilles et tiges) laissent aussi supposer ce même effet non-monotone 'en cloche'. La particularité activatrice est d'autant plus visible en observant l'extrait de tiges que celui de feuilles. En évaluant uniquement les feuilles dans ces conditions, il aurait été impossible d'observer un tel comportement. Il s'avère alors que la partie aérienne d'*A. artemisiifolia*, qui contient notamment des tiges, exprime des activités résiduelles collagénase similaires à l'extrait de tiges. Le passage de l'activation à l'inhibition opére entre 200 µg et 400 µg/mL. A 10 µg/mL, c'est l'extrait de racines qui a le plus fort pouvoir inhibiteur des divers extraits avec 82,45 ± 8,69%. Néanmoins, en comparaison avec le témoin CP(B) à 12,6 µg/mL (17,49 ± 4,37%), cet extrait a une activité environ 5 fois plus importante (donc est un moins bon candidat que le témoin positif).

Pour *S. canadensis* à 10 µg/mL, les extraits de rhizomes et le mélange sont de meilleurs inhibiteurs que les autres typologies d'extraits avec respectivement 30,00 ± 3,86% et 24,71 ± 1,48%, relativement proches du contrôle positif à concentration semblable. Des effets dose-réponse monotones sont observés pour la partie aérienne, les feuilles et les tiges tandis que les rhizomes et le mélange présentent des effets non-monotones 'en cloche' [444,444,445]. Ces derniers organes ont un effet activateur à faibles doses puis un effet inhibiteur à forte dose (même tendance que chez d'*A. artemisiifolia*). Par ailleurs, les organes séparés (feuilles et tiges) ont des comportements très différents de celui observé de leur association (partie aérienne). Il aurait été attendus des effets inhibiteurs plus prononcés entre 39,6 ± 4,1% et 21,8 ± 4,5% d'activités résiduelles collagénase (partie aérienne entre 100 et 500 µg/mL), comme ce qui a pu être constaté chez d'*A. artemisiifolia*.

Ainsi *F. japonica* et *S. canadensis* apparaissent être des inhibiteurs importants de la collagénase, comparables à l'1,10-phénanthroline, monohydrate. En comparaison d'autre part avec d'autres types d'extraits végétaux, un extrait de *Rosa rugosa* montrait dans des travaux antérieurs [424], une activité résiduelle de 9,69 ± 0,05% à 1 000 µg/mL et était le meilleur candidat (sur 22 extraits d'halophytes criblés). A seulement 10 µg/mL, l'extrait produit dans ces travaux de rhizomes de *F. japonica* a une activité similaire (12,01 ± 3,60%) lui conférant dans ce cas un plus fort potentiel anti-collagénase que l'extrait de *Rosa rugosa*. Un autre type d'extrait de racines de *Cymbidium* quant à lui avait une activité résiduelle collagénase d'environ 20% à 75 µg/mL [93] ; faisant égaement de *F . japonica* une meilleure candidate.

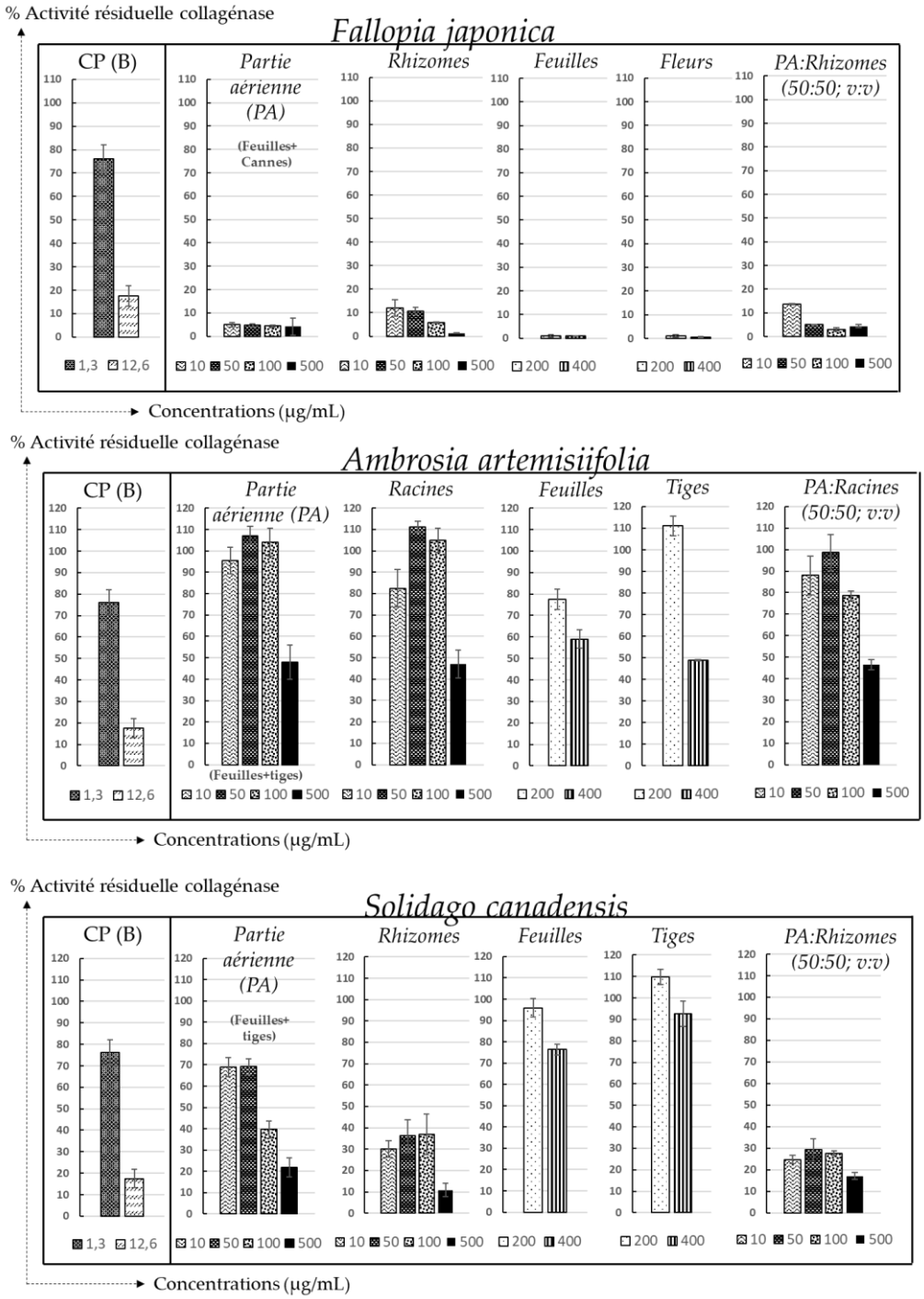


Figure 60. Evaluation des activités résiduelles collagénase des extraits bruts de F. japonica, A. artemisiifolia et S. canadensis. CP = contrôle positif ; (B) = 1,10-phénanthroline, monohydrate. n = 3 expériences indépendantes pour chaque concentration (µg/mL). Les barres d'erreur représentent ± écart type.

d) SUR LA TYROSINASE

Les résultats obtenus sur la tyrosinase sont présentés *Figure 61*. La glabridine (Gla) a été choisie comme témoin positif de référence [423]. Les comportements des extraits de *F. japonica*, *A. artemisiifolia* et *S. canadensis* sur cette cible enzymatique sont assez proches entre eux. Il s'avère que la tyrosinase est faiblement inhibée par l'intégralité des organes en comparaison de la Gla. Néanmoins, cette fois encore *F. japonica* apparaît avoir le meilleur potentiel anti-tyrosinase (avec des effets dose-réponse monotones) en particulier l'extrait de ses rhizomes. Ce dernier a un pouvoir inhibiteur plus fort que l'extrait de la partie aérienne de la plante, aux mêmes concentrations. A 100 µg/mL, les activités résiduelles tyrosinase sont respectivement de 80,21 ± 1,17% et 71,55 ± 1,28%. Plusieurs études antérieures, menées sur l'évaluation de *F. japonica* comme agent de blanchiment de la peau, soutiennent nos résultats [205,418]. En effet, bien que les conditions opératoires *in vitro* étaient légèrement différentes des nôtres, les résultats précédents ont montré des effets dose-réponse, avec des inhibitions mineures à faibles doses (<50 µg/mL) et des efficacités modérées pour des concentrations plus élevées telles que 85,20 ± 1,23% à 100 µg/mL. Les essais sur les cellules B16-F10 ont également montré la même tendance [418]. Dans une autre étude menée sur l'extrait de rhizomes, plusieurs anthraquinones isolées (physcion, émodine, citréoroseine et anthraglycoside B) se sont révélées être des candidats potentiels anti-tyrosinase pour une utilisation cutanée [205]. A 100 µg/mL d'autre part, ses organes séparés (feuilles, fleurs et cannes) ont des activités résiduelles similaires entre elles, proches de la partie aérienne. La moyenne d'activité observée la plus faible est pour l'extrait de cannes (76,42 ± 0,58%) qui se rapproche le plus de celle de l'extrait de rhizomes à cette concentration. Il se pourrait alors que ces deux organes (cannes et rhizomes) soient les plus proches en terme de composition moléculaire.

Entre les deux autres plantes, c'est *A. artemisiifolia* qui possède une meilleure efficacité sur la cible (inhibition supérieure à 23% à 500 µg/mL pour sa partie aérienne) que *S. canadensis*. Les parties aérienne et racinaire d'*A. artemisiifolia* montrent des effets dose-réponse et des efficacités proches entre elles. Le mélange des deux extraits présente quant à lui (à 50, 100 et 500 µg/mL) un effet plateau à 82% d'activité enzymatique en moyenne. Au regard des activités observées pour l'extrait de feuilles et celui de partie aérienne, il se pourrait que les tiges aient une efficacité plus forte que les feuilles sur l'enzyme. A 100 µg/mL, la feuille effectivement a une activité résiduelle tyrosinase mineure de 94,18 ± 1,92% alors que la partie aérienne en a une de 76,64 ± 1,32%.

Chez *S. canadensis*, les inhibitions observées ne dépassent pas, pour l'ensemble des organes et pour toutes les concentrations évaluées les 16%, excepté pour le mélange à 500 µg/mL (activité résiduelle tyrosinase de 80,00 ± 1,50%). Sont observables globalement *Figure 61*, des effets plateau. L'association des feuilles et tiges est par ailleurs favorable contre la cible tyrosinase, l'activité de la partie aérienne étant inférieure à celles des feuilles ou tiges. A 100 µg/mL en effet, ces trois extraits possèdent respectivement des activités résiduelles tyrosinase de 86,32 ± 0,86%, 95,59 ± 1,91% et 99,33 ± 1,14%. Antérieurement, un extrait EtOH/H_2O de pseudobulbes de *Cymbidium* montrait une activité résiduelle d'environ 75% à 75 µg/mL (meilleur résulats sur la

cible parmis les .12 extraits criblés) [93]. Cet extrait a un potentiel inhibiteur très légèrement plus élevé que ceux observés ici.

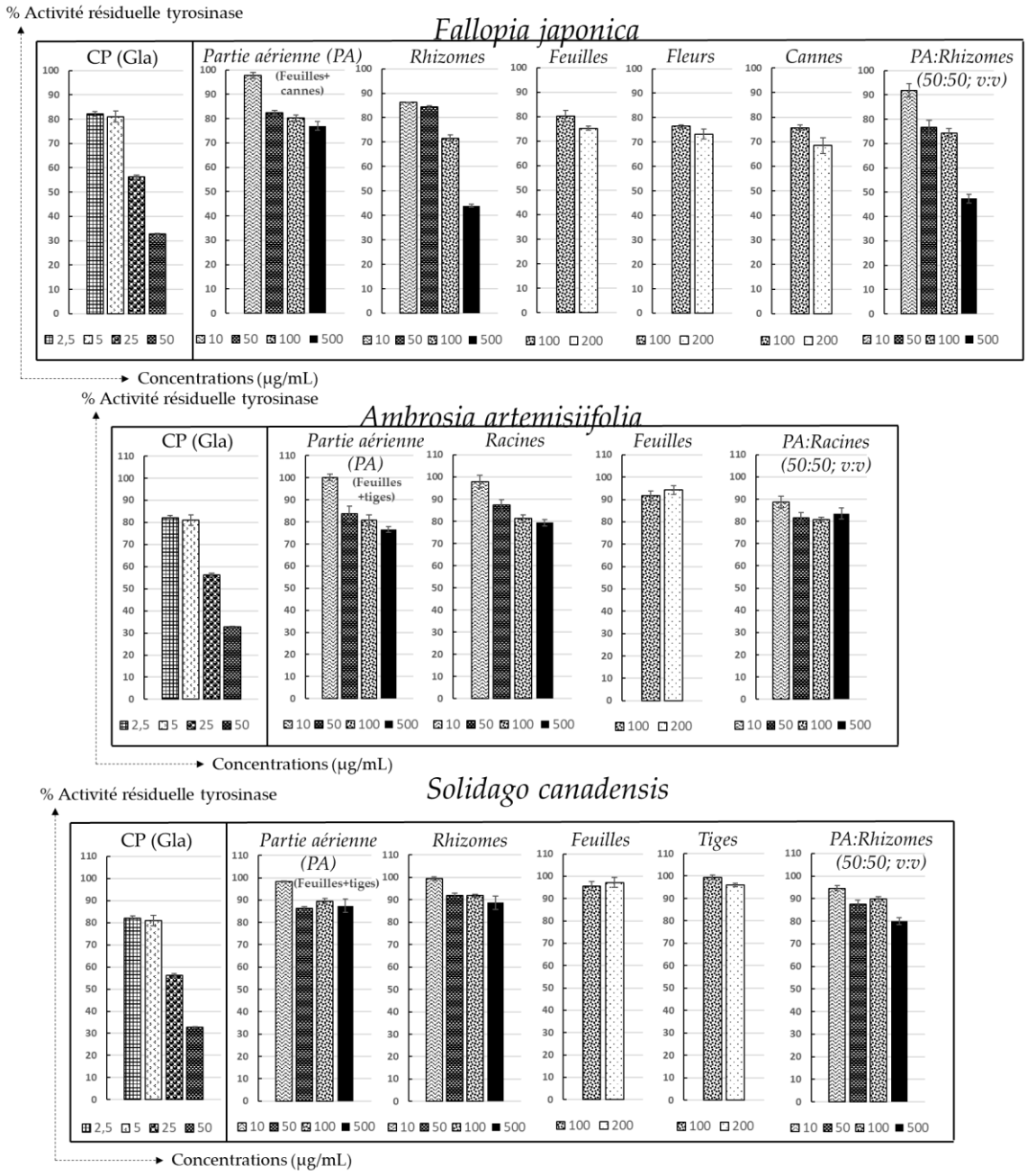


Figure 61. Evaluation de l'activité résiduelle tyrosinase des extraits bruts de F. japonica, A. artemisiifolia et S. canadensis. CP = contrôle positif et (Gla) = glabridine. n = 3 expériences indépendantes pour chaque concentration (µg/mL). Les barres d'erreur représentent ± écart type.

Dans de nombreuses études, les activités biologiques observées des extraits végétaux sont souvent corrélées avec la présence de composés phénoliques et flavonoïdes [158]. C'est pourquoi, dans la prochaine section sont évaluées les teneurs en composés phénoliques (TPC) et flavonoïdes (TFC) totaux des différents extraits.

E DETERMINATION DES TENEURS EN COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX ET EN FLAVONOÏDES TOTAUX

Les histogrammes *Figure 62* illustrent les teneurs en composés phénoliques totaux (TPC) en équivalent acide gallique (EAG) par g d'extrait sec (ES) et les teneurs en flavonoïdes totaux (TFC) en équivalent rutine (ER) par g d'extrait sec (ES).

Les TPC varient de 83 ± 25 à 758 ± 10 mg EGA/g ES. Les TPC des organes de *F. japonica* sont significativement plus élevées que celles des organes des deux autres plantes. C'est l'extrait de feuilles de *F. japonica* qui possède la TPC la plus importante et c'est l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* qui a la plus faible TPC. Si la TPC des cannes de *F. japonica* est relativement élevée avec 207 ± 20 mg EGA/g ES en comparaison des tiges d'*A. artemisiifolia* et de *S. canadensis* ; aucune différence significative est observée pour ces deux derniers extraits. Au niveau des feuilles d'*A. artemisiifolia* et de *S. canadensis*, ce sont celles de *S. canadensis* qui montrent la TPC plus haute.

F. japonica présente ainsi des différences significatives de TPC pour ses divers organes de partie aérienne. Ceci pourrait conforter le fait que les compositions polyphénoliques au sein de la plante soient différentes ou que certaines molécules se voient accumuler préférentiellement dans un organe donné spécifique. En revanche, les TPC des deux organes évalués d'*A. artemisiifolia* sont très proches, pouvant suggérer des compositions polyphénoliques semblables. La même observation peut être réalisée avec les tiges et rhizomes testés de *S. canadensis* dont les TPC sont relativement proches entre elles. La feuilles de *S. canadensis* se distinguent quant à elles . Ainsi, ces dernières observations suggèrent des compositions polyphénoliques différentes entre d'une part les tiges et rhizomes et d'autre part les feuilles de *S. canadensis*.

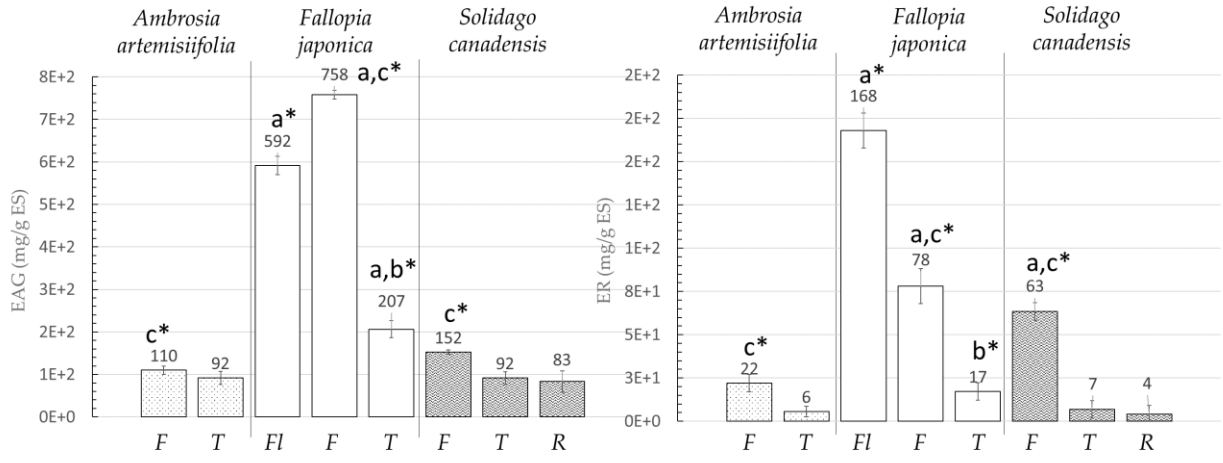


Figure 62. Histogrammes illustrant les teneurs en composés phénoliques totaux (à droite) et en flavonoïdes totaux (à gauche) des extraits bruts. Fleurs (Fl), feuilles (F), tiges (T), rhizomes (R). Ces dernières sont respectivement exprimées en équivalent acide gallique (EAG) et équivalent rutine (ER) par g d'extrait sec (ES). n=3. a = significativement différent du reste des extraits testés. b = significativement différent des extraits de tiges des autres plantes. c = significativement différent des extraits de feuilles des autres plantes. = statistiquement significatif au niveau de confiance de 99,9%.*

Les TFC varient de 4 ± 5 à 168 ± 10 mg ER/g ES. Les trois organes contenant les plus fortes teneurs de flavonoïdes sont les fleurs de *F. japonica* suivies des feuilles de *F. japonica* et enfin des feuilles de *S. canadensis* avec respectivement 168 ± 10 mg ER/g ES, 78 ± 10 mg ER/g ES et 63 ± 5 mg ER/g ES. Les feuilles d'*A. artemisiifolia* et les cannes de *F. japonica* contiennent peu de flavonoïdes avec des TPC de respectivement 17 ± 5 mg ER/g ES et 22 ± 5 mg ER/g ES. Le reste des organes n'en contiennent que très faiblement (< 7 mg ER/g ES). En procédant aux calculs des rapports TFC/TPC de chacun des organes, il s'avère que, du plus petit au plus grand coefficient, les organes peuvent être classés ainsi : feuilles de *S. canadensis* < fleurs de *F. japonica* < feuilles d'*A. artemisiifolia* < feuilles de *F. japonica* < cannes de *F. japonica* < tiges de *S. canadensis* < tiges d'*A. artemisiifolia* < rhizomes de *S. canadensis*. C'est donc l'extrait de feuilles de *S. canadensis* qui possède en son sein la plus grande part de flavonoïdes sur le total de ses composés phénoliques et l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* quant à lui la plus faible part voire elle n'en possède aucun, ce qui peut être cohérent avec le type d'organe (système racinaire).

Dans une étude réalisée sur un extrait 50% éthanolique de rhizomes de *F. japonica* [161], les auteurs avaient trouvés une TPC à 641.1 ± 42.6 mg EGA/g ES (*n*=8) et une TFC à 62.3 ± 6.0 mg/g d'échantillon (*n*=10). Les teneurs étaient d'autre part corrélées avec la capacité antioxydante intéressante de l'extrait. En comparaison avec nos résultats, sa TPC se rapproche de celles des fleurs et feuilles de l'espèce et sa TFC est similaire à celle des feuilles. Dans un autre travail précédent [158], les TPC des extraits 70% méthanoliques de rhizomes, cannes, feuilles et fleurs obtenus par macération classique étaient respectivement de 95 ± 3 ; 203 ± 6 ; 186 ± 1 et 118 ± 3 mg EGA/g ES. C'est donc les cannes qui avaient le plus fort taux de composés phénoliques. Si les cannes ont une teneur identique à l'extrait de cannes de *F. japonica* examiné ici (203 pour 207 mg EGA/g ES), les teneurs en TPC des feuilles et fleurs apparaissent 4 et 5 fois respectivement pour les deux organes plus fortes dans les extraits de feuilles et fleurs testés dans notre étude. La tendance est aussi différente : TPC (cannes) > TPC (feuilles) > TPC (fleurs) [158] tandis qu'ici TPC (feuilles) > TPC (fleurs) > TPC (cannes). Cela pourrait être dû aux solvants et technique d'extraction qui sont différents ou encore de la provenance ou des stades de croissance des plantes qui sont différents. Pour les teneurs en TFC, les extraits de cette étude également [158] pouvaient être classés : TFC (fleurs) > TFC (feuilles) > TFC (cannes), soit dans le même ordre que pour notre étude.

Dans une étude menée sur *A. artemisiifolia* [266], des extraits éthanoliques de la plante entière (30%, 50% et 70%) obtenus par macération classique avaient des TPC respectives de 8 ± 0,01 ; 13 ± 0,01 et 15 ± 0,01 exprimés en mg EGA/g plante sèche. Ces mêmes extraits avaient des TFC respectives de 2 ± 0,01 ; 3 ± 0,01 et 4 ± 0,00 exprimés en mg EQ(quercétine)/g plante sèche. La TPC est sept fois plus faible et la TFC 6 fois plus faible que les teneurs observées ici. Cependant, le rapport TFC/TPC est semblable à celui des feuilles. Il se pourrait donc que l'extrait de plante entière contienne majoritairement des feuilles et non des tiges. Les différences observées pourraient s'expliquer par le fait que les organes ont été testés séparément dans notre étude et que les extraits produits sont ici 100% éthanoliques obtenus par macération assistée par ultrasons. Enfin, une étude menée sur *S. canadensis* [320] présentaient des TPC de différentes parties de l'inflorescence de la plante variant entre 101 et 115 mg EGA/g ES des TFC comprises entre 49 et 58 mg EQ(quercétine)/g ES. Ces données sont proches des résultats obtenus ici, bien que les organes testés ne soient pas identiques.

F. PROFILS PHYTOCHIMIQUES DES EXTRAITS BRUTS

1. CARACTERISATION DES SUCRES

L'analyse HPTLC réalisée sur les sucres est présentée *Figure 63*. Une comparaison avec des standards selon le principe de déréplication a été réalisée pour attester de la validité des analyses et corroborer avec les données de la littérature disponibles. Dans les conditions opératoires mises en œuvre, les standards apparaissent en violet [446,447]. Associés à ces couleurs, les zones de *Rf* aident à rendre compte s'il s'agit d'un monosaccharide tels que le glucose ou le fructose ; d'un diholoside comme le maltose ou le saccharose ; ou bien d'un trioside tel que le raffinose. Plus le nombre de sucres alliés est important, moins le composé migre ce qui est attendu avec une phase stationnaire au caractère polaire. Par ailleurs, les dépôts et élutions ont été réalisées sur deux plaques distinctes, ce qui peut expliquer la légèrement variabilité des *Rfs* d'un profil à l'autre. D'un point de vu général, les profils phytochimiques glucidiques des feuilles et des fleurs par plante sont relativement proches entre eux tout comme ceux des tiges et des racines ou rhizomes.

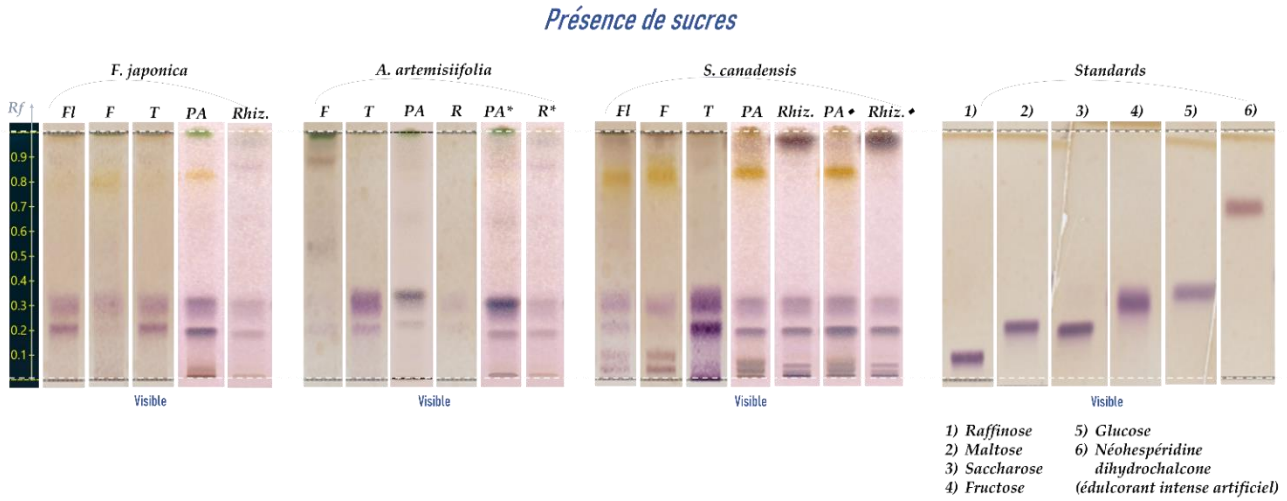


*Figure 63. Analyse HPTLC des sucres présents dans les organes de F. japonica (Voglans), A. artemisiifolia (Cruet) et S. canadensis (Perrignier). Fleurs = Fl. Feuilles = F. Tiges ou cannes = T. Parties aériennes = PA. Racines = R. Rhizomes = Rhiz. *Stade de développement différent (stade 2* ≠ stade 1). ♦ Localisation géographique différente (Yvoire ♦ ≠ Perrignier). Dérivations chimiques au réactif de Molich.*

La dérivation a permis de révéler la présence de deux glucides principaux aux *Rfs* 0,2 et 0,3 dans l'ensemble des organes de *F. japonica* en proportions différentes d'après les différences observées d'intensité des spots. Ils peuvent correspondre *Rf* 0,2 à un diholoside (maltose ou saccharose) et *Rf* 0,3 à un monosaccharide type fructose. Le spot *Rf* 0,3 est de plus assez diffus comme l'est le standard de fructose, confortant cette dernière hypothèse. Les fleurs et les tiges contiennent d'avantage de ces deux composés, par comparaison aux feuilles et rhizomes. Les feuilles de *F. japonica* possèdent essentiellement du fructose mais il est possible que la quantité du

diholoside ne soit pas suffisante pour être détectée. L'association des organes aériens (feuilles, tiges) met en évidence un potentiel enrichissement en ces deux molécules avec l'observation de deux spots aux mêmes *Rfs* de fortes intensités ; ce qui est cohérent avec les observations faites pour les organes pris séparément. De plus, les cannes sont largement majoritaires dans cet échantillon d'où une présence accrue en diholoside. *F. japonica* est bien décrite quant à sa composition en sucres [140–142]. Il a été décrit dans des études précédentes, la présence de glucose dans ses feuilles et rhizomes ce qui n'est pas le cas dans les échantillons produits (*Rf* standard glucose 0,35 > *Rfs* 0,2 et 0,3). Toutefois, le glucose est a un *Rf* très proche du fructose (0,35), il se pourrait alors que le spot diffus à *Rf* 0,3 soit une coexistence de ces deux molécules. Il serait intéressant d'effectuer une dérivation avec le révélateur diphénylamine-aniline-acide phosphorique plus sélectif et sensible de par son seuil de détection plus bas pour distinguer les deux molécules. Il permet en effet de différencier les glucides selon leur nature par réaction colorimétrique [448]. D'autres monosaccharides avaient également été trouvés comme le galactose, le mannose, l'arabinose, le xylose ou encore le rhamnose [140–142].

Très peu de données sur la composition en glucides de *A. artemisiifolia* sont disponibles dans la littérature [237,245], dans l'état de nos connaissances actuelles. Il était néanmoins apparu l'existence de carbohydrates divers dans le pollen de la plante (non identifiés), dans une étude utilisant la microscopie Raman avec des bandes de vibrations caractéristiques à 1080, 860 et 540 cm^{-1} (liaison glycosidique C–*O*–C). Des caractéristiques spectrales faibles dans la région de 440 à 420 cm^{-1} avaient été attribuées sans autre identification détaillée aux modes vibrationnels glucidiques. Chez *A. artemisiifolia*, deux glucides principaux sont révélés, notamment dans les tiges de polarités semblables à ceux retrouvés dans les organes de *F. japonica*. Le même raisonnement a été appliqué : *Rf* 0,2 peut correspondre à du maltose ou du saccharose et *Rf* 0,3 à du fructose. Il s'avère d'autre part que la partie aérienne (feuilles et tiges), au premier stade de croissance de la plante soit moins concentrée en ces deux glucoses que la partie aérienne à un stade de développement plus avancé (*Figure 63*, *prélevée sur le même lieu soit Cruet). La même observation est faite au niveau de la partie racinaire aux deux stades différents. Ainsi, la plante semble produire plus de sucres à un stade plus avancé dans l'ensemble de ces organes. Le processus de photosynthèse qui a lieu dans les feuilles du végétal permet à la plante de fabriquer du sucre lui servant de source d'énergie pour sa croissance, son entretient et sa reproduction. Plus la croissance est végétative, plus la surface foliaire est importante pour la production de sucre [449,450] ; ce qui pourrait être cohérent avec les observations faites chez *A. artemisiifolia*.

Quatre glucides principaux ont été mis en évidence avec le réactif de Molisch dans les organes et parties de *S. canadensis*, dont deux semblent communs aux autres espèces végétales (*Rfs* 0,2 et 0,3). Deux sucres sont spécifiques à la plante aux *Rfs* 0,05 et 0,1 (feuilles et fleurs) correspondant à des triholosides tel que le raffinose. La tige est l'organe qui a le plus de maltose (ou saccharose) *Rf* 0,2 et de fructose *Rf* 0,3. La diffusivité de ce second spot suggère la présence éventuelle de fructose. C'est le seul organe qui en posséderait. En comparant les profils phytochimiques des parties aériennes entre elles et des parties racinaires entre elles des deux provenances différentes, ils sont similaires. Les intensités des spots présents dans les rhizomes aux mêmes *Rfs* sont également semblables, pouvant indiquer des teneurs très proches. En revanche pour les parties aériennes, les spots *Rf* 0,2 et

Rf 0,3 sont légèrement plus intenses pour la localité Yvoire ♦ que pour la localité Perrignier ; suggérant une différence de teneur en maltose ou saccharose. La localité aurait ainsi une influence sur les teneurs en sucres extraits. De nombreux glucides ont été identifiés dans des travaux antérieurs sur *S. canadensis* [316,321,322]. Le glucose et le fructose ainsi que le maltose et le saccharose étaient présents dans la plante entière ou les fleurs [323,324], corroborant à ce qui a été trouvés.

2. CARACTERISATION DES LIPIDES ET DES TERPENES

Plusieurs plaques ont pu être réalisées dans le cadre de cette étude, car réalisées généralement après récoltes sur deux années successives pouvant engendrer certaines différences tels qu'un léger décalage des *Rfs* ou des couleurs de plaques après révélation. Les deux révélations (primuline et anisaldéhyde [447,451]) n'ont pas toujours été effectuées sur l'ensemble des organes présentés. Les analyses HPTLC sont présentées *Figure 64*. Si pour les lipides aucun 'effet de plaque' n'a été observé, il s'avère qu'un effet solvant 'en vague' est visible pour l'ensemble des profils terpéniques des organes déposés sur la même plaque exceptés la feuille d'*A. artemisiifolia* et les fleurs de *S. canadensis* (déposés sur une autre plaque avec les standards, eux-mêmes non affectés par cet effet). Cet effet 'en vague' rend plus difficile l'interprétation des résultats obtenus. Les analyses qualitatives *Figure 64* des lipides et terpènes montrent la grande diversité des empreintes phytochimiques des organes au sein d'une même plante et entre les trois plantes. La deuxième dérivation à l'anisaldéhyde ne révèle que peu de spots supplémentaires cependant par rapport à ceux détectés avec la première révélation à la primuline.

F. japonica contient différents types de lipides et terpènes. Les profils lipides de ses différents organes (fleurs, feuilles, tiges et rhizomes) sont très différents les uns des autres. La partie aérienne possède un profil lipidique représentatif de l'association des feuilles et des cannes ; ce qui est cohérent. Néanmoins, bien que les cannes soient présentes en grande majorité dans l'extrait de partie aérienne, ressortent notamment visuellement les composés présents dans les feuilles. Au *Rf* 0,7 par exemple dans la partie aérienne, il y a co-existence des spots rouge intense (feuilles) et du spot brun foncé (cannes). Seul le spot rouge intense est visible. Sa couleur prononcée masque alors une partie de l'information. Ses feuilles, sa partie aérienne ou encore ses rhizomes contiendraient du α–sitostérol (ou du stigmastérol) *Rf* 0,4. Le stigmastérol déposé entant que standard est représenté par un unique spot à *Rf* 0,4 tandis que le α–sitostérol possède un spot intense *Rf* 0,4 avec un phénomène de trainée aux *Rfs* inférieurs. Dans ce dernier, deux spots diffus sont observables aux *Rfs* 0,05 et 0,12. Au mêmes *Rfs* dans la partie aérienne et les rhizomes, deux spots sont également présents suggérant qu'il pourrait s'agir de α–sitostérol et non de stigmastérol dans ces deux organes. En revanche pour les feuilles, il s'agirait plutôt de stigmastérol ou s'il s'agit de α–sitostérol, sa quantité n'est pas suffisante pour permettre l'observation de la trainée correspondante. Concernant les profils terpèniques des organes de l'espèce (fleurs, feuilles et tiges), ils sont relativement proches entre eux. Malgré l'effet 'en vague', les trois organes ont en communs cinq spots *Rfs* 0,25/0,35/0,38/0,42/0,5. Aucune correspondance n'a été possible avec les standards déposés au *Rf* 0,25. Les organes aériens de l'espèce contiendraient du α–carotène *Rf* 0,35. Aux *Rfs* 0,38 et 0,42, il peut s'agir de triterpènes tels que l'acide bétulinique, l'acide ursolique ou encore l'acide oléanolique (spots violacés) ; tous les trois déjà

retrouvés chez *Fallopia* spp [164]. Enfin, au *Rf* 0,5, sont potentiellement retrouvés le *α*–sitostérol ou le stigmastérol ; corroborant avec les premières observations sur la plaque lipidique. *F. japonica* par ailleurs ne contient ni phytostérols ou stéroïdes ni molécules glucosylées. Dans les feuilles et les cannes, un triterpénoïde (spot violacé) non identifié peut également être présent *Rf* 0,7 avec dans chaque organe une quantité différente. Dans une étude antérieure menée sur les rhizomes de *F. japonica* [142] avaient été retrouvés également du *β*-sitostérol mais également les acides gras palmitique, stéarique ou encore arachidique ; confortant les résultats obtenus.

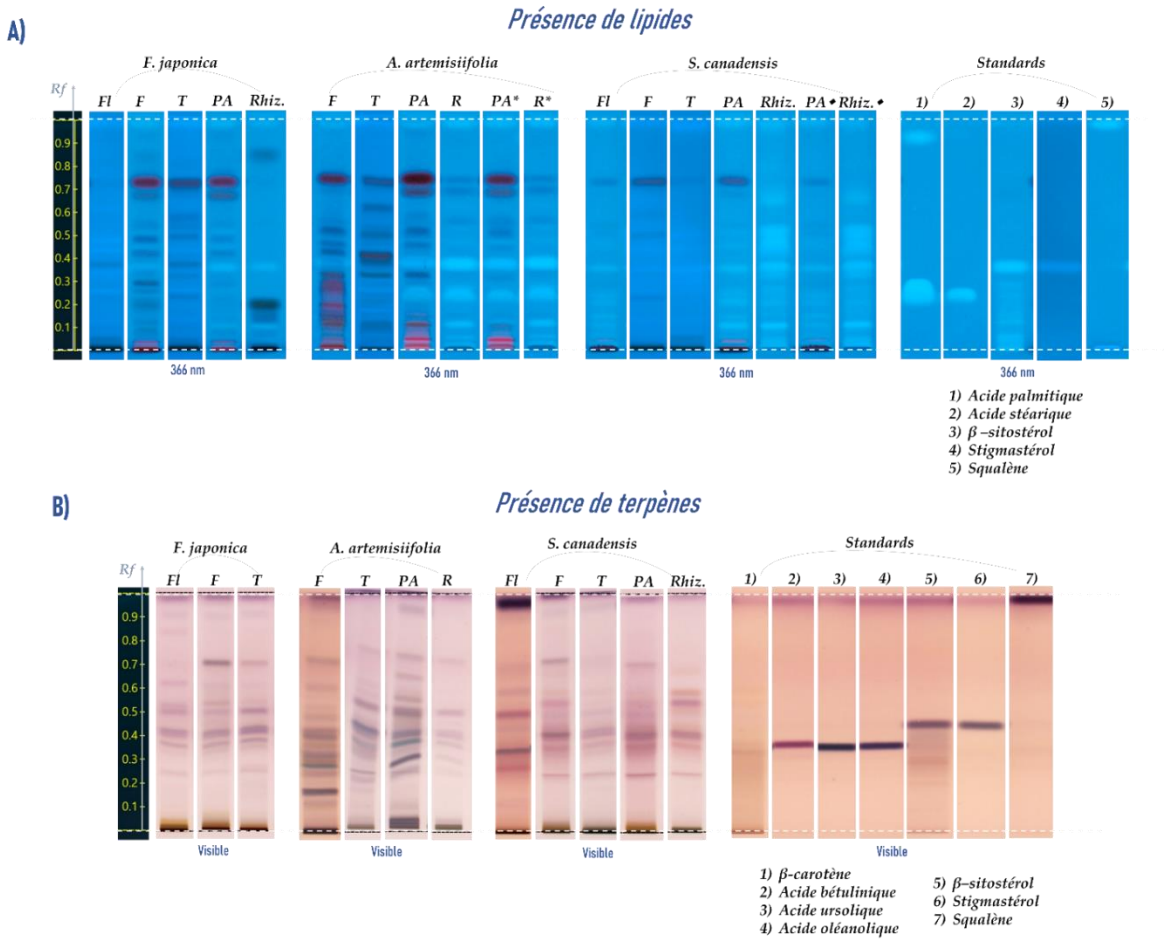


*Figure 64. Analyse HPTLC des lipides et terpènes présents dans les organes de F. japonica (Voglans), A. artemisiifolia (Cruet) et S. canadensis (Perrignier). Fleurs = Fl. Feuilles = F. Tiges ou cannes = T. Parties aériennes = PA. Racines = R. Rhizomes = Rhiz. *Stade de développement différent (stade 2* ≠ stade 1). ♦ Localisation géographique différente (Yvoire ♦ ≠ Perrignier). Dérivations chimiques primuline (lipides) et/puis anisaldéhyde (terpènes).*

<u>*A. artemisiifolia*</u> est riche en molécules lipidiques et terpéniques. Ses parties aériennes aux deux stades végétatifs différents ont les mêmes profils lipidiques. Néanmoins, la plante au premier stade de croissance contient des teneurs supérieures en certains composés non identifiés présents aux *Rfs* 0,35 et 0,53 (spots bleutés). La partie aérienne et les racines de cette espèce peuvent contenir de l'acide palmitique *Rf* 0,25 (spot diffus) ou de l'acide stéarique *Rf* 0,25 également (spot moins diffus). Le standard d'acide palmitique présente une impureté *Rf*

0,9 non observée dans les organes. Elles (partie aérienne et racines) peuvent également posséder *Rf* 0,4 du *α*–sitostérol ou du stigmastérol, comme chez *F. japonica*. Les profils terpéniques de l'espèces sont plus difficiles à interpréter du fait de l'effet 'en vague'. *A. artemisiifolia* contiendrait les composés 1 à 6 (voir standards 1-6, *Figure 64*) par correspondance des spots. La plante invasive possède aussi des spots intenses de couleurs verdâtre qui n'ont pas pu être identifiés (*Rf* 0,28 dans les feuilles et la partie aérienne). Enfin, *A. artemisiifolia* ne contient ni phytostérols ou stéroïdes ni molécules glucosylées ; comme suggéré dans une étude antérieure [243]. Dans un autre travail, il a été montré que la plante pouvait contenir du *β*-sitostérol et du stigmastérol, appuyant nos interprétations visuelles, ainsi que de l'ambrosinal A et de l'ambrosinal B [244].

Les profils en lipides des organes aériens de *S. canadensis* se dintinguent entre eux. Le profil lipidique de la partie aérienne correspond bien à l'association des organes aériens (fleurs, feuilles, tiges). La partie aérienne provenant de Perrignier contient des teneurs en composés légèrement plus importantes comparée à la partie aérienne d'Yvoire. Néanmoins, leurs profils lipidiques restent identiques. Les rhizomes des deux lieux ont aussi des empreintes similaires. C'est cet organe (rhizomes) qui est le plus riche en lipides divers. La plante entière pourrait contenir l'ensemble des cinq standards déposés excepté les rhizomes qui ne posséderait pas de squalène (*Figure 64*, standard 5). De nombreux lipides présents dans les rhizomes déposés restent non identifiés par déréplication, notamment dans la plage de *Rfs* allant de 0,40 à 0,65. Concernant les profils terpéniques des différents organes de *S. canadensis*, il apparaît également que les organes aériens ont des compositions en terpénoïdes proches. La composition chimique de sa partie aérienne ressemble en particulier à celle de ses feuilles et rend compte de l'association des teneurs en composés communs des organes aériens (feuilles et tiges) avec des spots d'intensité plus élevée. Pour exemple en effet, le spot *Rf* 0,25 de couleur violacée non identifié à l'aide des standards est plus intense dans la partie aérienne que dans les feuilles ou tiges. Il en est de même pour le spot violacé positionné *Rf* 0,4 pouvant correspondre au *α*–sitostérol ou au stigmastérol. Antérieurement avait été reporté chez *S. canadensis*, la présence de stigmastérol et stigmasta-7,16-dièn-3-ol [316]; confortant davantage l'hypothèse du stigmastérol dans notre cas. *S. canadensis* pourrait également posséder les acides bétulinique ou ursolique ou encore oléanolique *Rf* 0,38. Le profil terpénique des fleurs se distingue nettement des autres organes de la plante, avec un spot d'intensité élevée en front de solvant suggérant la présence de squalène. La quantité de ce dernier dans l'organe pourrait être proche de celle déposée pour le standard à 1 mg/mL. Enfin, les fleurs se composeraient également d'acide ursolique ou oléanolique *Rf* 0,38 (spot de couleur violacée, relativement foncé). De nombreux acides gras ont été identifiés chez cette espèce auparavant [316] et qui n'ont pas été déposés ici (*ex* : acides myristique, linoléique, caprylique, stéarique, palmitoléique, palmitique) ne permettant pas de vérifier leur potentiel présence dans nos extraits.

Cette phase éluante permet également d'éluer les composés de type chlorophylles (spots rouges à 366 nm). C'est *A. artemisiifolia* qui en contient le plus comparée aux deux autres espèces dans l'ensemble de ses organes aériens. *F. japonica* en contient plus particulièrement dans ses feuilles et cannes et ainsi dans sa partie aérienne (qui est l'association de ces deux organes). Ses fleurs n'en contiennent aucun. Seul un spot rouge dans la partie aérienne de *S. canadensis* (*Rf* 0,05) est visible dans les conditions opératoires de l'étude.

3. CARACTERISATION DES COMPOSES PHENOLIQUES

A l'issue de la dérivation chimique NEU- PEG, les composés polyphénoliques sont détectables à 366 nm avec différentes couleurs caractéristiques. Il a été décrit précédemment qu'une tache orange peut contenir par exemple de la quercétine, de la myricétine ou de la chrysine génine ; une tache verte une génine de l'apigénine, la naringénine, la pinocembrine, le kaempférol ou le kaempféride ; une tache jaune une génine de lutéoline ou du physcion ; une tache bleue peut être constituée d'acides phénoliques [425,452,453] ; et une tache brune peut représenter des dérivés de l'anthraquinone [425]. Associés à ces couleurs, les rapports frontaux (*Rf*) peuvent indiquer si ces génines possèdent un groupement glycosylé (mono-, di- ou tri-) [454].

Les empreintes phénoliques obtenues des divers extraits sont présentées *Figure 65*. L'analyse qualitative des composés phénoliques rend compte de la pluralité en terme de couleurs et ainsi de structures de molécules correspondant à des familles telles que les chlorophylles, les flavonoïdes, les acides phénoliques ou encore les anthraquinones [146,147,267,425,426,454]. Pour exemple, les fleurs chez *F. japonica* sont plutôt riches en flavonoïdes tandis que les rhizomes chez *S. canadensis* le sont en acides phénoliques. L'observation des plaques souligne ainsi la diversité moléculaire des divers organes sur toute la gamme de polarité. Autant de similitudes/ différences de compositions entre les organes d'une même plante mais également entre les trois plantes sont notables.

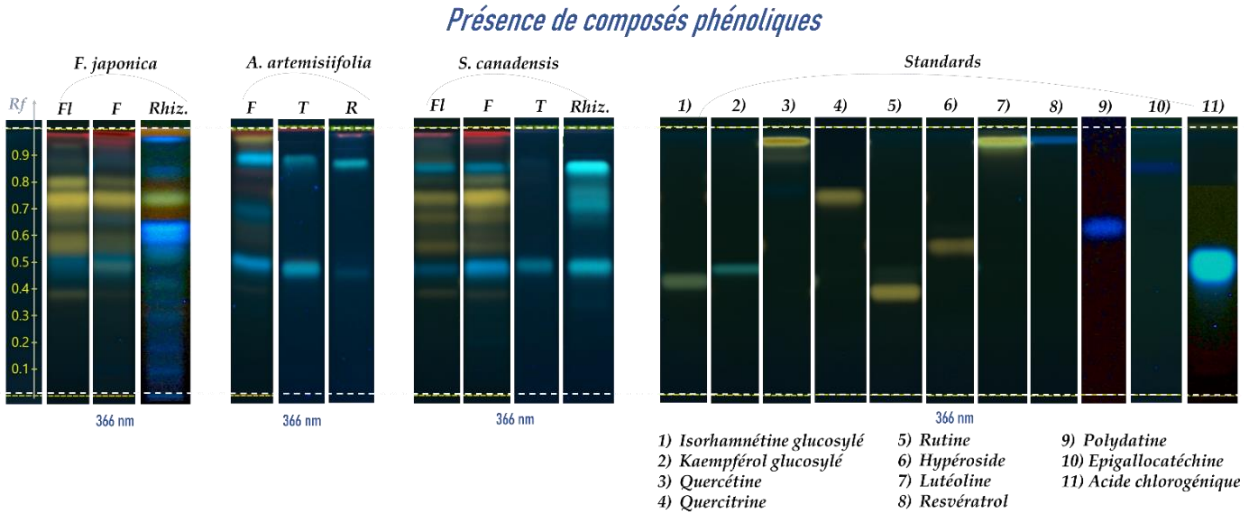


Figure 65. Analyse HPTLC des composés polyphénoliques présents dans les organes de F. japonica (Saint-Alban-d'Hurtières ou Voglans), A. artemisiifolia (Cruet) et S. canadensis (Houches). Fleurs = Fl. Feuilles = F. Tiges ou cannes = T. Parties aériennes = PA. Racines = R. Rhizomes = Rhiz. Dérivations chimiques NEU puis PEG.

Chez *F. japonica*, les feuilles et fleurs déposées ont des profils polyphénoliques très proches entre eux. Les deux organes contiendraient de l'acide chlorogénique (*Rf* 0,50) et des dérivés de la quercétine (spots jaunes orangés) comme la rutine diglycosylée *Rf* 0,38 ou la quercitrine monoglycosylée *Rf* 0,73. Au *Rf* 0,55, ils pourraient aussi contenir de l'hypéroside. Cette observation conforte le fait que plus la molécule possède de groupements

glycosylés, moins elle migre ce qui est attendu lors d'une telle séparation sur phase stationnaire polaire (gel de silice). Avec des spots d'intensités plus élevées, les fleurs posséderaient davantage de ses trois flavonoïdes. Les feuilles pourraient contenir du kaempférol (spot vert, *Rf* 0,45) ou de l'acide chlorogénique (spot bleu) co-élué avec un autre composé polyphénolique de couleur jaune. Si les organes aériens peuvent être rassemblés dans un objectif de valorisation et de simplicité d'exécution lors de la séparation des organes, ils se distinguent très nettement du rhizome en terme de composition polyphénolique. Ce dernier en effet pourrait contenir quant à lui divers stilbènes comme le resvératrol (*Rf* 0,98) ou la polydatine (*Rf* 0,60), de l'épicagallotéchine (*Rf* 0,84) voir des anthraquinones (front de solvant couleur jaune) et dérivés (spots marrons) [425]. Plusieurs anthraquinones avaient pu être caractérisées dans un travail antérieur dans les rhizomes de l'espèces dont l'émodine et ses dérivés ainsi que le physcion [425] ; appuyant les dernières hypothèses émises ici. Enfin, un spot verdâtre de forte intensité *Rf* 0,75 semble également présent dans la partie racinaire.

Pour *A. artemisiifolia*, le comportement des organes est relativement différent de celui observé chez *F. japonica*. En effet, ses trois organes (feuilles, tiges et racines) sont similaires et relativement peu riches en polyphénols divers. Sont retrouvés majoritairement des dérivés d'acides phénoliques (spots bleus) tel que l'acide chlorogénique (*Rf* 0,50). Les feuilles de la plante pourraient d'autre part contenir de la lutéoline ou de la quercétine (spot jaune, *Rf* 0,98) ; comme suggéré antérieurement [267] et des pigments chlorophylliens (spot rouge en front d'élution). Ces derniers proches en *Rf* pourraient d'ailleurs atténuer la couleur jaune vive observée sur le standard de lutéoline. Enfin, la ressemblance moléculaire des échantillons pourrait induire un rassemblent des différents organes de la plante selon les activités biologiques visées semblables entre elles.

Les fleurs et les feuilles de *S. canadensis* ressemblent aux profils des mêmes organes chez *F. japonica* et les tiges ainsi que les rhizomes ont des similitudes de compositions chimiques avec les mêmes organes chez *A. artemisiifolia*. Les échantillons de ses fleurs et feuilles contiendraient alors des dérivés de la rutine, de la quercitrine, de l'hypéroside, d'autres flavonoïdes, des chlorophylles et des acides phénoliques [454]. Les tiges et rhizomes seraient composées uniquement d'acides phénoliques. L'acide chlorogénique (*Rf* 0,50) est retrouvé dans les quatre organes de la plante, avec potentiellement des teneurs différentes au vue de l'intensité des spots. Les fleurs et les rhizomes seraient ceux qui en possèderaient les plus fortes quantités. Les feuilles pourraient d'autre part contenir davantage de quercitrine que la fleur, présentant un spot d'intensité plus importante. Antérieurement, avaient été également identifiées chez *S. canadensis* et *S. gigantea* de la rutine, quercitrine, hypéroside et de l'acide chlorogénique [426,454]; appuyant nos hypothèses. En revanche, avaient aussi été caractérisés du kaempférol et ses dérivés [426,454]; ce qui n'est observé ici (pas de spots de couleur verte). Cette différence pourrait s'expliquer par les méthodologies et solvants d'extraction employés ou aux provenances des espèces qui sont différents entre nos travaux. Enfin, ces deux organes pourraient être rassemblées au même titre que les tiges et les rhizomes. Les tiges dont la composition est peu riche en polyphénols pourraient aussi être rassemblée avec les feuilles et les fleurs de *S. canadensis*.

Bien que décrite dans de précédents travaux comme faisant partie des trois plantes étudiées [268,426,455,456], l'isorhamnétine ne serait présente ici dans aucune d'entre elles, ou les quantités ne permettent pas l'observation de cette molécule dans les conditions opératoires de notre étude.

Un deuxième type d'élution a été effectué *Figure 66* afin d'étayer les informations visuelles obtenues dans la plage de polarité des *Rfs* 0,50 à 1,00 dans la *Figure 65* précédente. En effet, avec l'élution mise en œuvre, les polyphénols polaires à moyennement polaires sont mobilisés en bas de plaque vers le dépôt afin d'élargir l'observation sur les molécules les moins polaires à apolaires. L'acide chlorogénique est alors à un *Rf* 0,05 et les génines de lutéoline, d'isorhamnétine et de resvératrol sont détectées à un *Rf* 0,63. Les molécules glycosylées sont alors présentes entre ces deux *Rfs* comme cela est le cas avec la quercitrine *Rf* 0,45 et la polydatine *Rf* 0,35. Seules les molécules très apolaires comme les pigments sont retrouvées en front de solvant. Au niveau des standards deux effets plaques sont observables : un premier pour les génines 1 et 4 pour lesquelles une partie du composé reste accrochée au *Rf* 0,25 ; et un deuxième où est visible une trainée dès le dépôt pour la quercitrine déposée. Ce dernier effet est également présent au niveau des divers échantillons. Des trainées sont effectivement observées dès lors que les organes contiennent de la quercitrine. Pour l'autre effet énoncé, il est difficile de conclure du fait de la présence de nombreuses molécules dans la plage de *Rf* considérée.

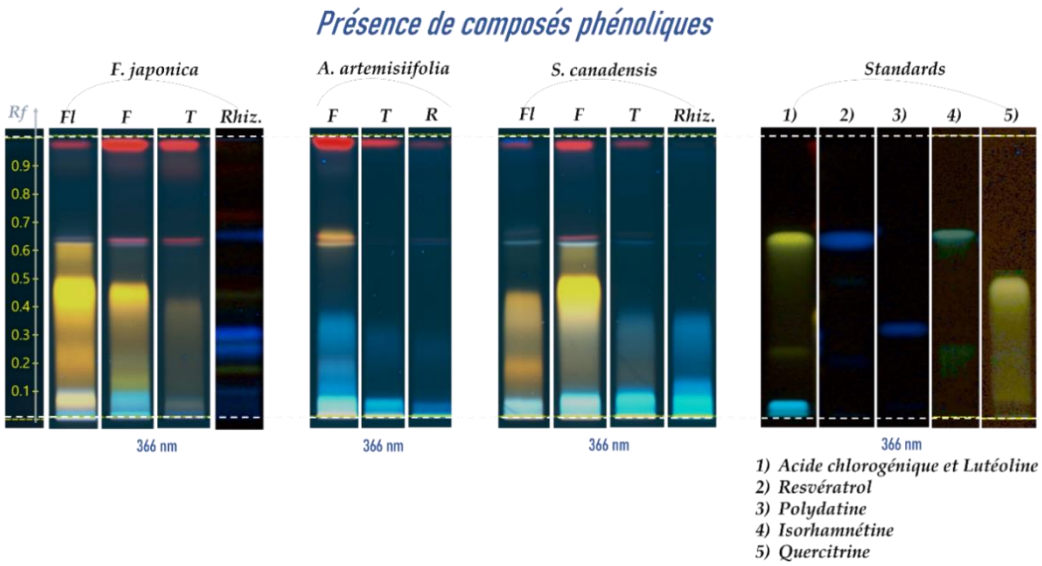


Figure 66. Analyse HPTLC des composés polyphénoliques présents dans les organes de F. japonica (Saint-Alban-d'Hurtières ou Voglans), A. artemisiifolia (Cruet) et S. canadensis (Houches). Fleurs = Fl. Feuilles = F. Tiges ou cannes = T. Parties aériennes = PA. Racines = R. Rhizomes = Rhiz. Dérivations chimiques NEU puis PEG.

Avec ce second développement, les fleurs de *F. japonica* contiennent bien plus de flavonoïdes que ses feuilles et ses cannes (non déposées *Figure 65*). Les cannes pourraient être aussi rassemblées avec les autres organes aériens car elles ont une composition chimique similaire. Il apparaît par ailleurs que les trois organes aériens de la plante contiennent de l'isorhamnétine glucosyl (spot vert de faible intensité au *Rf* 0,63), qui n'avait pas été observée avec le premier développement (voir *Figure 65*). Plusieurs spots rouges sont détectés ici pouvant

correspondre à différentes chlorophylles. Sont aussi observés dans les rhizomes de *F. japonica*, les différents stilbénoïdes (spots bleus). L'unique spot verdâtre, qui était visible dans les rhizomes *Figure 65*, contiendrait en réalité deux composés différents de même couleur et avec un potentiel de structure proche (*Rfs* 0,19 et 0,43).

Les profils polyphénoliques des organes d'*A. artemisiifolia* sont pauvres en composés sur toute la plage de polarité. Ses feuilles posséderaient de la lutéoline. Cette molécule n'avait pas été identifiée *Figure 65*, car elle était co-éluée avec des pigments (couleur rouge prédominante, masquant le jaune associé à la lutéoline).

Chez *S. canadensis*, la même tendance que précédemment (*Figure 65*) est observée. Ses feuilles contiennent probablement plus de quercitrine que ses fleurs. Ses tiges possèderaient aussi un ou des flavonoïdes communs avec les fleurs (*Rf* 0,18) en bien plus faible quantité cependant. Il est également envisageable que les feuilles, les fleurs mais également les tiges de *S. canadensis* se composent d'isorhamnétine (spot vert au *Rf* 0,63). L'extrait de feuilles auraient une quantité plus importe de ce composé que ceux des fleurs et tiges. Les couleurs jaune et verte n'apparaissaient pas au sein de la tige dans la *Figure 65*, cet organe pourrait ainsi être associée au reste des organes aériens de l'espèce en vue de sa valorisation.

4. VARIABILITE POLYPHENOLIQUE : INFLUENCE DE L'ORGANE

Comme vu précédemment, les métabolites constitutifs ne sont pas localisés de manière homogène au sein des trois espèces végétales. Les composés polyphénoliques sont en particulier emmagasinés dans la partie aérienne (tiges, feuilles, fleurs), comme cela est fréquemment le cas chez les végétaux supérieurs [457]. Chez *F. japonica* néanmoins, il a été remarqué que ses rhizomes en étaient aussi très riches. Afin d'étudier l'influence des organes sur la composition polyphénolique des trois plantes et aller plus loin que les interprétations visuelles, la photographie de la plaque TLC sur laquelle avaient été déposés les divers organes (*Figure 67*) a été soumise au logiciel rTLC pour les traitements statistiques des échantillons. Trois analyses en composante principale (ACP) ont pu être réalisées : l'une sans correction, l'une avec correction ligne de base et une dernière avec correction centrage moyen. Ces dernières sont présentées *Figure 68*.

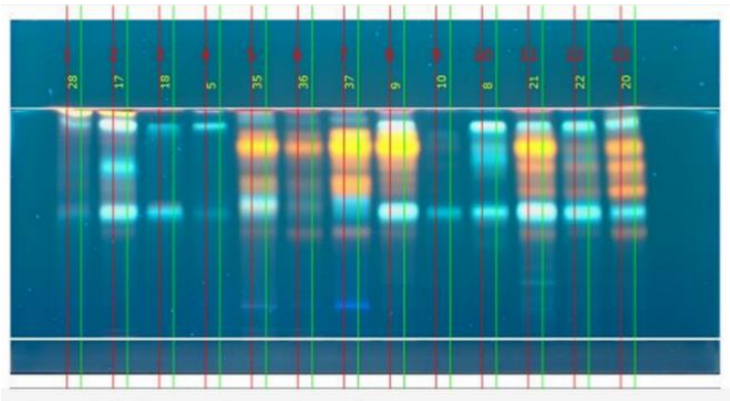


Figure 67. Plaque TLC réalisée pour étudier l'influence de l'organe. De gauche à droite les organes sont : feuilles+tiges (1), feuilles (2), tiges (3) et racines (4) d'A. artemisiifolia. Puis feuilles (5), tiges (6) et fleurs (7) de F. japonica. Puis feuilles (8), tiges (9), rhizomes (10) de S. canadensis Localité 1. Puis feuilles (11), tiges (12) et fleurs (13) de S. canadensis Localité 2.

Les ACP *Figure 68* montrent le regroupement de certains échantillons et ainis leur similarité. Les ACPs sans correction et avec la correction centrage moyen donnent globalement les mêmes informations bien que leurs variances sur les deux axes ne soient pas du tout similaires. C'est la correction centrage moyen qui permet d'avoir la meilleure séparation des extraits selon l'axe 2 avec une variance de 15,8% (au lieu de 3,7% sans correction). Il s'avère d'autre part que l'ACP sans correction possède la plus forte variance selon la première composante avec 93,8% à la différence de la correction centrage moyen dont la variance est de 63,4%. Dans ces deux ACPs, il apparait que les extraits des parties aériennes (feuilles, tiges, fleurs) de *F. japonica* sont très proches entre eux, au même titre que celles (fleurs, feuilles des deux localisations géographiques) de *S. canadensis*. L'ensemble de ces organes (des deux plantes) présentent alors de fortes ressembmance dans leurs compositions polyphénoliques. Un autre grand regroupement d'échantillons, pouvant être séparé en deux sous-groupes, avec une composition voisine est également observable. Le premier se compose des feuilles d'*A. artemisiifolia*, des rhizomes et des tiges d'Yvoire de *S. canadensis*. Le second comprend les extraits restants c'est-à-dire (tiges, feuilles+tiges et racines d'*A. artemisiifolia* ainsi que tiges de *S. canadensis* de Perrignier.

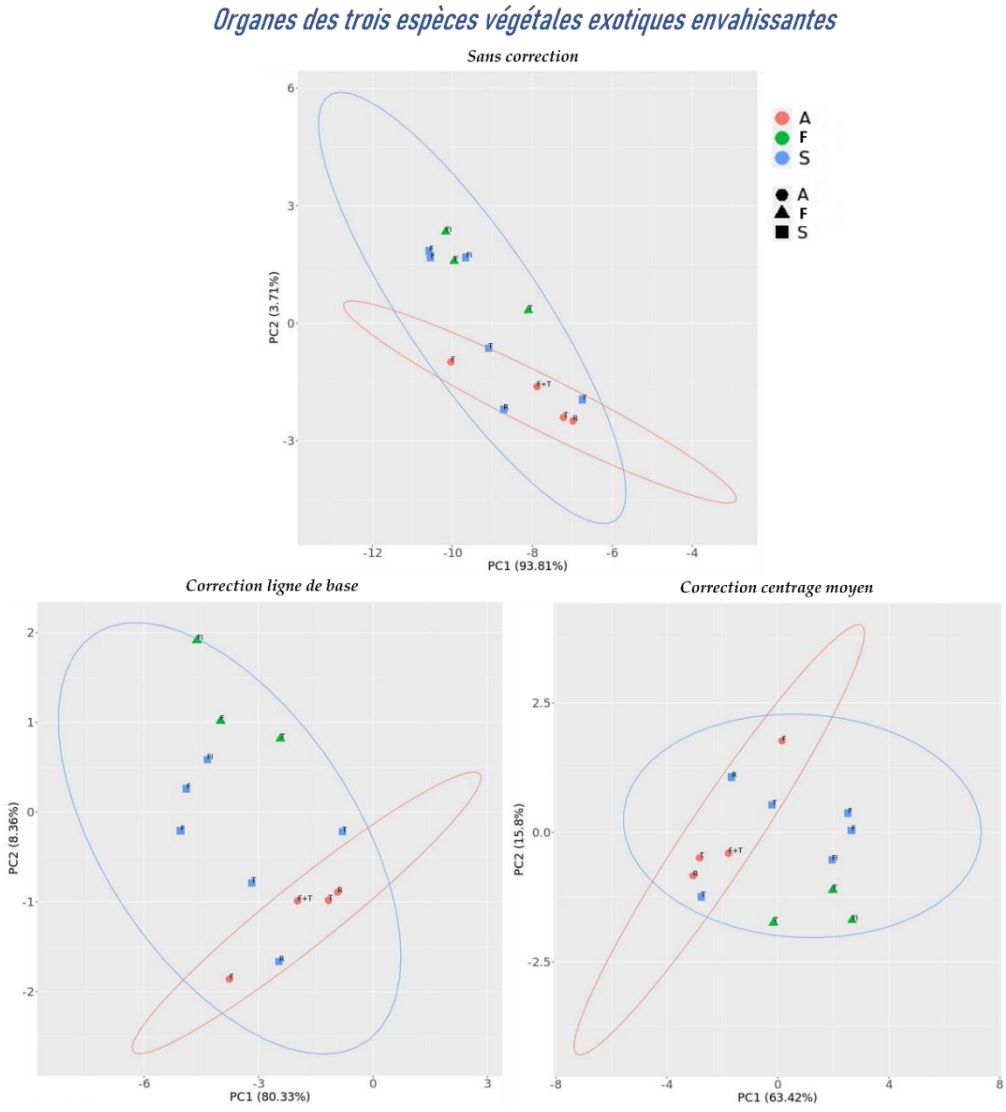


Figure 68. Analyse en composantes principales des différents organes de Fallopia japonica (F), Ambrosia artemisiifolia (A) et Solidago canadensis (S). Fleurs = Fl ; Feuilles = F ; Tiges = T et Racines ou rhizomes = R. Sans correction ou avec correction de la ligne de base ou correction centrage moyen. Systèmes d'élution et de révélation associés à la famille des composés phénoliques.

Ces différentes observations corroborent et complètent les interprétations visuelles qui ont été faites dans la section précédente. Les parties aériennes des espèces peuvent être rassemblées et sont à distinguer des parties souterraines correspondantes. L'ensemble des organes d'*A. artemisiifollia* présentent des communs avec la partie racinaire (rhizomes) notamment de *S. canadensis*. Les organes aériens de *F. japonica* et de *S. canadensis* sont proches entre eux. Cependant, les faibles intensités des spots des tiges de *F. japonica et S. canadensis* (pour la localité 2 uniquement) conduisent à des éloignements des autres organes aériens (feuilles et fleurs pour chaque espèce). De plus, des différences de compositions chimiques des tiges de *S. canadensis* provenant de deux localisations géographiques différentes peuvent être repérées. S'il semble y avoir quelques composés communs entre ces deux extraits de tiges, il se pourrait que des différences d'activités soient observées et/ou que les rendements globaux des parties aériennes de l'espèce soient différents d'une localité à l'autre. Enfin, la troisième ACP avec la correction de ligne de base *Figure 68* est celle qui permet de regrouper le mieux les tiges de *S. canadensis* avec le reste de la partie aérienne de la plante.

G. CONCLUSION

Cette première partie de travaux était consacrée à l'étude des extraits bruts éthanoliques des EVEE *F. japonica*, *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*. Leurs organes ont été criblés pour examiner leurs pouvoirs protecteurs contre le vieillissement cutané. Si les activités antioxydantes des trois espèces ou encore l'activité anti-tyrosinase chez *F. japonica* ont souvent été étudiées auparavant, il s'agit de la première fois où ces plantes ont été testées sur les cibles dermo-cosmétiques visées (superoxyde dismutase, hyaluronidase, élastase, collagénase et tyrosinase). Plusieurs tests de l'activité antioxydante (CUPRAC, chélation au fer, xanthine oxydase) viennent compléter néanmoins la littérature notamment chez *A. artemisiifolia* où très peu de données sont disponibles.

Selon le type de valorisation envisagé dans le secteur cosmétique, les trois plantes présentent un intérêt. Toutes sont de bons candidats antioxydants, comme ce qui avait pu être relevé antérieurement. Les dosages par voies chimique et enzymatique ont montré les mêmes tendances. Les activités antioxydantes observées sur les divers organes peuvent être liées à leurs teneurs en flavonoïdes et composés polyphénoliques totaux. Sur l'ensemble des cibles enzymatiques, *F. japonica* dans son entièreté est celle qui a le plus fort potentiel inhibiteur, dépassant quelques fois même les témoins positifs dans les conditions mises en œuvre dans ces travaux. Elle a une très forte activité anti-collagénase et des activités anti-hyaluronidase et anti-élastase modérées. Les propriétés anti-hyaluronidase, anti-élastase et anti-collagénase sont chez *A. artemisiifolia* respectivement modérée, faible et modérée tandis que chez *S. canadensis* elles sont faible, faible et modérée. Ces deux plantes par ailleurs ont montré des effets surprenants activateurs (effets non-monotoniques) à certaines concentrations sur les cibles élastase et collagénase. Toutes les espèces enfin avaient de faibles capacités anti-tyrosinase. Ainsi de nouvelles voies de valorisation de ces espèces problématiques en Savoie Mont Blanc sont proposées.

Les caractérisations des échantillons, au moyen de l'HPTLC simple de mise en œuvre et visuelle, ont permis de mettre en évidence leurs richesses moléculaires (en sucres, lipides, terpènes et composés

polyphénoliques). L'EtOH usité pour l'extraction des organes de plantes a ouvert à une large gamme de composés différents tels que des lipides ou terpènes les plus polaires constitutifs ou des chlorophylles apolaires. Bien qu'il soit envisageable de comparer les signatures phytochimiques de chacun des extraits bruts et d'envisager le rassemblement de certains organes en vue de leur valorisation, l'identification de la composition chimique ne peut être obtenue qu'à travers un couplage avec un détecteur quasi-universel, le spectromètre de masse. C'est pourquoi, ce détecteur a été utilisé dans les prochaines parties de travaux, couplé soit à l'HPTLC soit à l'UHPLC.

II. VALORISATION DANS LE SECTEUR DERMO-COSMETIQUE

A INTRODUCTION

Le criblage et l'évaluation des activités dermo-cosmétiques des extraits éthanoliques bruts d'organes divers de *F. japonica*, *A. artemisiifolia* et *S. canadensis* (*partie de travaux I.*) ont permis de mettre en évidence les organes des espèces les plus prometteurs selon l'activité biologique ciblée. Si l'ensemble des extraits ont montré des propriétés intéressantes, *F. japonica* s'est avérée être un très bon candidat sur la majorité des cibles examinées. Mais qu'en est-il des molécules extraites responsables des activités biologiques observées ? Est-il possible d'enrichir les extraits en molécules actives pour les valoriser dans leur intégralité entant qu'ingrédients actifs ?

Dans une approche bioguidée, classiquement après l'étape de criblage d'un extrait brut, s'en suit une étape de fractionnement bioguidé afin de cibler les molécules bioactives présentes dans l'échantillon. Par le biais de techniques chromatographiques, l'extrait brut végétal biologiquement actif est fractionné jusqu'à ce que la molécule pure active soit isolée. Tout au long du processus, les fractions sont évaluées puis uniquement celles actives sont fractionnées de nouveau. Une fois la molécule isolée (et si sa quantité est suffisante), sa structure peut être établie par des techniques divers comme la spectroscopie infrarouge, la résonance magnétique nucléaire, ou encore la MS à haute résolution. En lien avec le fractionnement guidé par l'activité biologique, des limites peuvent se présenter. La séparation peut ne pas être satisfaisante et la perte de la bioactivité en cours de processus n'est pas rare. Il est possible d'observer de faux positifs ou négatifs. Dans le cadre de tests d'activité enzymatique, une molécule peut par exemple avoir la capacité de précipiter des protéines et ainsi de montrer une inhibition. Il est possible également de négliger certaines molécules qui seraient intéressantes. En effet, elles pourraient être activées *in vivo* par des enzymes métaboliques, ce qui n'est pas pris en compte dans les criblages *in vitro* employés [458]. Cette démarche est souvent longue, fastidieuse, coûteuse et nécessite du matériel sophistiqué. De ce fait, dans ces travaux, il a été décidé de travailler avec des outils d'aide à la recherche de nouveaux actifs plus rapides, simples et efficaces. L'approche de l'HPTLC-Bioautographie/HRMS a été mise en œuvre dans un premier temps pour identifier les principaux antioxydants et inhibiteurs de la tyrosinase (seules activités décrites et compatibles avec cette méthode parmi les cibles visées) [106]. Bien que la littérature soit abondante sur les données (HP)TLC chez *F. japonica* en particulier relatives à la séparation, l'identification ou encore la quantification de ses constituants [136,145,147,427–430] ou son activité antioxydante [430], c'est la

première fois que son activité anti-tyrosinase est examinée *via* cette technique. C'est également la première fois que les activités biologiques (antioxydante et anti-tyrosinase) des deux autres espèces à l'étude (*A. artemisiifolia* et *S. canadensis*) sont évaluées par TLC.

Sur la base de ces travaux, ont ensuite été sélectionnées des standards correspondant à des constituants identifiés comme potentiellement actifs (antioxydants et/ou anti-tyrosinase) et/ou largement représentés dans le genre *Fallopia*. Ces derniers ont alors été criblés et évalués sur l'ensemble des cibles dans les mêmes conditions opératoires que les extraits bruts. Les extraits ont enfin été analysés par UHPLC-UV-Q-TOF-HRMS/MS, et les molécules ont été identifiées en se basant sur la littérature disponible [79,134,136,145,147,164,427–430]. Les molécules sélectionnées ont été suivies plus particulièrement dans l'objectif de dresser des relations 'structure-activité'. Cette seconde partie de travaux se consacre ainsi à l'identification d'actifs dermo-cosmétiques et à mettre en relation les efficacités obtenues des extraits bruts sur les cibles avec leurs compositions chimiques. La stratégie appliquée a été réalisée sur *F. japonica* préférentiellement (voir *Figure 69*). La méthodologie utilisée avec cette plante a ensuite servi de modèle et été employée avec les deux autres plantes (*A. artemisiifolia et S. canadensis*).

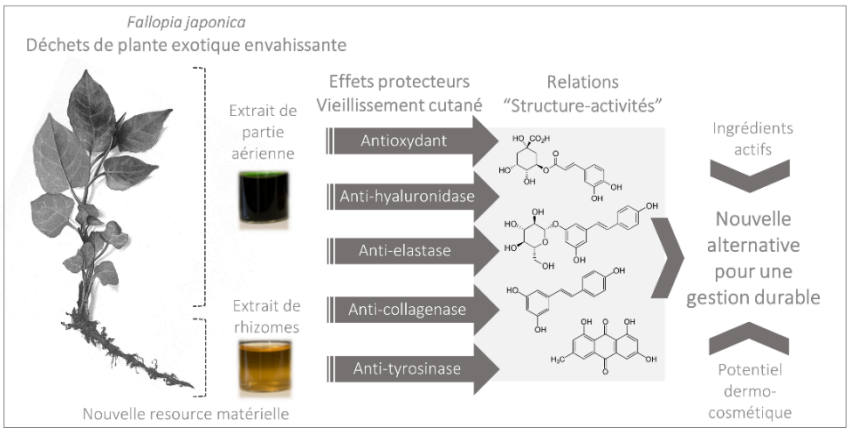


Figure 69. Résumé graphique relatif à la section « VALORISATION DANS LE SECTEUR DERMO-COSMETIQUE DE F. JAPONICA ».

B. VALORISATION DANS LE SECTEUR DERMO-COSMETIQUE DE *FALLOPIA JAPONICA*

1. COMPARAISON DES FLEURS ET DES FEUILLES

La partie aérienne, criblée et évaluée pour ses activités dermo-cosmétiques (voir première partie des travaux *I. D.*), contenait uniquement des feuilles et des cannes. Néanmoins lors des collectes sur le territoire Savoie Mont Blanc et selon la période des opérations de gestion, il peut arriver que la partie aérienne soit en floraison. En terme de valorisation chimique (activités protectrices du vieillissement cutané semblables des organes aériens, voir première partie des travaux *I. D.*) et de praticité de mise en œuvre, ces trois organes (feuilles, cannes et fleurs) pourraient être rassemblés. De plus, leurs compositions moléculaires étaient relativement proches viseullement

(voir première partie des travaux *I. F.*). Afin d'évaluer plus finement les extraits de feuilles et de fleurs notamment et les comparer, ils ont été analysés par UHPLC-UV-Q-TOF-HRMS. Les empreintes chromatographiques UV sont présentées *Figure 70*. Les *Base Peak Chromatograms* (BPC) obtenus ainsi que leurs soustractions sont quant à eux donnés *Figure 71, A*. L'analyse différentielle (rapport masse sur charge ou *m/z* discriminant) a été faite avec le logiciel *MetaboliteDetect*. Le *Tableau 7* et *Figure 71, B* résument les molécules identifiées dans les deux organes et les molécules discriminantes d'un extrait à l'autre. Ainsi il a été possible d'observer tous les composés différenciants d'un organe à l'autre. Dans le cas « Fleurs – Feuilles », ont été mis en évidence les composés présents dans les fleurs et absents dans les feuilles ainsi que les composés communs entre les deux organes mais prédominants dans les fleurs. De la même façon pour « Feuilles – Fleurs », ont été mis en évidence les composés présents dans les feuilles et absents dans les fleurs ainsi que les composés communs entre les deux organes mais prédominants dans les feuilles. Les données massiques relevées sous chacun des pics (spectres de masses originaux) ont permis de proposer des hypothèses d'identifications pour ces molécules et de comparer les données avec celles de la soustraction. Pour les composés visibles à l'UV, il a été possible d'identifier ceux faisant partis des composés majoritaires (intensité du pic ≥ 5 mAU ; arbitrairement) ou des composés minoritaires des extraits (intensité du pic < 5 mAU ; arbitrairement).

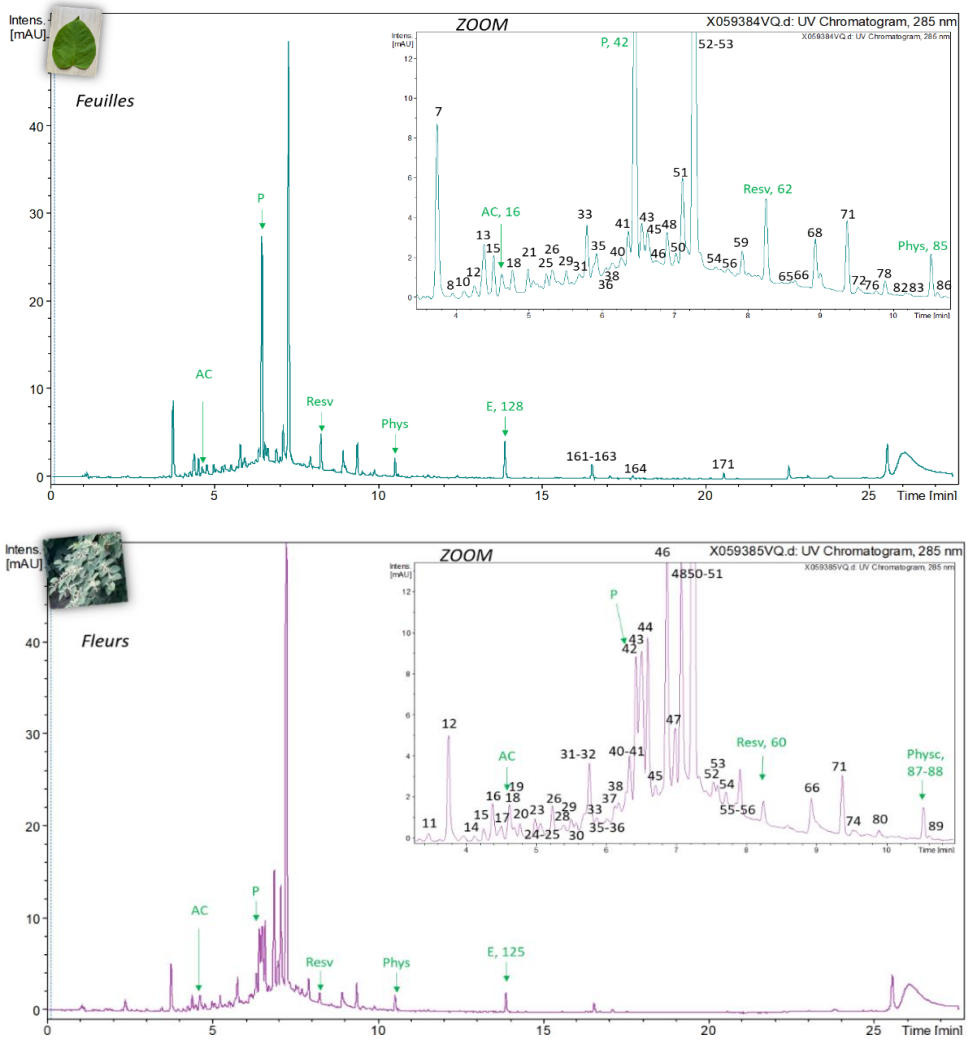


Figure 70. Chromatogrammes UV des extraits éthanoliques de feuilles (en haut) et de fleurs (en bas) de Fallopia japonica obtenus par UHPLC-UV-Q-TOF-HRMS/MS. AC = Acide chlorogénique ; P = Polydatine ; Resv = Resvératrol ; Phys = Physcion et E = Emodine. Les hypothèses d'identifications sont données dans le Tableau 7, la numérotation des pics est respectée.

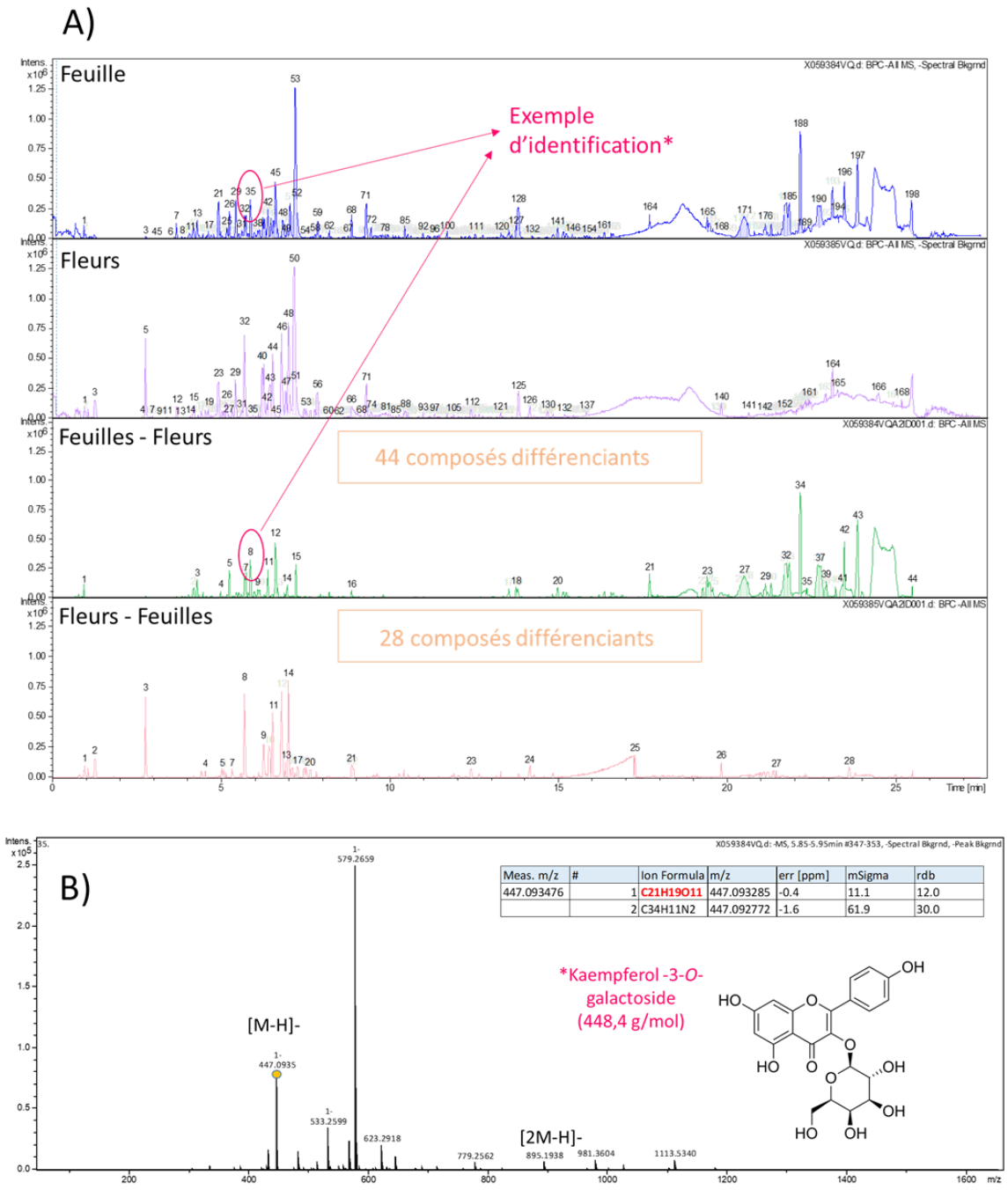


*Figure 71. A) Présentation des BPCs (Base Peak Chromatograms) des analyses UHPLC-UV-Q-TOF-HRMS en mode négatif des extraits de feuilles et de fleurs de Fallopia japonica. Le logiciel MetaboliteDetect a permis de réaliser les soustractions des BPCs des organes. *Exemple d'identification (en rose) donné en B). Les hypothèses d'identifications sont données dans le Tableau 7, la numérotation des pics est respectée.*

Tableau 7. Hypothèses d'identifications relatives aux pics numérotés Figures 70 et 71, la numérotation des pics est respectée. NI = Non identifié. Pics discriminants en gris. Fl = fleurs et F = feuilles.

TR (min)	N° pic (Fl)	N° pic (F)	N° pic soustraction Feuilles-Fleurs	N° pic soustraction Fleurs-Feuilles	Présence organe	MS [M-H]- Ion moléculaire et Max. *m/z* pour les NI	Hypothèses d'identification fonction des spectres obtenus
2,77	5			3	Fl	455,1777	Acide bétulinique
3,39	11				Fl	293,1241	NI

TR (min)	N° pic (Fl)	N° pic (F)	N° pic soustraction Feuilles-Fleurs	N° pic soustraction Fleurs-Feuilles	Présence organe	MS [M-H]- Ion moléculaire et Max. *m/z* pour les NI	Hypothèses d'identification fonction des spectres obtenus
3,71	12	7			F-Fl	353,0880	Acide 3-*O*-caffeoylquinique
3,86		8			F	613,2708	NI
4,05		10			F	1027,2531	NI
4,10	14	11			F-Fl	739,1872	NI
4,19	15	12	2		F-Fl	577,1346	Procyanidine dimère B
4,35	16	13	3		F-Fl	337,0939	Acide 3-*O*-*p*-Coumaroylquinique
4,43	18			4	Fl	577,1349	Procyanidine dimère B
4,47		15			F	325,0925	NI
4,59		16			F	353,0874	Acide 5-*O*-caffeoylquinique (AC)
4,60	19	17			F-Fl	289,0727	Catéchine
4,72	20	18			F-Fl	367,1036	Acide féruloylquinique
4,97		22	4		F	431,1922	Kaempférol-3-*O*-*α*-*L*-rhamnoside
5,04	24			5	Fl	455,1533	Acide ursolique
5,19	26	25			F-Fl	289,0717	Epicatéchine
5,23		26	5		F	433,2079	Reynoutrine
5,34	28	28		7	F-Fl	577,2483	NI
5,45	29	29			F-Fl	865,1984	NI
5,52	30	30			F-Fl	371,0989	NI
5,69	32	31		8	F-Fl	405,1206	Picéatannol glucoside
5,78		32	6		F	389,1263	Resvératroloside
5,81	33	34			F-Fl	539,213	NI
5,88		35	8		F	447,0935	Kaempférol -3-*O*-galactoside
5,96	35	36			F-Fl	627,1345	NI
6,05	37	37			F-Fl	447,0920	Lutéoline 7-*O*-galactoside
6,11	38	38	9		F-Fl	385,113	NI
6,25	41	40		9	F-Fl	609,1460	Rutine (Quercetin 3-*O*-rutinoside)
6,45	42	42	11		F-Fl	389,1244	Polydatine (3,5,4'-trihydroxystilbene 3-*O*-*ß*-*D*-glucopyranoside ou P)
6,47	43			10	Fl	441,0829	Catéchine gallate
6,54	44			11	Fl	463,0884	Isoquercitrine
6,63	45	45	12		F-Fl	555,2546	Epicatéchine-5-*O*-*b*-*D*-glucopyranoside
6,69		46	13		F	561,2549	NI
6,81	46			12	Fl	505,0988	Quercétine acetylhexoside
6,85		48			F	433,0776	Quercétine acetylhexoside
6,96	47			13	Fl	541,1359	Polydatin gallate
6,97		50	14		F	563,2702	Apiin
7,10	48	51			F	433,0785	Quercétine 3-*O*-pentoside
7,26	51	53	15		F-Fl	447,0932	Quercitrine (quercetin-3-*O*-rhamnoside)
7,48	52			18	Fl	489,1038	NI
7,53	53			19	Fl	881,1564	NI
7,51		54			F	417,2127	Aloin
7,67	54	56		20	F-Fl	417,0837	Aloin
7,87	55	59			F-Fl	431,0985	Apigénine-7-*O*-*ß*-*D*-glucoside
8,25	60	62			F-Fl	227,0713	Resvératrol (3,4 ,5-trihydroxystilbene ou Resv)
8,61		65			F	287,0555	NI
8,79		67	16		F	407,1347	Torachrysone glucoside
8,91	66	68		21	F-Fl	431,0983	Anthraglycoside B (émodin-8-*O*-*D*-glucoside)
9,39	71	71			F-Fl	517,0987	13 Emodin-8-*O*-(6′-O-malonyl)-glucoside
9,46	74	72			F-Fl	449,1449	NI
9,75		76			F	325,0385	NI
9,89	80	78			F-Fl	445,1156	Physcion glucoside
10,12		82			F	473,1086	NI
10,19		83			F	919,2291	NI
10,46	87	84			F	1063,2356	NI
10,52	88	85			F	283,0626	Physcion (Physc)
13,87	125	127	18		F-Fl	269,0457	Emodine (1,3,8-trihydroxy-6-methylanthraquinone ou E)
13,99	126	129		24	F-Fl	245,0834	Torachrysone
16,64		163	21		F	723,302	NI
17,72		164	22		F	649,3378	NI
20,52		171	28		F	797,5418	NI

La très grande majorité des molécules identifiées est commune aux deux organes (*Figures 70, 71* et *Tableau 7*) et sont retrouvées dans la littérature antérieure sur cette plante [134,136,145,147,427–430]. Plusieurs molécules restent néanmoins non identifiées. Les feuilles contiennent cependant plus de composés apolaires que les fleurs, tandis que ces dernières ont des pics d'intensité plus élevée dans la plage des composés polaires-moyennement polaires. Le chromatogrammes UV des feuilles *Figure 70* montre trois pics majoritaires (composés 7, 42 et 53). Ils ont pu être identifiés comme étant respectivement l'acide 3-*O*-caffeoylquinique, la polydatine et la quercitrine (*Tableau 7*). Dans plusieurs espèces *Fallopia* analysées auparavant, l'acides 3-*O*-caféoylquinique était également un des composés majeurs dans les feuilles ainsi que l'acide caftarique (non retrouvé ici quant a lui) [164]. Parmis les composés minoritaires de l'extrait de feuilles, sont plus particulièrement retrouvés (*Tableau 7*) : le resvératrol (composé 62), l'anthraglycoside B (composé 68), la 13 émodine-8-*O*-(6'-*O*-malonyl)-glucoside (composé 71), le physcion (composé 85) et l'émodine (composé 128). Le chromatogrammes UV des fleurs *Figure 70* montre sept pics majoritaires (composés 12, 42, 43, 44, 46, 48 et 51). Ils ont pu être identifiés (*Tableau 7*) comme étant respectivement l'acide 3-*O*-caffeoylquinique, la polydatine, la catéchine gallate, l'isoquercitrine, la quercétine acetylhexoside, la quercétine 3-*O*-pentoside et la quercitrine. Parmis les composés minoritaires de l'extrait de fleurs, sont plus particulièrement retrouvés (*Tableau 7*) : le picéatannol glucoside (composé 32), le resvératrol (composé 60), l'anthraglycoside B (composé 66), la 13 émodine-8-*O*-(6'-*O*-malonyl)-glucoside (composé 71), le physcion (composé 88) et l'émodine (composé 125).

Les BPCs *Figure 71* révèlent globalement des profils phytochimiques proches entre les extraits de feuilles et de fleurs. Plus précisémment néanmoins, 44 composés distinguent les feuilles des fleurs dont une grande majorité d'apolaires (*Figure 71, A*, *Feuilles-Fleurs*, composés 18-44) et plusieurs composés moyennement polaires (*Figure 71, A*, *Feuilles-Fleurs*, composés 3-16). Parmi les composés 18-44 est notamment retrouvée l'émodine (*Figure 71, A*, *Feuilles-Fleurs*, composé 18). Parmi les composés 3-16 (*Figure 71, A*, *Feuilles-Fleurs*), sont présents : l'acide 3-*O*-*p*-coumaroylquinique (3), des dérivés glycosylés de kaempférol (4 et 8 ou *Figure 71, B*, *Feuilles composé* 35), la reynoutrine (5), le resvératroloside (6), la polydatine (11), un dérivé glycosylé de catéchine (12), l'apiine (14), la quercitrine (15) et la torachrysone glucoside (16). Les fleurs quant à elles se différencient des feuilles par 28 composés, dont majoritairement des composés moyennement polaires (*Figure 71, A*, *Fleurs-Feuilles,* composés 3-21). Il y a en particulier l'acide bétulique (3), la procyanidine dimère B (4), l'acide ursolique (5), le picéatannol glucoside (8), la rutine (9), la catéchine gallate (10), l'isoquercitrine (11), la quercétine acetylhexoside (12), la polydatine gallate (13), l'aloïne (20) et un dérivé glycosylé d'émodine (21). Le composé (24) plus apolaire correspond à la torachrysone. Plusieurs de ces composés sont uniquement présents dans les fleurs comme l'acide bétulinique (3), la procyanidine dimère B (4), l'acide ursolique (5), la catéchine gallate (10), l'isoquercitrine (11) et la polydatine gallate (13). Ces derniers sont par ailleurs réputés antioxydants [79]. Les fleurs de *F. japonica* contiennent plusieurs flavonoïdes discriminants comme la rutine, l'isoquercitrine ou encore la quercétine acétylhexoside, ce qui est cohérent avec les hypothèses émises dans la *première partie des travaux I. F. 3.* (les fleurs possèdent plus de flavonoïdes que les feuilles).

Pour conclure sur cette comparaison, les compositions phytochimiques des deux organes de *F. japonica* sont très proches entre elles ; confirmant ce qui avait été observé visuellement. L'extrait de fleurs possède sept composés majoritaires dont trois communs (acide 3-*O*-caffeoylquinique, polydatine, quercitrine) avec l'extrait de feuilles dans lequel ils sont également majoritaires. Leurs principales molécules minoritaires quant à elles sont les mêmes. La différenciation des deux organes se fait principalement au niveau de quelques minoritaires et de deux composés majoritaires (catéchine gallate, isoquercitrine) uniquement présents chez les fleurs. Ces deux derniers ont antérieurement montrés des propriétés antioxydantes [79] ; et pourraient participer à l'activité globale d'un extrait de *F. japonica* qui regrouperaient ses organes aériens. Ainsi l'ensemble des informations récoltés sur ces organes peuvent justifier leur rassemblement lors des opérations de gestion en vue de leur valorisation chimique.

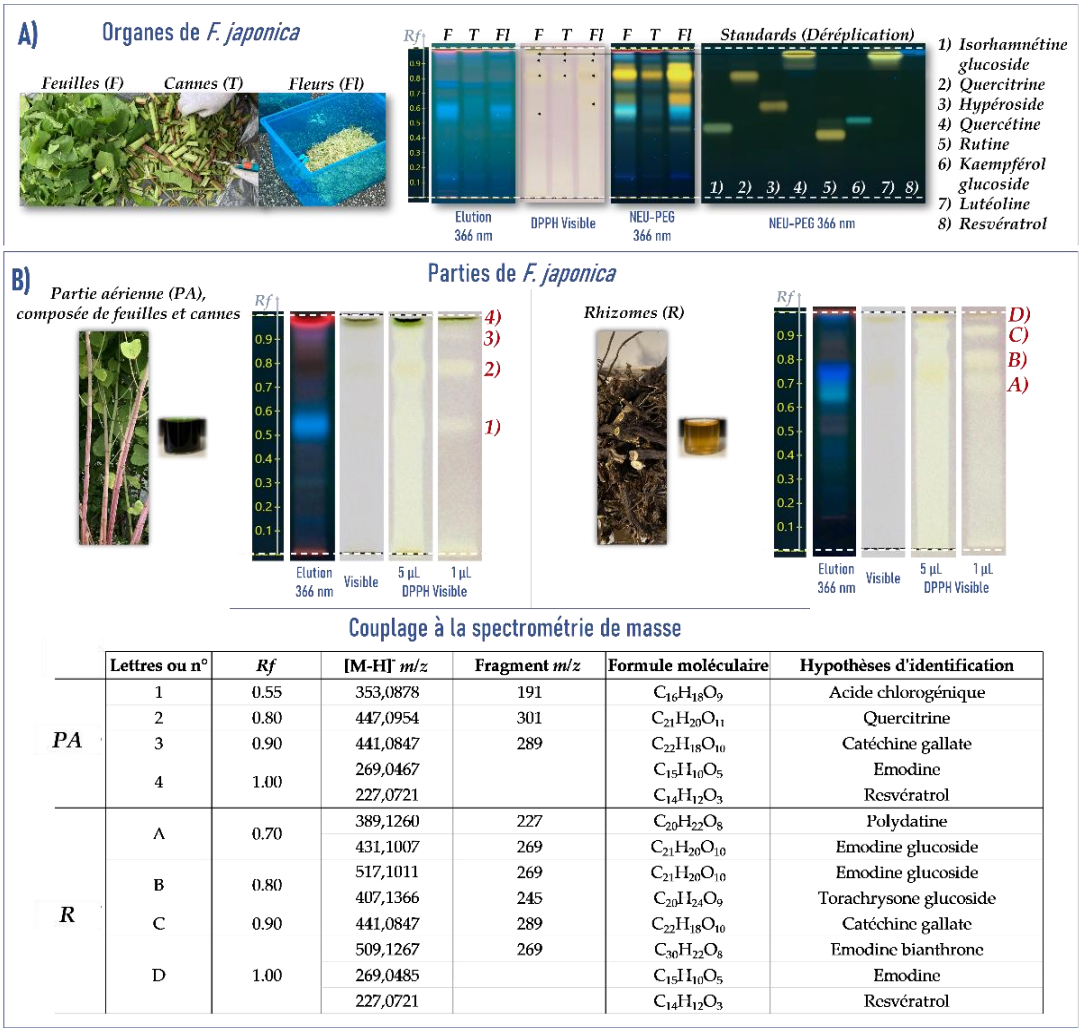
2. CARACTERISATION DES PRINCIPAUX ANTIOXYDANTS

Les différents organes de *F. japonica* ont montré de fortes propriétés antioxydantes (*voir* première partie des travaux *I. D. 1.*), en accord avec la littérature abondante relative à l'activité antioxydante de cette espèce [79,143,159,161]. Afin d'identifier les marqueurs potentiellement responsables de l'activité observée avec les extraits bruts, l'approche HPTLC-DPPH a d'abord été utilisée, en se basant sur la seul étude antérieure répertoriée pour cette espèce [430]. Le principe de déréplication (dépôts de standards déjà répertoriés dans la littérature chez *F. japonica* et réputés antioxydants [79,430]) a de plus été appliqué pour valider les hypothèses d'identification des molécules présentant un caractère antioxydant (corrélations de couleurs et *Rfs* de spots). Enfin une analyse plus fine par MS a permis de compléter les hypothèses émises et de caractériser les différents spots actifs détectés. La *Figure 72* ci-après illustre les résultats obtenus.

Lors de l'évaluation de l'activité protectrice des feuilles (F), des cannes (T) et des fleurs (Fl) *(A, Figure 72)*, il s'avère que le DPPH souligne un fort caractère antioxydant pour les trois organes aériens sur l'intégralité de la gamme de polarité. Une diffusion significative est par ailleurs observée caractéristique d'un effet solvant ou de molécules restant accrochées au support lors de leur élution (volume déposé d'extraits = 5 µL). L'effet solvant a été écarté car d'autres extraits testés préparés dans les mêmes conditions n'ont pas présenté ce phénomène. Malgré la diffusion, les trois organes présentent des spots antioxydants de fortes intensités distinctifs. L'extrait de feuilles possède notamment quatre spots d'intensité élevée *Rf*0,55, *Rf* 0,80, *Rf* 0,90 et *Rf* 1,00 et les extraits de cannes et fleurs trois spots aux *Rf* 0,80, *Rf* 0,90 et *Rf* 1,00 (communs avec les feuilles). L'extrait de fleurs en possède un quatrième singulier au *Rf* 0,65.

L'association des *Rfs* et couleurs observées suggèrent que les trois extraits contiennent du resvératrol (spot bleu, *Rf* 1,00) et de la quercitrine (spot jaune orangé, *Rf* 0,80). L'extrait de fleurs pourrait aussi contenir de l'hypéroside. La liste des standards n'étant pas exhaustive, certains spots ne peuvent être caractérisés de cette façon (*Rf* 0,55 et *Rf* 0,90). Du fait de leurs couleurs en revanche, ils doivent appartenir aux familles des acides phénoliques (spots de couleur bleutée) et/ou des flavonoïdes (couleur jaune associée au bleu *Rf* 0,90) [430]. Dans une étude menée sur des extraits de *Polygonum* sp. [430] avaient pu être déterminés comme antioxydants :

resvératrol, quercétine et dérivé (rutine) ou encore les acides gallique, férulique, et *p*-coumarique ce qui appuie nos résultats. Cependant, l'hypéroside n'a pas été détecté lors de l'analyse UHPLC-MS de l'extrait de fleurs (voir section précédente) et ce composé ne montrait pas d'activité antioxydante antérieurement [430]. Il doit donc s'agir d'un autre composé actif dans les fleurs.



	Lettres ou n°	*Rf*	[M-H]⁻ *m/z*	Fragment *m/z*	Formule moléculaire	Hypothèses d'identification
PA	1	0.55	353,0878	191	$C_{16}H_{18}O_9$	Acide chlorogénique
	2	0.80	447,0954	301	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Quercitrine
	3	0.90	441,0847	289	$C_{22}H_{18}O_{10}$	Catéchine gallate
	4	1.00	269,0467		$C_{15}H_{10}O_5$	Emodine
			227,0721		$C_{14}H_{12}O_3$	Resvératrol
R	A	0.70	389,1260	227	$C_{20}H_{22}O_8$	Polydatine
			431,1007	269	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Emodine glucoside
	B	0.80	517,1011	269	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Emodine glucoside
			407,1366	245	$C_{20}H_{24}O_9$	Torachrysone glucoside
	C	0.90	441,0847	289	$C_{22}H_{18}O_{10}$	Catéchine gallate
			509,1267	269	$C_{30}H_{22}O_8$	Emodine bianthrone
	D	1.00	269,0485		$C_{15}H_{10}O_5$	Emodine
			227,0721		$C_{14}H_{12}O_3$	Resvératrol

Figure 72. (a) Mise en évidence du caractère antioxydant des organes aériens de Fallopia japonica. (b) Capacités antioxydantes des parties aérienne et racinaire de Fallopia japonica et détermination des principales molécules actives.

Dans la *Figure 72 (B),* le même type de diffusion significative est observée avec les extraits de partie aérienne et de rhizomes rendant difficile la caractérisation des principaux antioxydantes (volume déposé d'extraits de 5 µL). Pour limiter cet effet, seul un dépôt d'1 µL a permis d'obtenir des spots distincts. Pour la partie aérienne à nouveau quatre spots sont décelés (*Figure 72 (B), 1-4*) qui correspond bien au regroupement des feuilles et des cannes. Les informations de masses ont permis de confirmer la présence de resvératrol (*Rf* 1,00) et de quercitrine (*Rf* 0,80). Il a également été possible de caractériser l'acide chlorogénique et la catéchine gallate correspondant aux *Rf* 0,55 et *Rf* 0,90 respectivement. Néanmoins, au *Rf* 1,00 il a aussi été identifié de l'émodine. Les deux molécules sont actives en se référant aux études antérieure [79,185,430,459]. Des molécules de *Rf* très proches peuvent également apparaître sous un même spot du fait de la forme et surface de la buse de l'interface TLC-MS.

Pour le rhizomes quatre composés actifs sont présents aux *Rf* 0,70, *Rf* 0,80, *Rf* 0,90 et *Rf* 1,00 (*Figure 72 (B), A-D*). Sont détectés plusieurs dérivés d'émodine, des stilbènes, un glucoside naphtalène et un dérivé de catéchine. Exceptée pour cette dernière (*Rf* 0,90 ; *Figure 72 (B), C*), des co-élutions sont aussi observées (*Figure 72 (B), A, B et D*) ne permettant pas de conclure sur les activités antioxydantes de ces composés. Néanmoins dans un travail utilisant la technique en ligne UHPLC-ABTS pour évaluer l'activité antioxydante [79], les auteurs ont montré que diverses molécules dont la catéchine gallate, l'acide chlorogénique ou encore le resvératrol possédaient une capacité de piégeage des radicaux, ce qui appuie une partie des résultats obtenus ici. Plusieurs dérivés d'émodine et de quercétine également, présent chez *F. sachalinensis*, ont présenté un caractère antioxydant DPPH [459]. Pour conclure, l'ensemble des molécules répertoriées dans le tableau *Figure 72 (B)* sont de potentiels antioxydants participant à l'activité globale des extraits produits (*voir* première partie des travaux *I. D. 1.*).

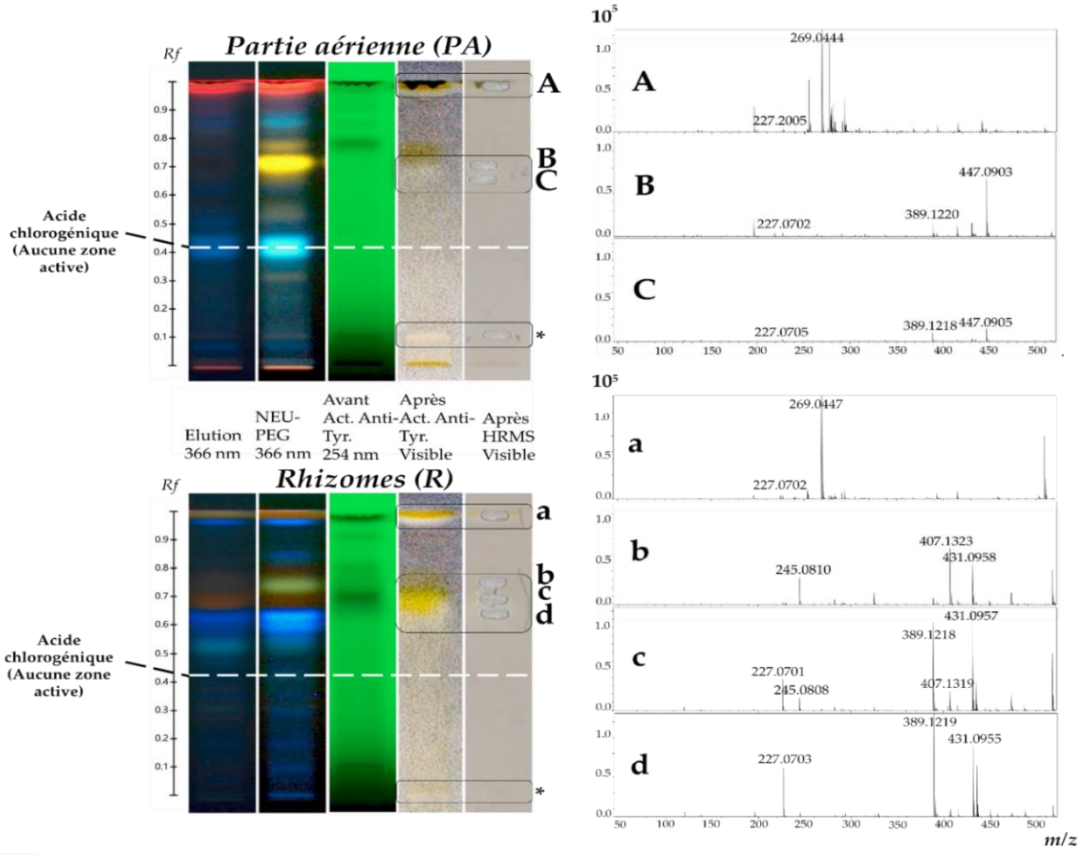
3. IDENTIFICATION DES PRINCIPAUX INHIBITEURS DE LA TYROSINASE

Les extraits bruts des divers organes de *F. japonica* ont montré de faibles effets inhibiteurs de la tyrosinase en microplaques (*voir* première partie des travaux *I. D. 2. d)*) à contrario des autres cibles enzymatiques dermo-cosmétiques évaluées. La littérature relative à l'activité anti-tyrosinase de cette espèce et/ou de certaines de ses molécules constitutives (resvératrol, émodine, *etc.*) est souvent mitigée [92,196,205]. Il n'a pas été trouvée dans la littérature d'approche HPTLC- bioautographie menée sur cette espèce. Compatible avec la TLC, l'activité anti-tyrosinase a ainsi été réalisée directement sur la plaque et observée à la lumière blanche afin d'apporter de la complémentarité aux études antérieures. Le fond marron de la plaque représente la conversion de la *L*-Dopa et les zones blanches le ou les potentiel(s) inhibiteurs de l'enzyme [110]. Des hypothèses structurales des marqueurs actifs anti-tyrosinase ont ensuite pu être données à l'aide du couplage HPTLC-Bioautographie/HRMS. Les résultats obtenus sont présentés dans la *Figure 73*. Ces derniers ont révélé trois spots actifs anti-tyrosinase dans la PA (*Rfs* 1,00, 0,70–0,65 diffuse et 0,10, *Figure 73 A-C* et *) et trois également dans la R (*Rf* 1,00, 0,75–0,65 très diffus et 0,02 ; *Figure 73 a-d* et *). La PA apparaît légèrement moins active que les rhizomes, en particulier dans la gamme de polarité moyennement polaire (milieu de plaque) et des zones apolaires au front de solvant. En correspondance des *Rfs* mentionnées au-dessus dans les profils révélés cette fois-ci au NEU-PEG, les spots présentent des couleurs très différentes.

Dans la PA et la R pour les zones *Rf* 1,00 (*Figure 73 A, a*), des informations massiques ont été obtenues correspondant aux ions à *m/z* 227,2005, *m/z* 269,0444 ions et aux ions à *m/z* 227,0702, *m/z* 269,0447 respectivement. Au NEU-PEG, une tache rouge et une tache bleu-brun ont été observées, respectivement encore dans les deux organes. Le resvératrol et l'émodine peuvent correspondre et sont co-éluées ; ce qui est en accord avec la section de travaux précédente. En effet, les couleurs des spots laissent supposer des co-élutions car le resvératrol seul est bleu en NEU-PEG et l'émodine jaune. La couleur rouge dans la PA peut davantage être associée à des chlorophylles masquant le bleu et le jaune. Pour le *Rf* 0,70–0,65, zone dans l'extrait de PA relativement diffuse (*Figure 73 B, C*), une tache jaune-bleu dans le NEU-PEG a été observée. Les informations de masses ont été obtenues correspondant à l'ion *m/z* 447.0903, qui peut correspondre à un glucoside de quercitrine ou de lutéoline

(jaune) ; et l'ion *m/z* 389,1220 avec son fragment potentiel à *m/z* 227,0702 (*Figure 73 B* par exemple) relatifs à la polydatine (bleu).

Dans l'extrait de rhizomes, le *Rf* 0,75–0,65, zone très diffuse (*Figure 73 b–d*) a été divisée en deux sous-zones : la zone *Rf* 0,75 et la zone *Rf* 0,70–0,65, avec respectivement des couleurs vert et marron-bleu (NEU-PEG). Dans la sous-zone verte *Rf* 0,75 (*Figure 74 b*) sont présents l'ion *m/z* 407,1323 avec son potentiel ion fragment *m/z* 245,0810, pouvant correspondre au glucoside de torachrysone, et *m/z* 431,0958, associés aux propositions structurelles de glycoside d'émodine, glycoside de kaempférol ou encore glucoside d'apigénine. Dans la sous-zone brune *Rf* 0,70–0,65 (*Figure 73 c*) est présente la même information de masses, mais le glucoside de torachrysone semble moins intense et le glycoside d'émodine, le glycoside de kaempférol ou le glucoside d'apigénine plus intenses que sur la *Figure 73 b*, confirmant la diffusion et la co-élution de ces composés.



	Lettres	*Rf*	NEU-PEG	*m/z*	Formule moléculaire	Hypothèses d'identification
PA	A	1.00	Rouge	269.0444	$C_{15}H_{10}O_5$	Emodine
				227.2005	$C_{14}H_{12}O_3$	Resvératrol
	B–C	0.70—0.65	Jaune–Bleu	447.0903–447.0905	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Quercitrine, Lutéoline glucoside
				389.1220–389.1218	$C_{20}H_{22}O_8$	Polydatine
R	a	1.00	Bleu–Marron	269.0447	$C_{15}H_{10}O_5$	Emodine
				227.0702	$C_{14}H_{12}O_3$	Resvératrol
	b	0.75	Vert	431.0958	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Emodine glucoside, Kaempférol glucoside, Apigénine glucoside
				407.1323	$C_{20}H_{24}O_9$	Torachrysone glucoside
	c–d	0.70—0.65	Marron–Bleu	431.0957–431.0955	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Emodine glucoside, Kaempférol glucoside, Apigénine glucoside
				407.1319	$C_{20}H_{24}O_9$	Torachrysone glucoside
				389.1218–389.1219	$C_{20}H_{22}O_8$	Polydatine

Figure 73. . Détection de trois zones actives dans la partie aérienne (feuilles et cannes) et de trois zones actives dans les rhizomes sur tyrosinase (Tyr.), entourées en noir sur la plaque. Propositions d'identifications d'inhibiteurs de la tyrosinase à l'aide de HPTLC-Bioautographie /HRMS en mode d'ionisation négative ; zones marquées d'une lettre.

*Act. =Activité. m/z : rapport masse sur charge. * Non-détecté.*

Il a également été observé un autre ion à *m/z* 389,1218, avec son ion fragment potentiel à *m/z* 227,0701, pouvant se rapporter à la proposition de la polydatine. Des ions identiques avaient aussi été trouvés dans la PA au même *Rf*. Enfin, la polydatine est également présente (*Figure 73 d*) avec des ions plus intenses (*m/z* 389,1219 et *m/z* 227,0703) que *Figure 73 c*. L'ion *m/z* 431,0955 a aussi été observé, moins intense que la *Figure 73 c*, confirmant la grande diffusivité de cette zone moyennement polaire.

Aucune information de masse (*Figure 73*, * Non détecté) n'a été obtenue pour la tache orange (*Rf* 0,10) dans la PA et la tache bleue (*Rf* 0,02) dans la R dans le mode d'ionisation négatif usité. Il est possible que ce mode d'ionisation n'ait pas permis d'ioniser la ou les molécules présentes correctement ou que la(les) quantité(s) présente(s) n'ai(en)t pas été suffisante(s) pour être détectée(s). Il aurait été intéressant de réaliser la même analyse en mode d'ionisation positif pour voir si une information massique était obtenue.

La différence d'activité anti-tyrosinase entre les deux extraits, en particulier dans les zones *Rf* 0,65–0,70, pourrait être due à leur singularité phytochimique et/ou l'abondance relative des composés. En effet, l'extrait de partie aérienne contenait de la quercitrine ou du glucoside de lutéoline non représenté dans celui de rhizomes, et ce dernier contenait du glycoside d'émodine ou du glycoside de kaempférol ou du glucoside d'apigénine non représenté dans l'extrait de partie aérienne. Présente dans les deux extraits, la polydatine était néanmoins moins intense dans la PA que dans la R. De plus, parmi les propositions structurelles correspondant à l'ion *m/z* 431, il pourrait s'agir de dérivés d'émodine, étant donné que la génine d'émodine seule en front de solvant apparaît aussi active.

Pour conclure sur ce travail, les principaux inhibiteurs de la tyrosinase identifiés sont le resvératrol, la polydatine, l'émodine et ses dérivés glucosides, la quercitrine ou le glucoside de lutéoline ou le glucoside de torachrysone ; corroborant avec plusieurs travaux antérieurs [92,196,205,460–462]. Les activités du resvératrol et de la polydatine ont été de plus confirmées par le dépôt de standards dans les mêmes conditions (*Figure 74*). Dans cette *Figure 74*, il est par ailleurs possible de confirmer la diffusivité du spot de polydatine, appuyant les observations faites précédemment. Dans une précédente étude néanmoins sur des composés isolés de l'extrait de racines de *F. japonica* de Taïwan, les deux stilbènes (resvératrol et polydatine) n'avaient montré aucune activité [205] ; contrastant alors avec nos résultats.

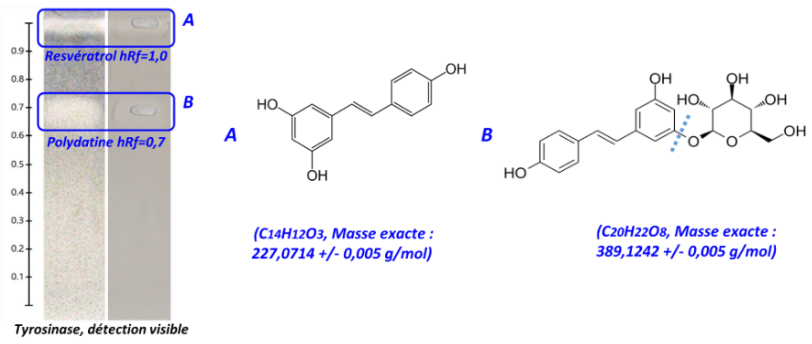
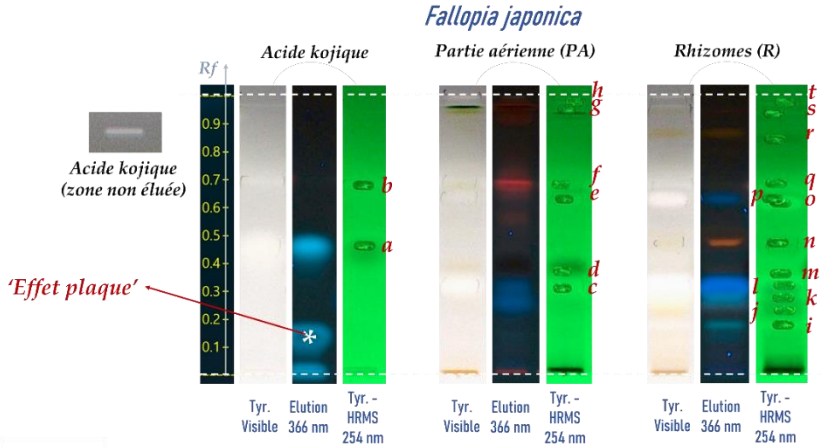


Figure 74. Evaluation des activités anti-tyrosinase des standards de stilbènes resvératrol (A) et polydatine (B). Zone diffuse en (B) liée à la polydatine.

Etant donné que plusieurs co-élutions ont été observées et que certains composés colorés pourraient interférés avec la visualisation de l'activité anti-tyrosinase, une deuxième analyse bioautographique-MS a été menée dans des conditions d'élutions différentes (succession d'élutions) afin d'essayer de séparer aux mieux les diverses molécules potentiellement actives sur la cible en particulier les génines de resvératrol et d'émodine ainsi que la polydatine des dérivés d'anthraquinone, de flavonoïdes et de naphthol. L'acide kojique a été utilisé comme témoin positif, afin de valider le test plaque. Il a été déposé à la fois dans la zone éluée et non éluée (au-delà du front de solvant). Les résultats obtenus sont alors montrés *Figure 75*.

Lors de l'élution du témoin positif, trois spots sont visibles (*Figure 75, Rf 0,15, 0,45 et 0,70)*. Il s'avère après couplage à l'HRMS que le composé est situé *Rf 0,45 (Figure 75 a)* car aucune information massique n'a été trouvée au *Rf 0,70 (Figure 75 b)* en dehors de la *L*-Dopa et que pour le spot à *Rf 0,25* aucune tâche n'est présente à 254 nm. Il se peut donc que le spot bleuté dans cette plage de polarité (visible à 366 nm) soit lié à un effet plaque ou 'effet d'accrochage' du composé et que le spot *Rf 0,70* soit lié à un effet solvant dû aux élutions successives effectuées.



	Lettres ou n°	Rf	Couleur	[M-H]⁻ m/z	Fragment m/z	Formule moléculaire	Hypothèses d'identification
Support	_	0.00-1.00	Noir (366 nm)	196,13	_	$C_9H_{11}NO_4$	L-Dopa
Contrôle positif	*a*	0.45	Bleu (366 nm)	141,15	_	$C_6H_6O_4$	Acide kojique
	b	0.70	_	_	_	_	_
PA (feuilles et cannes)	*c*	0.32	Bleu (366 nm)	389,14	227	$C_{20}H_{22}O_8$	Polydatine
			Orangé (Visible)	447,11	301	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Quercitrine ou glucoside de lutéoline
	d	0.38	Orangé (Visible)	447,11	301	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Quercitrine ou glucoside de lutéoline
	e	0.65	_	227,18	_	$C_{14}H_{12}O_3$	Resvératrol
	f	0.70	Rougeâtre (366 nm)	441,34	289	$C_{22}H_{18}O_{10}$	Catéchine gallate
				509,02	269	$C_{30}H_{22}O_8$	Emodine bianthrone
	g	0.98	Jaune-Vert (Visible)	_	_	_	_
	h	1.00	_	_	_	_	_
R	*i*	0.20	Bleu-Vert (366 nm)	_	_	_	_
	j	0.25	Marron (366 nm)	517,12	269	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Emodine glucoside
				473,14	_		
	k	0.30	Bleu-Vert (366 nm)	517,12	269	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Emodine glucoside
				389,15	227	$C_{20}H_{22}O_8$	Polydatine
	l	0.35	Bleu (366 nm)	389,15	227	$C_{20}H_{22}O_8$	Polydatine
	m	0.38	Marron (366 nm)	283,11	269	$C_{16}H_{12}O_5$ ou $C_{15}H_8O_6$	Physcion ou Rhéine
	n	0.50	Marron (366 nm)	431,12	269	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Emodine glucoside
	o	0.65	Bleu (366 nm)	227,12	_	$C_{14}H_{12}O_3$	Resvératrol
	p	0.69	Bleu-Marron (366 nm)	509,16	269	$C_{30}H_{22}O_8$	Emodine bianthrone
	q	0.70	Marron (366 nm)	509,14	269	$C_{30}H_{22}O_8$	Emodine bianthrone
	r	0.85	Marron (366 nm)	269,07	_	$C_{15}H_{10}O_5$	Emodine
	s	0.95	_	283,13	269	$C_{16}H_{12}O_5$ ou $C_{15}H_8O_6$	Physcion ou Rhéine
	t	1.00	_	_	_	_	_

Figure 75. Identification putative d'inhibiteurs potentiels de la tyrosinase (Tyr.) à l'aide de HPTLC-Bioautographie/MS en mode d'ionisation négative ; zones marquées d'une lettre. m/z : rapport masse sur charge.

Cet effet solvant est également observable dans les extraits à ce même *Rf (Figure 75 f et q)*. Il pourrait induire de faux positifs dans cette plage de polarité. Pour l'extrait de partie aérienne, trois spots actifs d'intensité élevée sont présents (*Figure 75 c, e et h, Rf 0,32, 0,65 et 1,00 respectivement)*. Sont alors retrouvés *Rf 0,32* la polydatine et le resvératrol au *Rf 0,65*. En front de solvant en revanche, aucune information massique n'a été trouvé en dehors de l'ion *m/z* 196,13 correspondant à la *L*-Dopa. Cela peut traduire une extinction du signal ou que la quantité de composé potentiellement présent n'est pas suffisante pour permettre sa détection. Le mode d'ionisation choisi peut ne pas permettre d'ioniser correctement le(s) composé(s) du spot. L'hypothèse qu'aucune molécule ne soit présente ici a été rejetée car une tâche était bien visible à 254 nm. Cette observation confirme l'activité anti-tyrosinase de ces deux stilbènes dans la partie aérienne de la plante.

Trois autres spots colorés (brun-jaune) sont par ailleurs visibles dans la PA aux *Rf 0,38, 0,70 et 0,98* (*Figure 75 d, f et g).* Ils ne semblent pas présenter d'activité particulière significative. Même si le spot *f* apparaît actif, il est difficile de conclure car il pourrait s'agir d'un faux positif comme démontré auparavant lié (effet solvant). Les spots *d* et *f* ont été caractérisés comme étant la quercitrine ou glucoside de lutéoline et la catéchine gallate co-éluée avec de l'émodine bianthrone ; respectivement. La couleur du spot *Rf 0,98* étant jaune-verte, des chlorophylles peuvent aussi être présentes, même si seule la *L*-Dopa est détectée dans cette zone. La même information massique est globalement obtenue en comparaison de l'analyse TLC-HRMS précédente sauf pour l'émodine bianthrone car seule l'ion à *m/z* 269 correspondant à la génine avait pu être identifiées (*Rf* 1,00). Concernant l'extrait de rhizomes, 5 zones sont actives aux *Rf 0,20, 0,30-0,38* (très diffuse)*, 0,65* et *0,95 et 1,00*. Aucune information massique n'a été observée en dehors de la *L*-Dopa *Rf 0,20*, tandis que de l'émodine glycoside, de la polydatine et du physcion ou de la rhéine ont pu être identifiés dans la zone à diffusivité élevée. Le resvératrol est présent au *Rf 0,65*, et du physcion ou de la rhéine *Rf 0,95.* Aucun composé n'a pu être identifié en front de solvant (*Figure 75 t)*, comme dans la PA. D'autres molécules ont pu être détectées sans potentielle activité contre la cible enzymatique à savoir l'émodine *m/z* 269,07 (*Figure 75 r, Rf 0,85)* et divers de ses dérivés glycosylés correspondants aux ions *m/z* 517,12 (*Figure 75 j, Rf 0,25)* qui n'avait pas été identifié dans l'analyse précédente et *m/z* 431,12 (*Figure 75 n, Rf 0,50)* présent cette fois-ci dans l'analyse précédente. Il est difficile à nouveau de conclure quant à l'activité de l'émodine bianthrone du fait de l'effet solvant dans cette plage de polarité (*Figure 75 q, Rf 0,70).*

Ces nouvelles informations ont ainsi permis d'aller plus loin dans l'identification des inhibiteurs anti-tyrosinase potentiels. Si certaines activités sont confirmées (voir *Figure 74*), d'autres ne le sont pas concernant les quinones. En effet bien que l'élution réalisée ait permis de séparer voire même d'isoler les quinones des stilbènoïdes aucune activité n'a été décelée dans les conditions mises en œuvre. Une étude antérieure montre pourtant que les anthraquinones (physcion, émodine, citréoroseine et anthraglycoside B) avaient des effets d'inhibition modérés à forts, dans un test de tyrosinase acellulaire. La molécule de physcion était l'inhibiteur le plus puissant (30% de l'activité résiduelle de la tyrosinase), montrant également de manière significative une perméation plus élevée que l'émodine [202]. De l'épicatechine aggalate avait montré des propriétés anti-tyrosinase [463,464] (ce qui n'est pas vérifié ici car il y a co-élution de la catéchine gallate avec l'émodine bianthrone). Des investigations plus spécifiquement sur les anthraquinones seraient intéresssantes.

4. CRIBLAGE DERMO-COSMETIQUE DE STANDARDS SELECTIONNES

Dans cette section, ont été criblés et évalués sur les quatre cibles enzymatiques (hyaluronidase, élastase, collagénase et tyrosinase) quelques standards représentatifs sélectionnés (dans des conditions identiques à celles des extraits, *voir* première partie des travaux *I. D. 2.*). Le choix s'est fait notamment aux dépens des travaux bioautographiques réalisés dans les deux sections précédentes (voir *sections II. B. 2. et II. B. 3.*) et des disponibilités au laboratoire. Plusieurs composés dans la partie aérienne et les rhizomes de *F. japonica* ont pu y être identifiées dont certaines actives antioxydantes et/ou anti-tyrosinase. Il s'agit d'autre part de molécules largement représentées chez *Fallopia* spp [134,136,145,147,205,418,425,427–430]. Il a été question ici de dresser des relations « structure-activité » et de discuter ensuite des efficacités des extraits bruts sur les quatre cibles d'intérêt avec leur composition moléculaire. Des exemples d'électrophérogrammes pour le contrôle, l'acide chlorogénique et le resvératrol obtenus pour les dosages de hyaluronidase sont donnés *Figure 76* et les résultats sur l'ensemble des cibles enzymatiques présentés *Figure 77.*

Les résultats présentés dans les *Figures 76 et 77* ont révélé des efficacités différentes sur les quatre cibles pour les standards évalués. En observant les activités résiduelles sur les quatre enzymes des standards, à la concentration la plus faible soit 10 µg/mL, les inhibitions les plus fortes observées (de 100 à 0%) concernent la collagénase (*Figure 77 c*). Les activités anti-collagénase des standards ont ainsi été qualifiées de fortes. De plus actif au moins actif sur la collagénase, les standards peuvent être classés ainsi : émodine >> resvératrol > physcion >polydatine > acide chlorogénique > chrysophanol. Par comparaison à 10 µg/mL avec ces dernières, leurs activités anti-hyaluronidase et anti-élastase ont alors été considérées comme modérées (*Figure 77 a, b*) et leurs activités anti-tyrosinase comme faibles (*Figure 77 d*). Ces mêmes tendances sur les cibles avaient également pu être faites sur les activités globales des extraits bruts, ce qui paraît cohérent. Les étalons montrent des effets dose-réponse sur toutes les cibles dermo-cosmétiques à l'exception de l'émodine qui présente sur l'élastase et la collagénase un effet plateau. Il n'est pas possible en revanche de conclure sur un type d'effet (dose-dépendant ou plateau) pour le chrysophanol pour lequel une seule concentration a pu être testée dans chacun des cas.

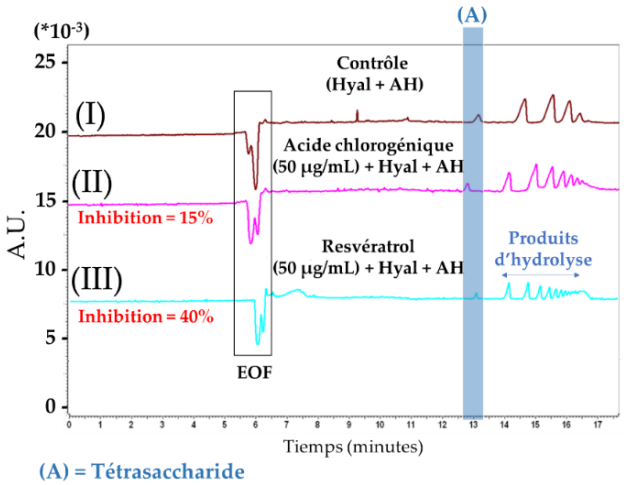


Figure 76. Electrophérogrammes obtenus avec CE-UV pour les dosages de la hyaluronidase : dosage contrôle en l'absence de standards inhibiteurs (I) et effet à 50 µg/mL de l'acide chlorogénique (II) et du resvératrol (III). Hyal : hyaluronidase et AH : acide hyaluronique. Identification des pics : flux électroosmotique (EOF) à 6 min et pic (A) : tétrasaccharide migrant à 13 min.

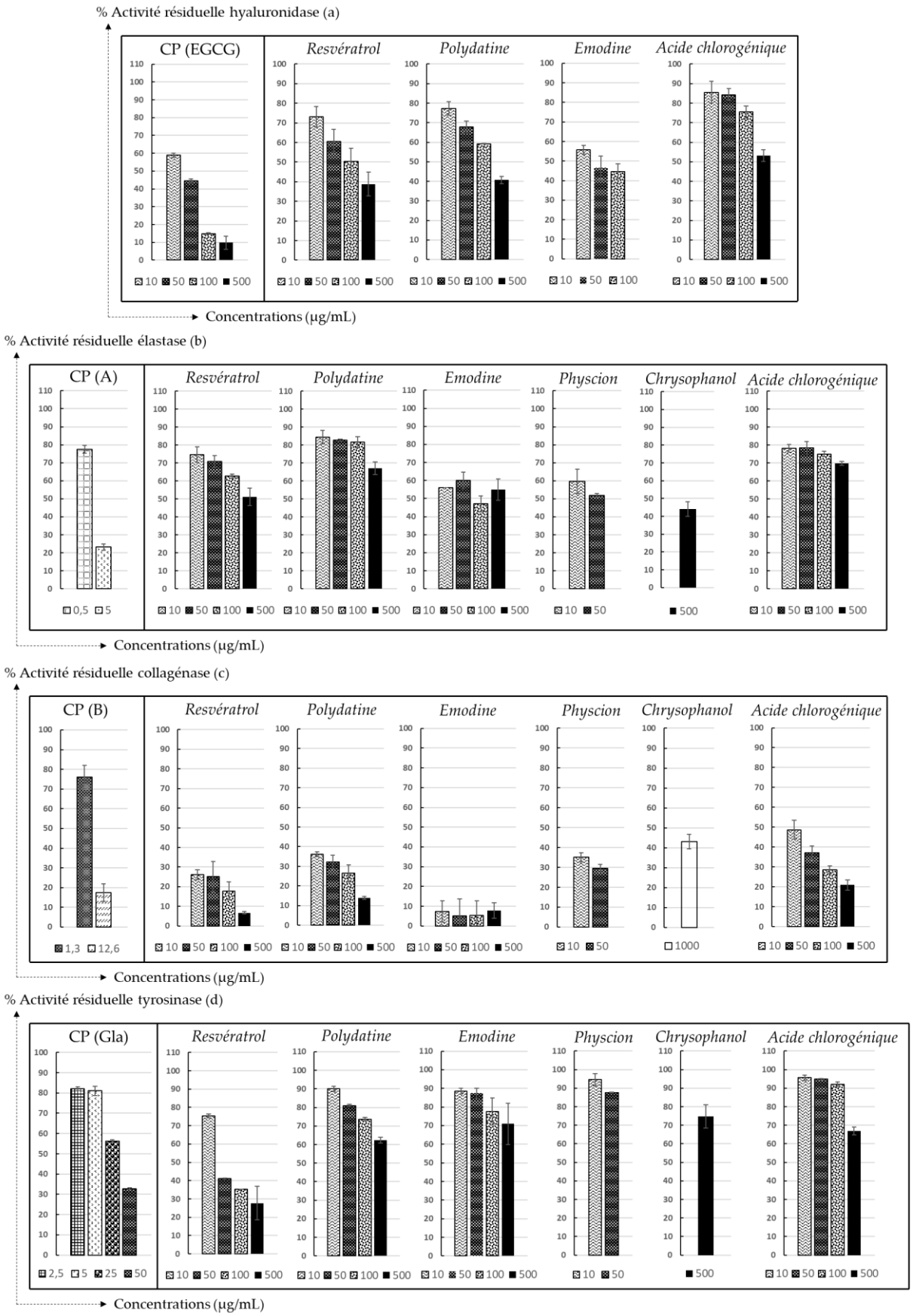


Figure 77. Evaluation des activités résiduelles hyaluronidase (a), élastase (b), collagénase (c) et tyrosinase (d) de quelques standards sélectionnés. CP = contrôle positif ; (EGCG) = gallate d'épigallocatéchine, (A) = N-Méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chlorométhyl cétone, (B) = 1,10-phénanthroline, monohydrate et (Gla) = glabridine.

n = 3 expériences indépendantes pour chaque concentration (µg/mL). Les barres d'erreur représentent ± écart type.

Pour les deux stilbènes, il s'avère que le resvératrol inhibe un peu plus que la polydatine, sa forme glucosylée, sur les quatre cibles aux mêmes concentrations testées. Le groupement sucre ajouté à la génine pourrait avoir un léger impact sur l'activité inhibitrice observée.

Sur la hyaluronidase (*Figure 77 a*), l'émodine apparaît comme le meilleur inhibiteur, sur chacune des concentrations évaluées. A 50 µg/mL, l'émodine a une activité hyaluronidase résiduelle de 46,64 ± 5,92% proche du contrôle positif associés (44,40 ± 1,30%), suivies par celles du resvératrol, de la polydatine et de l'acide chlorogénique, avec 60,57 ± 6,04%, 67,80 ± 2,90% et 84,26 ± 3,13%, respectivement. A 500 µg/mL néanmoins, l'émodine n'a pas pu être testée en raison de sa faible solubilité dans le milieu à cette concentration. Dans une étude antérieure menée sur un extrait de pelure d'*aloe vera*, il a été constaté que l'*aloe*-émodine isolée de cette dernière pouvait inhiber la hyaluronidase de 50% avec une concentration de 40 µg/mL [465]. Cela corrobore avec nos résultats. Il a été montré d'autre part que l'acide chlorogénique, isolé d'un extrait d'écorce de *Ficus microcarpa L. Fil.*, montrait une faible inhibition de la hyaluronidase (activité de 86,5% à 177,16 µg/mL) [466] alors que dans notre étude, l'acide chlorogénique a une meilleure inhibition à une concentration inférieure c'est à dire 100 µg/mL (activité hyaluronidase résiduelle de 75,40 ± 3,10%). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les conditions opératoires étaient légèrement différentes. Dans une étude de *docking* ou d'amarrage moléculaire de l'acide chlorogénique entant qu'inhibiteur de la hyaluronidase, il a été démontré que des liaisons hydrogènes pouvaient se former entre l'acide phénolique et certains résidus d'acides aminés de la hyaluronidase à savoir Glu477 ainsi que Glu582 et qu'il pourrait y avoir diverses interactions hydrophobes entre le groupe phényle de l'acide chlorogénique et les acides aminés résidus Ala407 et Val411 [86]. Sur cette enzyme, il n'a pas pu être testé de flavonoïdes. Nénamoins antérieurement il a été montré que cinq flavonoïdes parmis la trentaine évalués étaient de puissants inhibiteurs : tanin condensé < lutéoline < apigénine < kaempférol [467]. Ces composés faisant parties des organes de l'espèce, il doivent probablement participer à l'activité anti-hyaluronidase globale de *F. japonica*.

Sur l'élastase (*Figure 77 b*), le physcion et l'émodine sont les plus forts inhibiteurs (physcion> émodine > resvératrol > acide chlorogénique > polydatine > chrysophanol), avec respectivement un effet dose-réponse et un effet plateau d'environ 50% à toutes les concentrations. A 10 µg/mL, les activités élastase résiduelles du physcion, et de l'émodine, sont de 59,68 ± 6,77% et 56,01 ± 0,10%, respectivement. Il paraît cependant que le contrôle positif (A) est un inhibiteur plus fort que les standards dans les conditions opératoires mises en œuvre, puisqu'à une concentration deux fois plus faible, soit 5 µg/mL, il a une activité de 23,18 ± 1,83%. Il a été démontré antérieurement que plusieurs anthraquinones, dont l'émodine et l'*aloe*-émodine, étaient de puissants inhibiteurs de l'élastase leucocytaire humaine et de la cathepsine, deux protéinases à sérine impliquées dans des maladies caractérisées par la dégradation anormale du tissu conjonctif. Les deux anthraquinones avaient des activités élastase résiduelles de 45% et 79%, respectivement, probablement en raison d'interactions hydrophobes avec l'enzyme [468]. Sur la fonction des leucocytes polymorphonucléaires humains, le resvératrol s'est également montré intéressant entant qu'inhibiteur de l'élastase [469,470].

Sur la collagénase (*Figure 77 c*), l'émodine est le plus puissant inhibiteur, dépassant même le contrôle positif (B) dans les conditions opératoires utilisées avec des activités collagénase résiduelles de 7,33 ± 5,36% et 17,51 ± 4,37% à 10 µg/mL, respectivement, d'autant plus que la concentration d'inhibiteur (B) est légèrement supérieure, soit 12,6 µg/mL. Dans une évaluation *in vitro* menée sur une comparaison des effets inhibiteurs de 44 anthraquinones sur la collagénase bactérienne, l'émodine s'est avérée la plus puissante également, capable d'inhiber l'enzyme cible de 50% avec une concentration de seulement 10,81 µg/mL [91], confortant les résulats acquis ici. Il a été démontré que le resvératrol servait également d'agent pour le traitement de myélome multiple avec activité inhibitrice des métalloprotéinases matricielles [471]. *E-polydatine* pure était aussi un inhibiteur très puissant, avec une activité collagénase résiduelle d'environ 25% à 117,12 µg/mL [87] (en cohérence avec notre travail soit 26,43 ± 4,29% à 100 µg/mL). Bien que l'acide chlorogénique a le potentiel le plus faible par rapport aux autres standards et au témoin (B), c'est tout de même un fort inhibiteur avec une activité collagénase résiduelle de 48,70 ± 4,77% à 10 µg/mL. En inhibant la matrice métalloprotéinases 2 et 9, l'acide chlorogénique a montré qu'il pouvait améliorer les lésions cérébrales et déficits fonctionnels sensori-moteurs [472].

Sur la tyrosinase (*Figure 77 d*), le resvératrol apparaît comme le plus puissant inhibiteur à toutes les concentrations évaluées, avec une activité tyrosinase résiduelle allant de 75,42 ± 1,04% à 10 µg/mL à 27,70 ± 9,10% à 500 µg/mL. Comme énoncé auparavant les résultats sur cette cible sont souvent contrastés dans la littérature [92,196,205], généralement en fonction du protocole mis en place et du type d'enzyme usité. Le resvératrol avait un effet beaucoup plus faible sur tyrosinase de champignon que sur la tyrosinase humaine [473]. Récemment, cependant, il a été expliqué que dans les mélanocytes, la polydatine isolée de *F. japonica* inhibait la tyrosinase et la production de mélanine. Ses effets sur les protéines 1 et 2 liées à la tyrosinase, ainsi que sur un facteur du mécanisme transcriptionnel impliqué dans la mélanogénèse, ont également été explorés. La polydatine a été trouvé pour supprimer l'expression de l'ARNm et des protéines des enzymes ainsi que du facteur de transcription dans une manière concentration dépendante [196]. La *E*-polydatine pure a également montré environ 62% à 117,12 µg/mL de l'activité résiduelle de la tyrosinase [92], ce qui est relativement proche de nos résultats (73,69 ± 0,99% à 100 µg/mL), bien que les protocoles expérimentaux diffèrent légèrement.

Compte tenu de ces résultats d'une part, les standards peuvent participer aux propriétés observées anti-hyaluronidase, anti-élastase, anti-collagénase et anti-tyrosinase des extraits bruts (voir première partie des travaux *I. D. 2.*). D'autre part, si cela confirme une partie des résultats obtenus sur la tyrosinase avec l'approche HPTLC bioautographique pour le resvératrol et la polydatine (voir *section précédente II. B. 3.*), aucun spot actif correspondant à l'acide chlorogénique n'a été détecté dans les extraits (voir *Rf* 0,42, *Figure 73*) et les dérivés de quinones sont actifs contrairement à ce qui a pu être rapporté avant (voir *Figures 73 et 75*) ; corroborant davantage avec cette étude [205]. Il se peut que la quantité minimale détectable de ces composés avec cette approche ait été atteinte (LOD) [474]. Il se pourrait aussi qu'il existe des synergies éventuelles entre ces différentes molécules ou avec d'autres molécules extraites des rhizomes et de la partie aérienne. Afin d'avoir une caractérisation plus fine des molécules présentes chez *F. japonica* de Savoie, leurs analyses UHPLC-UV/HRMS/MS a été faite. Leurs compositions chimiques et efficacités sont alors discutées.

5. CARACTERISATION DES ORGANES ET DISCUSSION SUR LES ACTIVITES BIOLOGIQUES OBSERVEES

Les chromatogrammes UV obtenus à 285 nm sont présentés sur la *Figure 78*. De plus, les hypothèses d'identification des principaux composés présents dans la partie aérienne et les rhizomes de *F. japonica* sont précisés dans le *Tableau 8*. Les expériences MS ont été réalisées en mode (-) ESI car il permettait de détecter le plus grand nombre de composés. Les caractéristiques chromatographiques, les spectres UV, les spectres de masses ainsi que les informations bibliographiques disponibles sur l'espèce ont aidé à réaliser les propositions structurales. Les ions adduit $[M+Cl]^-$ ou $[M+CHO_2]^-$ont souvent confirmé la formule proposée pour l'ion $[M-H]^-$. Les formules moléculaires possibles pour chaque pic sélectionné ont été recherchées dans les bases de données publiques à savoir *MassBank*, *Lotus Base*, *HMBD* et *PubChem* afin de caractériser les différents composés.

La comparaison des chromatogrammes UV des deux extraits bruts met en évidence leur différence de compositions chimiques. Il est aussi possible d'observer des différences dans les proportions relatives des principales molécules constitutives. Dans la partie aérienne et les rhizomes respectivement, 11 et 17 principaux métabolites spécialisés (*Figure 78*) ont été identifiés en mode d'ionisation négatif. Il s'agissait notamment d'acides phénoliques tel que l'acide chlorogénique, de flavan-3-ols avec la catéchine par exemple, de stilbènes comme la polydatine et le resvératrol, de quinones tels l'émodine et le physcion, de flavonols tels que la quercitrine et de dérivés de naphtol comme le glucoside de torachrysone (voir *Tableau 8*). Parmi les six standards testés dans la section précédente, cinq ont été retrouvés ici (*Figure 78, composés 1-5).* Le chrysophanol n'a en effet été identifié dans aucun des deux organes. Ceci affirme et corrobore par ailleurs avec les analyses TLC-MS précédentes (voir *sections II. B. 2. et II. B. 3.*). Numérotés du plus polaire au moins polaire, selon le gradient utilisé, la répartition de ces cinq molécules au sein de la plante exotique envahissante est différente. En effet, l'acide chlorogénique (*Figure 78, 1*) est plus abondant dans l'extrait de partie aérienne et la polydatine, le resvératrol et l'émodine (*Figure 78, 2,3,5*) sont bien plus représentés dans l'extrait de rhizomes. Le physcion n'a été identifié que dans les rhizomes.

Dans une étude précédente, les composés 1-3 et 5 ont également été trouvés dans les feuilles de *F. japonica*. Cet organe était une meilleure source d'acides phénoliques, de flavones et de flavonols que les tiges ou les rhizomes de l'espèces. Les rhizomes étaient par ailleurs une excellente source de flavan-3-ols (monomères et oligomères) et de stilbènes, comme le resvératrol et ses dérivés [164]. Dans cet autre travail antérieur [79], un total de 71 composés (dont les acides phénoliques, les flavan-3-ols, les stilbènes, flavonols et flavones, chlorophylles, caroténoïdes et triterpénoïdes) ont été identifiés dans des extraits méthanoliques de feuilles et de rhizomes de *F. japonica* et *F. sachalinensis* de Pologne en utilisant UHPLC-UV-Q-TOF-HRMS en mode d'ionisation négatif. Cependant, l'acide chlorogénique, le resvératrol, la polydatine et l'émodine étaient plus abondants dans les feuilles que dans les rhizomes. Cette différence avec notre étude pourrait s'expliquer par le fait que les conditions d'extraction et/ou le matériel végétal étaient différents. En effet, les auteurs avaient travaillé sur les feuilles de la plante alors que dans notre cas, les feuilles sont mélangées aux tiges constituant la partie aérienne.

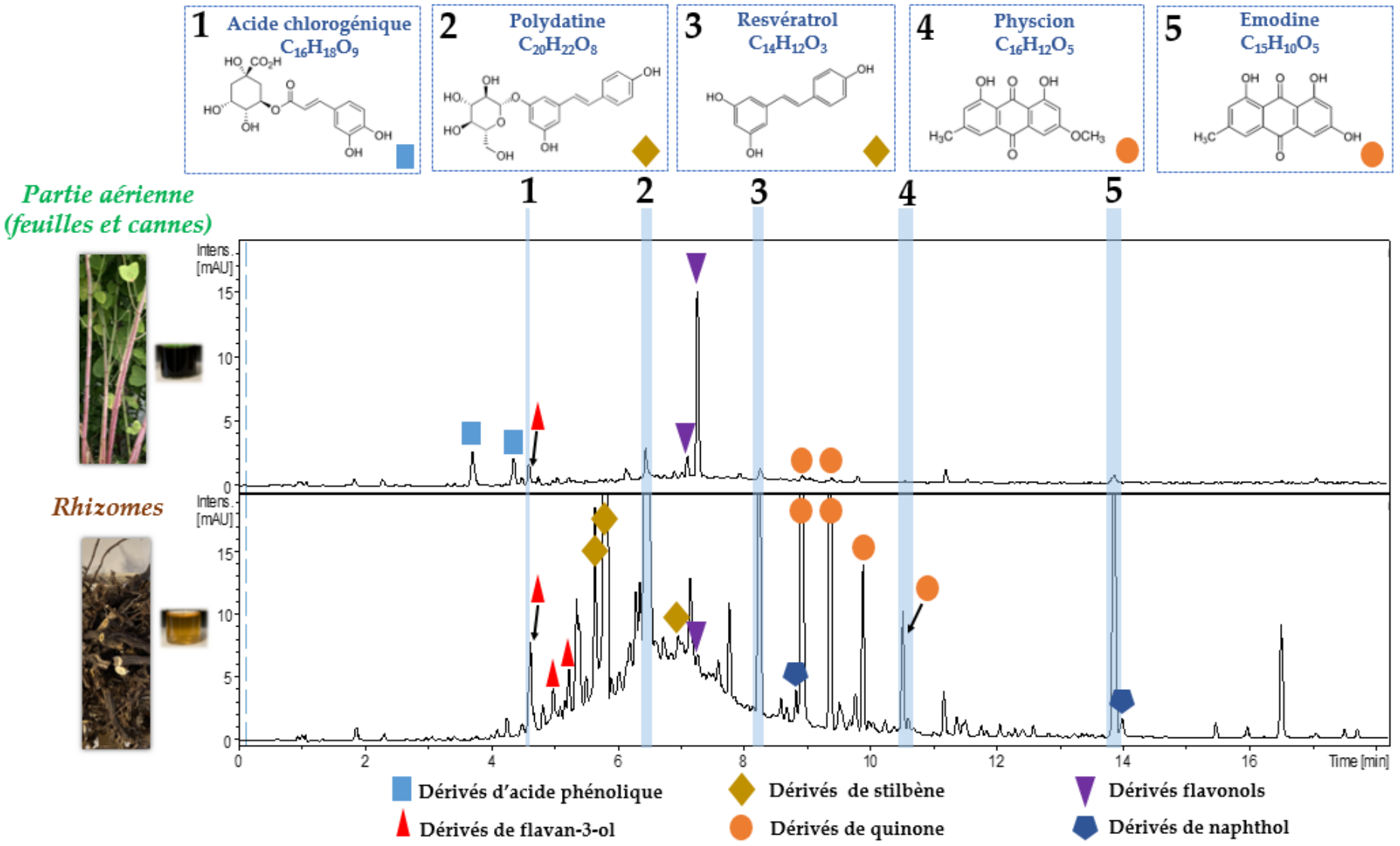


Figure 78. Profils chromatographiques (UV à 285 nm) des extraits de Fallopia japonica obtenus par UHPLC-UV-Q-TOF-HRMS/MS. Identifications de cinq métabolites spécialisés d'intérêt sur les quatre cibles enzymatiques étudiées (hyaluronidase, élastase, collagénase et tyrosinase) : acide chlorogénique (1), polydatine (2), resvératrol (3), physcion (4) et émodine (5). D'autres composés identifiés correspondant à divers dérivés chimiques ont été également rapportés (voir Tableau 8).

Tableau 8. Hypothèses d'identification des principaux composés présents dans la partie aérienne et les rhizomes de Fallopia japonica par UHPLC/HRMS/MS.

Partie de *F. japonica*	Famille moléculaire	Temps de rétention (min)	MS $[M-H]^-$ Ion moléculaire	MS/MS Fragments	Identification des composés[1]
Partie aérienne (feuilles et cannes)	Acides phénoliques	3.71	353.0888	191/179	Acide 3-*O*-Caféoylquinique
		4.35	337.0939	191/163	Acide *p*-coumaroylquinique
		4.59	353.0883	191	5-*O*-CQA (1)
	Flavan-3-ol	4.60	289.0727		Catéchine
	Stilbènes	6.45	389.1245	227	Polydatine (2)
		8.25	227.0727		Resvératrol (3)
	Flavonols	7.10	433.0784	301	Quercétine 3-*O*-pentoside
		7.26	447.0950	301	Quercitrine
	Quinones	8.91	431.0985	269	Emodine-8-*O*-*D*-glucoside
		9.39	517.0990	269	13 emodine-8-*O*-(6'-*O*-malonyl)-glucoside
		13.87	269.0463		Emodine (5)
Rhizomes	Acides phénoliques	4.59	353.0878	191	5-*O*-CQA (1)
	Flavan-3-ols	4.60	289.0725		Catéchine
		4.97	577.1359	289	Procyanidine dimère B
		5.23	289.0727		Epicatéchine
	Stilbènes	5.69	405.1206	243	Piceatannol glucoside
		5.78	389.1263	227	Resvératroloside
		6.45	389.1258	227	Polydatine (2)
		6.96	541.1359	389/227	Polydatine gallate
		8.24	227.0728		Resvératrol (3)
	Flavonol	7.26	447.0942	301	Quercitrin
	Quinones	8.92	431.1003	269	Emodine-8-*O*-*D*-glucoside
		9.37	517.1001	269	13 emodine-8-*O*-(6'-*O*-malonyl)-glucoside
		9.89	445.1156	283	Physcion glucoside
		10.52	283.0626		Physcion (4)
		13.88	269.0460		Emodine (5)
	Naphthols	8.83	407.1368	245	Torachrysone glucoside
		13.99	245.0834		Torachrysone

[1]Les identifications par comparaison avec les données des spectres MS avec la littérature et leur identification sont hypothétiques.

(1) Acide 5-*O*-caféoylquinique ; (2) Polydatine ; (3) Resvératrol (4) Physcion et (5) Émodine : composés d'intérêt sur les quatre cibles enzymatiques étudiées (hyaluronidase, élastase, collagénase, tyrosinase).

Les résultats obtenus peuvent par ailleurs expliquer les différences d'activités résiduelles observées sur les quatre cibles enzymatiques examinées entre les extraits issus de l'espèce (voir première partie des travaux *I. D. 2.*). L'extrait de rhizomes qui était souvent légèrement plus active que la partie aérienne dans les mêmes concentrations, contient davantage de dérivés de stilbène et de quinone que celui de la partie aérienne. Le composé qui prédomine dans cette dernière a été identifiée comme étant la quercitrine et non le glucoside de lutéoline, comme suggéré précédemment *section II. B. 3.* avec son ion fragment à *m/z* 301 et non *m/z* 285 pour les deux aglycones respectivement. Il se pourrait que ce flavonol soit principalement responsable des importantes activités résiduelles (hyaluronidase, élastase et collagénase) de la partie aérienne [467,475]. De par sa prédominance et la faible activité anti-tyrosinase observée pour l'extrait de partie aérienne, il semblerait que la quercitrine ne soit pas active sur cette cible ; comme suggérer également lors de l'analyse bioautographique (voir *section II. B. 3.*). Il se pourrait de plus que d'autres molécules atténuent son activité. Il a été montré précédemment que divers flavonoïdes individuels pouvaient inhiber l'activité de la hyaluronidase, y compris des tanins condensés comme la quercétine, la quercitrine, la catéchine ou encore l'épicatéchine [467], appuyant nos observations car identifiés aussi dans ce travail. Il a également été démontré que les procyanidines (identifiés également ici) ont des activités anti-hyaluronidase ainsi qu'anti-collagénase et certaines activités anti-élastase [466,476–478]. Par ailleurs, en utilisant la technique en ligne UHPLC-ABTS pour évaluer l'activité antioxydante de l'espèce [79], les auteurs ont montré que la catéchine, la procyanidine dimère B, les acides chlorogénique et 3-*O*-coumaroylquinique ainsi que le resvératroloside (également identifiés dans nos travaux : *voir Tableau 8*) possédaient la capacité de piégeage radicalaire la plus puissante. Etant ainsi des composés communs dans les extraits produits ici, cela pourrait confirmer les résultats obtenus lors de l'évaluation des capacités antioxydantes, présentés *section II. B. 2.*

6. INFLUENCE DE LA QUANTITE D'EAU LORS DE L'EXTRACTION DE *FALLOPIA JAPONICA* SUR LES TENEURS DE SES ACTIFS PRINCIPAUX

L'H_2O entant que solvant d'extraction permet d'accéder à des composés plutôt polaires tels que les sucres, les acides phénoliques ou encore les flavanols et anthraquinones [96,355–357]. Le mélange de l'H_2O et de l'éthanol utilisé comme solvant d'extraction peut permettre d'accéder à une plus large gamme de composés et/ou d'extraire selectivement certains composés (par rapport aux extraits initiaux 100% EtOH), comme cela a été rapporté antérieurement [139,435,479,480]. Afin d'envisager un enrichissement des extraits de *F. japonica* en actifs dermo-cosmétiques, plusieurs solvants d'extraction hydro-alcooliques ont été évalués (ratios H_2O/EtOH allant de 100/0 à 10/90 ; *v/v*). Du fait de leurs activités prometteuses sur les quatre cibles enzymatiques examinées (voir *première partie des travaux I. D. 2.*) et de leurs présences dans l'ensemble du végétal, le resvératrol, la polydatine et l'émodine ont été choisis pour être suivis et/ou dosés dans les extraits produits. Les divers extraits réalisés (R1 à R20) ainsi que leurs profils polyphénoliques sont présentés *Figure 79*. La *Figure 80, A* présente les aires sous les pics des trois molécules obtenues par UHPLC-UV dans les extraits produits. Les résultats de dosages obtenus pour les extraits de rhizomes sont montrés en *Figure 80, B*.

Dans la *Figure 79*, que ce soit pour les extraits de parties aériennes ou ceux de rhizomes, les profils polyphénoliques par organe sont très proches entre eux. Ils présentent de nombreux composés communs sur toute la gamme de polarité avec néanmoins des différences d'intensité de spots traduisant des diférences en termes de quantités de composés. Les extraits avec le plus d'eau (R1 et R2) sont les plus pauvres en composés. Cependant, dès lors que de l'H_2O est ajoutée à l'éthanol, cela rend possible l'extraction de plus de composés polaires à moyennement polaires (*Rfs* < 0,5), en cohérence avec ce qui était attendu. Dans les extraits de parties aériennes, les trois composés recherchés (resvératrol, la polydatine et l'émodine sont très peu visibles. Par ailleurs, les molécules types chlorophylliennes (spots rouges) sont présentes dans les PA pour des ratios H_2O/EtOH allant de 100/0 à 50/50 tandis qu'au-delà, elles ne sont plus visibles donc moins bien extraites. Ces chlorophylles lorsqu'elles sont présentes occultent une partie de l'information : il n'est alors pas possible de savoir si du resvératrol et/ou de l'émodine compose(nt) l'extrait. Dans les *Rfs* inférieurs à 0,5, sont notamments présents des dérivés d'acides phénoliques (spots bleus). Enfin, plus le pourcentage d'éthanol dans le ratio H_2O/EtOH augmente, plus les intensités des trois spots bleus situés entre *Rfs* 0,5 et 0,7 et dont l'un correspond à l'acide chlorogénique (voir *Figure 72* ; *Rf* 0,55) sont fortes.

Dans les extraits de rhizomes en revanche, la polydatine, bien que masquée par la présence de dérivés d'anthraquinones (spots marrons), est largement présente. Le resvératrol et l'émodine co-élués le sont également dans tous les extraits. De plus, les spots bleu-clairs observables *Rf* 0,7 ont des intensités différentes selon l'extrait considéré. Les extraits obtenus avec les solvants de ratios H_2O/EtOH 70/30 à 40/60 possèdent les spots d'intensités les plus élevées. Par ailleurs, dans les *Rfs* inférieurs à 0,5, sont notamment présents des dérivés d'acides anthraquinones (spots marrons) et d'acides phénoliques (spots bleus foncés). Plus le pourcentage d'éthanol dans le ratio H_2O/EtOH augmente, plus leurs teneurs sont importantes.

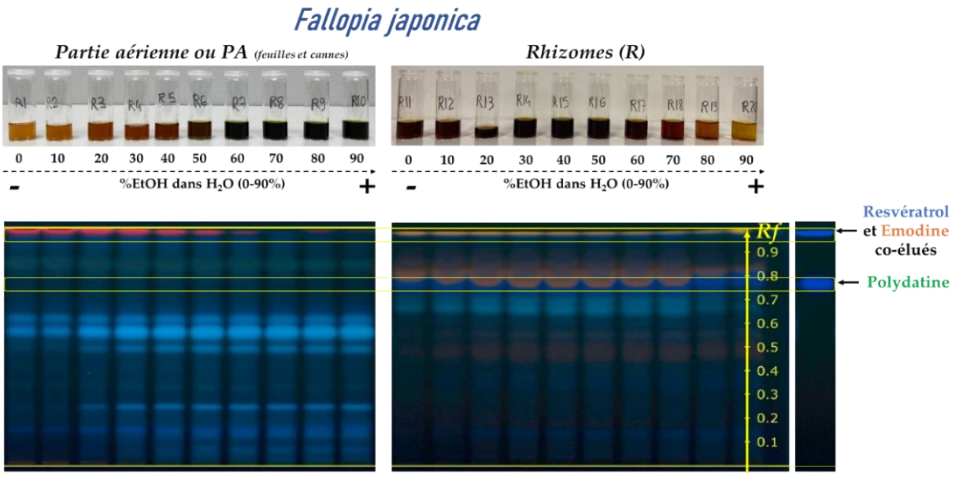
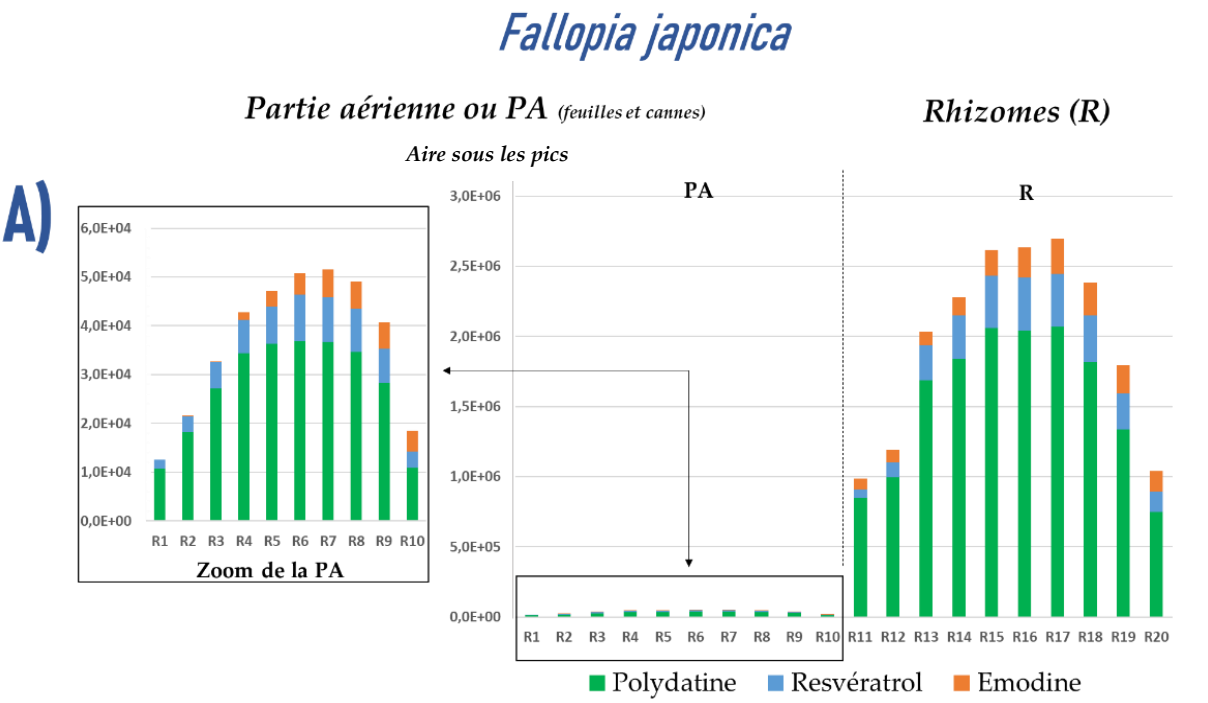


Figure 79. Profils polyphénoliques HPTLC des extraits hydro-alcooliques de parties aériennes (R1 à R10) et de rhizomes (R11 à R20) de F. japonica. Présences de resvératrol, polydatine et émodine dans les divers extraits représentés.

Les résultats UHPLC-UV (*Figure 80, A*) montrent que les trois composés (resvératrol, polydatine et émodine) sont bien plus présents dans les extraits de rhizomes que dans ceux parties aériennes. En effet, en

comparant chaque organe avec la même typologie de solvant (exemples R1 avec R11 ; R2 avec R12 *etc.*), les aires sous les 3 pics (en uAU) sont environ 100 fois plus élevées. Dans les deux organes, les teneurs en polydatine sont les plus importantes, suivies des teneurs en resvératrol et enfin en émodine. Les quantités des trois molécules suivent une trajectoire parabolique tournée vers le bas. Cela signifie que le sommet de la courbe correspond aux quantités maximales qui ont été obtenues (soit dans les extraits R15 à R17 de ratios EtOH/H_2O respectifs 60/40, 50/50 et 40/60). Les extraits hydroalcooliques qui possèdent en quantité le plus des trois molécules sont respectivement pour la partie aérienne et les rhizomes, les extraits R7 et R17 correspondant dans les deux cas à une mixture EtOH/H_2O (60/40).



B)

Rhizomes (R)

	Teneurs moyenées (*n*=3) en g pour 100 g		
	Polydatine	Resvératrol	Emodine
R11	0,384		
ET	0,002	<LOQ*	<LOQ*
CV%	0,543		
R12	0,455		
ET	0,005	<LOQ*	<LOQ*
CV%	0,992		
R13	0,766	0,054	0,032
ET	0,005	0,001	0,001
CV%	0,640	1,076	1,786
R14	0,840	0,068	0,046
ET	0,001	0,001	0,001
CV%	0,119	1,471	1,246

	Teneurs moyenées (*n*=3) en g pour 100 g		
	Polydatine	Resvératrol	Emodine
R15	0,943	0,081	0,064
ET	0,003	0,001	0,001
CV%	0,267	0,710	0,897
R16	0,933	0,084	0,076
ET	0,001	0,002	0,001
CV%	0,062	1,826	1,316
R17	0,945	0,082	0,088
ET	0,005	0,001	0,001
CV%	0,529	0,701	0,659
R18	0,830	0,071	0,082
ET	0,006	0,001	0,001
CV%	0,671	1,408	1,220

	Teneurs moyenées (*n*=3) en g pour 100 g		
	Polydatine	Resvératrol	Emodine
R19	0,606	0,056	0,071
ET	0,005	0,001	0,001
CV%	0,779	1,786	0,817
R20	0,335		0,052
ET	0,002	<LOQ*	0,001
CV%	0,456		1,103
EtOH 100 %	0,322		0,043
ET	0,003	<LOQ*	0,001
CV%	0,822		1,353

ET = Ecart type
*LOQ (Limite de quantification) = 0,03 mg/mL

Figure 80. A) Représentation des aires en uAU sous les pics obtenues par UHPLC-UV à 285 nm dans différents extraits (R1 à R20). B) Dosages des trois composés constitutifs dans les extraits de rhizomes de F. japonica. Les courbes étalonnages associées sont données en Annexe 12. n=3 échantillons indépendants injectés une fois. CV = coefficient de variation.

Les échantillons de rhizomes comprennent des quantités de polydatine comprises entre 0,32 g/100 g et 0,95 g/100 g ; de resvératrol entre 0,05 g/100 g et 0,08 g/100 g et enfin entre 0,03 et 0,09 g/100 g pour l'émodine (*Figure 80, B*). Les valeurs de CV% (toutes <1,0%) indique une faible dispersion autour de la moyenne des résultats obtenus. Les teneurs maximales pour les trois actifs sont effectivement repérées pour l'extrait R17 EtOH/H_2O

(60/40), soit 0,95 g/100 g de polydatine, 0,08 g/100 g de resvératrol et 0,09 g/100 d'émodine. En comparaison avec l'extrait 100% éthanolique, le taux de polydatine a été multiplié d'un facteur 3 environ, la quantité de resvératrol a pu être quantifiée (0,08 g/100 g) et le taux d'émodine a été multiplié par 2,25. Il s'avère de plus que l'extrait 100% EtOH contenait le moins de polydatine de tous les extraits analysés. L'extrait R13 contenait quant à lui a la teneur la plus faible en émodine (0,03 g/100 g).

Dans une étude antérieure, il a été montré qu'un extrait de racines de *F. japonica* obtenu à partir du mélange H_2O/EtOH (50/50 ; *v/v*) présentait les meilleurs efficacités de transfert de masse et rendements en polydatine, resvératrol et émodine à savoir respectivement 0,92 g/100 g, 0,35 g/100 g et 0,78 g/100 g de matière sèche [139] ; ce qui présente à la fois des similitudes mais aussi des différences avec notre étude. Le mélange H_2O/EtOH (50/50 ; *v/v*) usité dans leur étude fait parti des solvants ayant permis d'extraire ici un maximum de trois composés (avec les deux mélanges 60/40 et 40/60). Cette étude récente réalisée sur les rhizomes de *F. japonica* [435], préconisait également un solvant d'extraction H_2O/EtOH (40/60 ; *v/v*) pour avoir un taux de resvératrol maximal et une activité antioxydante maximale. Cet autre travail montrait aussi qu'un macérat EtOH/H_2O (38/62) du même organe de l'espèce donnait de bons rendements en stilbènes tout en présentant une faible teneur en anthranoïdes [479]. En comparant par ailleurs les teneurs en polydatine, resvératrol et émodine que les auteurs ont obtenu [139] avec les teneurs des mêmes composés obtenues ici avec la même typologie de solvant H_2O/EtOH (50/50 ; *v/v*), il s'avère que celle en polydatine est comparable entre nos travaux (0,93 g/100 g ici pour 0,92 g/100 g), mais que 4,4 fois moins de resvératrol et 9,8 fois moins d'émodine ont été extraits ici. De plus, seulement 4, 4 et 20 min de sonication respectivement ont permis d'obtenir de tels rendements (1 h ici). Les auteurs retrouvaient néanmoins, les mêmes taux lorsqu'1h de sonication a été réalisée (pas de dégradations donc). Ces différences pourraient s'expliquer par des protocoles qui sont légèrement différents ou par la matière première elle-même (rhizomes dans notre cas et racines pour eux) ou encore son lieu, sa période de collecte ou sa préparation. Les rhizomes ici ont été collectés avant la floraison en juin. La teneur en anthraquinones, mesurée uniquement dans les rhizomes de *Fallopia* spp., était le plus élevé avant la période de floraison, et il a diminué pendant la floraison chez chaque espèce [481] ; donc il est posible que les différences observées ne soient pas en lien avec ce facteur.

Malgré ces différences, cette étude conforte l'intérêt des extraits R7 et R17 dans notre cas qui permettent d'enrichir en trois actifs les extraits initiaux 100% EtOH qui montraient des activités biologiques intéressantes sur les cibles dermo-cosmétiques visées dans ces travaux. Ces extraits cependant ont des compositions chimiques qui diffèrent des extraits bruts éthanoliques. Dans l'objectif de valoriser ces extraits bruts enrichis entant qu'ingédients dermo-cosmétiques, il serait important d'évaluer leurs activités biologiques dermo-cosmétiques afin de constater si ces dernières se voient améliorées, comparables ou bien dégradées (par rapport à celles des extraits éthanoliques). Il serait également nécessaire d'évaluer les différences de compositions chimiques ; d'autres actifs peuvent être impactés positivement ou négativement et les nouveaux composés extraits devraient être caractérisés. Dans le cas où l'objectif est de valoriser les actifs purifiés [482], les deux types d'oganes pourraient être rassemblés pour augmenter leurs teneurs. Les paramètres d'extractions pourraient aussi être

rectifiés afin d'obtenir si possible des teneurs plus élevées en actifs, davantage proches de celles obtenues dans les études antérieures [139,435,480].

C. VALORISATION DANS LE SECTEUR DERMO-COSMETIQUE D'*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* ET DE *SOLIDAGO CANADENSIS*

1. CARACTERISATION DES PRINCIPALES MOLECULES ANTIOXYDANTES

Les extraits éthanoliques bruts d'*A. artemisiifolia* et *S. canadensis*, au même titre que ceux de *F. japonica*, ont montré de fortes propriétés antioxydantes (voir première partie des travaux *I. D. 1.*) en accord avec les données antérieures disponibles dans la littérature sur ces deux espèces [266–269,316,325,350,351,353,369]. C'est la convolution des données acquises avec la TLC (polarité, couleur en NEU-PEG et révélation DPPH) qui a permis de proposer des identifications des principales molécules au caractère antioxydant. Les empreintes polyphénoliques observées après dérivation chimique NEU-PEG et après révélation DPPH sont données respectivement *Figure 81, A* et *Figure 81, B*.

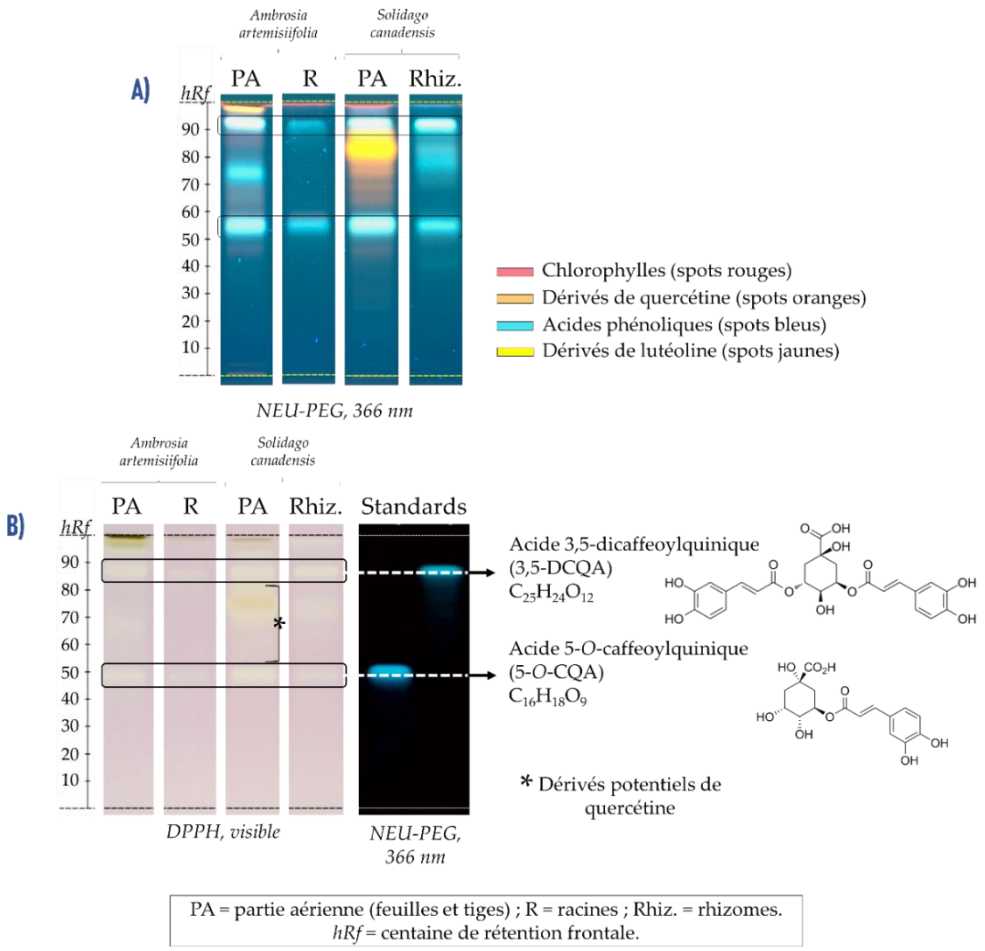


*Figure 81. A) Analyse HPTLC des extraits bruts de A. artemisiifolia et S. canadensis. Mise en évidence de deux acides principaux présents dans les quatre organes (hRf 50 et 90 ; cerclés en noir sur la plaque). Exemples de composés pouvant correspondre aux couleurs produites. B) Mise en évidence des principaux composés antioxydants chez A. artemisiifolia et S. canadensis (HPTLC-DPPH). Dépôts de deux standards : 3,5-DCQA (hRf 90) et 5-O-CQA (hRf 50). * L'identification était provisoire.*

La *Figure 81, A* révèle des compositions polyphénoliques très similaires entre les quatre extraits déposés, avec des différences d'intensité de spots ; comme cela avait été le cas lors de l'évaluation des organes séparés des deux espèces (voir la *première partie de travaux I. F. 3. et 4.*). Les extraits contiennent majoritairement des acides phénoliques (taches bleues) [452], dont potentiellement deux communs à tous les extraits (*Rapport frontal hundred* ou *hRf* 90 ± 5 et 50 ± 5). Les extraits de parties aériennes possèdent également des flavonoïdes tels que des dérivés de quercétine ou de chrysine (taches orangées), des dérivés de lutéoline (taches jaunes) ainsi que des composés de type chlorophylles (taches rouges) [452,483]. Les résultats *Figure 81, B* soulignent les molécules antioxydantes présentes dans les extraits, principalement dans la gamme de polarité moyennement polaire à apolaire. Les extraits de parties aériennes possèdent plus d'antioxydants que ceux des rhizomes, confirmant les résultats obtenus lors des dosages DPPH en microplaque (voir première partie des travaux *I. D. 1. a)*). Dans cette étude précédente menée sur *S. canadensis* [350], il a été montré que l'extrait de ses feuilles présentait une activité antioxydante plus élevée que celui de ses écorces ; ce qui corrobore avec nos résultats.

Dans les parties aériennes, c'est celle de *S. canadensis* qui en contient le plus (dérivés de quercétine et acides phénoliques ; *Figure 81 A et B*), pouvant expliquer que l'extrait de partie aérienne de *S. canadensis* était plus actif que celui d'*A. artemisiifolia* (voir première partie des travaux *I. D. 1. a)* également). Il s'avère que les dérivés d'acides phénoliques communs à tous les extraits (*hRf* 90 et 50) figurent parmi les principales molécules actives, avec des différences d'intensités d'un extrait à l'autre. Le dépôt des standards 3,5-DCQA et 5-*O*-CQA, *Figure 81, B*) répertoriés dans la littérature chez les deux espèces [43,369,370] a permis de dresser deux relations 'structure-activité antioxydante'. Il apparaît visuellement (après révélation NEU-PEG) que les extraits peuvent être classés ainsi, de la plus forte à la plus faible intensité en 3,5-DCQA (*hRf* 90) : rhizomes de *S. canadensis* > partie aérienne d'*A. artemisiifolia* > partie aérienne de *S. canadensis* > racines d'*A. artemisiifolia*. Avec le 5-*O*-CQA (*hRf* 50), ils peuvent être classés partie aérienne de *S. canadensis* > partie aérienne d'*A. artemisiifolia* > rhizomes de *S. canadensis* > racines d'*A. artemisiifolia* également en termes d'intensités décroissantes.

Antérieurement dans une étude utilisant la TLC [267,351], il a été montré qu'un extrait de sommités fleuries d'*A. artemisiifolia* (à 70% acétone) contenait des acides phénoliques (spots bleus révélés au NEU-PEG) et des flavonoïdes (spots jaune-orangés révélés au NEU-PEG). Bien que dans nos travaux la partie aérienne utilisée ne contienne pas de fleurs, les mêmes classes de composés ont été trouvés, confortant ainsi nos résultats. Les auteurs avaient d'autre part montré par TLC-DPPH et TLC-FRAP, que le pouvoir antioxydant de cet extrait pouvait être attribué à des dérivés de quercétine ou lutéoline [267,351]. Les acides phénoliques n'étaient par ailleurs pas considérés comme des actifs, comme c'est le cas dans notre travail. Un autre extrait de plante entière cette fois-ci (EtOH/H_2O; 70/30 ; *v/v*) contenait également des acides chlorogénique, caféique et férulique, ainsi que de la lutéoline et de la quercétine [266], appuyant de nouveau les résultats acquis. Dans ce travail précédent où HPLC-ABTS (ou HPLC-DPPH) couplé à UHPLC-Q-TOF-MS a été utilisé, les deux mêmes acides phénoliques, identifiés comme principaux antioxydants dans notre étude, ont également été déterminés comme marqueurs piégeant les radicaux dans des extraits de feuilles et d'inflorescences (MeOH/H_2O; 70/30 ; *v/v*) d'espèces du genre *Solidago* dont *S. canadensis* [369].

2. INFLUENCE DU STADE DE DEVELOPPEMENT DE *A. ARTEMISIIFOLIA* SUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES

Récemment, il a été montré chez une autre *Asteraceae* (*Echinacea purpurea*) que les activité antioxydantes de ses divers organes étaient significativement et positivement corrélées avec les teneurs en acides phénoliques totaux au cours des différents stades de croissance de l'espèce. La période de floraison était alors a privilégié pour sa récolte [484]. Une autre étude montrait que les conditions de croissance *Ageratina petiolaris* (*Asteraceae*) impactaient de manière significative sa composition phénolique et son activité antioxydante [485]. Aucune étude antérieure n'a été trouvée sur *A. artemisiifolia* concernant ces derniers aspects. Ainsi toujours dans un objectif de valorisation chimique, il a été choisi d'étudier l'influence de son stade de développement sur l'activité antioxydante des composés polyphénoliques.

La *première partie des travaux I. F. 1.* et *2.* a surligné le fait que les compositions phytochimiques (sucres, lipides, terpènes et composés polyphénoliques) des différents organes d'*A. artemisiifolia* étaient particulièrement proches entre eux. D'un stade à un autre de développement en regardant le même type d'organe (parties aériennes ou racines), il apparaissait également des profils similaires, avec des différences de teneurs néanmoins. La *section II. C. 1.* a mis en évidence les antioxydants présents dans sa parties aérienne et ses racines au stade végétatif dont les acides 3,5-DCQA et 5-*O*-CQA. Sa partie aérienne pouvait aussi contenir des dérivés de lutéoline actifs.

La plaque HPTLC-DPPH réalisée pour cette étude est montrée *Figure 82*. Sur cette dernière, 8 dépôts d'extraits de parties aériennes et 7 dépôts d'extraits de racines de la parcelle de Cruet y ont été effectués. Des stades de croissance différents pour les organes ont été déposés. Chaque extrait a été déposé une seule fois ; les surfaces de prélèvement ont été choisies aléatoirement. La photographie de la plaque a ensuite été soumise au logiciel rTLC pour les traitements statistiques des échantillons. L'ACP avec une correction ligne de base appliquée est présentée *Figure 83*.

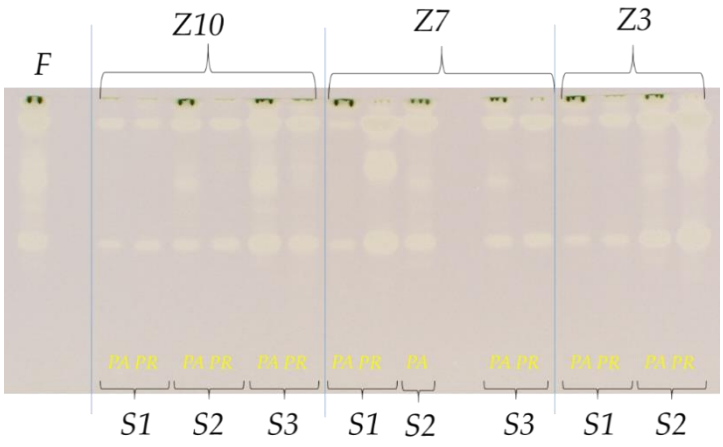


Figure 82. Plaque HPTLC-DPPH réalisée pour étudier l'influence du stade de croissance chez A. artemisiifolia sur l'activité antioxydante. F= feuilles (récoltée au S3) ; PA = partie aérienne = feuilles+tiges et PR = partie racinaire = racines. Z = zones. S1 à S3. = Stades de croissance 1 à 3. Système d'élution relatif aux composés polyphénoliques.

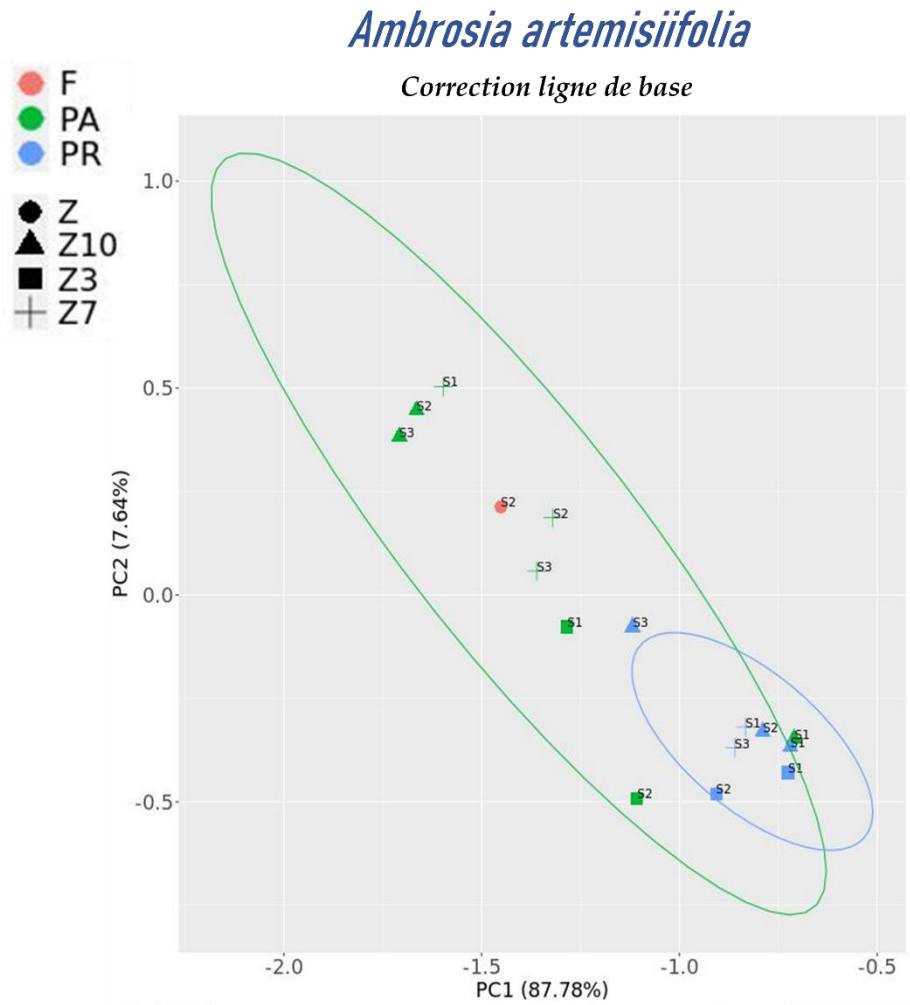


Figure 83. Analyse en composantes principales des organes d'Ambrosia artemisiifolia (feuilles ou F ; partie aérienne (feuilles et tiges) ou PA et partie racinaire ou PR). Correction de la ligne de base appliquée. Z = zone. S1-S3 correspondent aux stades de développement 1 à 3. Systèmes d'élution associés à la famille des composés phénoliques et révélation DPPH (activité antioxydante).

Dans la *Figure 82*, plusieurs similitudes sont observées. Les parties aériennes de tous les S1 ont des profils (polyphénoliques) antioxydants semblables entre eux, et ceux des S2 et S3 sont également très proches entre eux deux. Le profil antioxydant des feuilles de *A. artemisiifolia* ressemble à ceux des parties aériennes, notamment des S2 et S3. Pour la partie aérienne, le passage du stade 1 à 2 est caractéristique et induit une différence d'activité antioxydante significative. Les profils antioxydants obtenus section précédente correspondent à des profils antioxydants de S2 ou S3. D'autre part, des différences au niveau des racines de la plante sont notables entre les différents stades et pour un même stade. Par exemple, pour les zones 10 et 3, le profil le moins antioxydant correspond au S1 et pour la zone 7, c'est celui du S3. Il est ainsi difficile de conclure sur la répartition de l'activité antioxydante au sein de cette organe selon le stade de développement. Enfin, en considérant l'intégralité des dépôts (des PA et R), les deux organes ont de nombreux biomarqueurs communs dont principalement les deux acides, comme évoqué précédemment.

A la lecture de l'ACP *Figure 83*, il apparaît que les activités antioxydantes des divers échantillons sur l'intégralité de la plage de polarité sont semblables entre elles. Il apparaît également qu'il y ait des marqueurs communs aux deux types d'organes (ellipses superposées). Le pourcentage d'explication de la variabilité pour cette expérience est de 95,4%. Les activités antioxydantes observées pour les racines de l'espèce, quels que soient leurs stades de croissance, et l'extrait de partie aérienne (z10 stade levée) sont similaires. Seul un extrait de stade végétatif 3 se distingue du groupe, ayant potentiellement des marqueurs antioxydants supplémentaires et/ou communs à ceux observés pour les extraits d'organes aériens. Une plus grande diffusivité d'ellipse est présente pour les organes aériens témoignant d'une plus forte hétérogénéité de profils antioxydants selon le stade de croissance de la plante et/ou de la surface de prélèvement considérée. En conclusion pour cette activité biologique, l'ensemble des organes récoltés intra-localisation pourraient être rassemblés. Les deuxièmes et troisièmes stades de développement seraient à privilégier lors de la récolte pour ce type de valorisation.

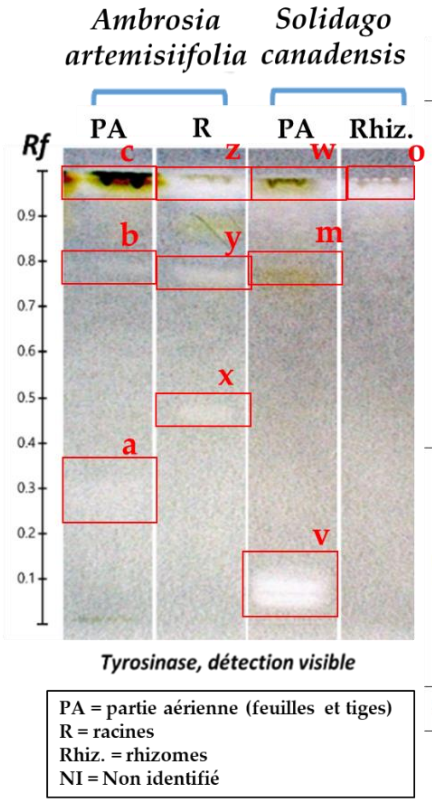
3. MISE EN EVIDENCE DES PRINCIPAUX INHIBITEURS DE LA TYROSINASE

Evalués pour la première fois, les extraits bruts des différents organes d'*A. artemisiifolia* et *S. canadensis* ont montré de faibles effets inhibiteurs de la tyrosinase en microplaques (voir première partie des travaux *I. D. 2. d)*). C'est cependant *A. artemisiifolia* qui possédait une meilleure efficacité sur la cible que *S. canadensis*. De manière à caractériser les principales molécules responsables des activités observées, l'approche HPTLC-bioautographie/HRMS a été employée, selon le même modèle qu'avec *F. japonica*. Les résultats sont présentés *Figure 84*.

Pour la première fois également avec cette technique, plusieurs molécules actives anti-tyrosinase ont pu être mises en évidence dans chacun des extraits. En effet, trois spots actifs ont été révélés dans l'extrait de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* (a-c, *Figure 84*) et trois autres dans celui de ses racines (x-z, *Figure 84*). Chez *S. canadensis*, trois spots actifs anti-tyrosinases étaient présents dans l'extrait de sa partie aérienne (v, m et w, *Figure 84*), tandis qu'un seul spot a été repéré dans celui de ses rhizomes (o, *Figure 84*). Ainsi, *A. artemisiifolia* présente le plus de molécules actives des deux plantes, ce qui apparaît cohérent avec son plus fort potentiel surligné lors des tests en puits.

Dans la partie aérienne d'*A. artemisiifolia*, le premier spot d'intensité faible (a, *Figure 84*) présente deux ions à *m/z* 725,3912 et *m/z* 833,5217 cependant ils n'ont pas pu être identifiés avec les données de la littérature et bibliothèques disponibles (voir *Annexe 6*). Dans le second spot peu intense (b, *Figure 84*), les informations massiques obtenues correspondant aux ions *m/z* 515,1158 et à ses fragments *m/z* 353,0891 et 191, 0569. L'actif proposé est l'acide 3,5-DCQA, également retrouvé à ce *Rf* précédemment et présentant une activité antioxydante (voir *Figures 81, B et 82*, *section II. C. 1. et 2.*). Dans le dernier spot (c, *Figure 84*), quatre ions étaient présents. Deux restent non identifiés (voir *Annexe 6*) mais les ions *m/z* 285,2686 et *m/z* 571,4173 peuvent correspondre respectivement à la lutéoline et à son multimère. La présence de lutéoline ou dérivés avait été suggérée lors de l'analyse TLC-NEU-PEG (spot jaune en front de solvant, voir *Figure 81, A*, *section II. C. 1.*). Antérieurement, la

lutéoline et ses dérivés ont montré des activités anti-tyrosinase très prometteuses également dans des tests *in vitro* et *in vivo* [486,487]. La lutéoline-7-sulfate, isolées de plantes diverses telles que *Phyllospadix iwatensis* et *Zostera marina* par exemple, a supprimé la synthèse de la mélanine de manière dose-dépendante dans les mélanocytes épidermiques humains primaires. De plus, elle exercait une toxicité plus faible que la lutéoline dans les cellules B16-F10 [486]. Dans les racines d'*A. artemisiifolia*, le spot faiblement intense *Rf 0,5* correspond à l'acide 5-*O*-CQA (ion *m/z* 353,0891 -> ion *m/z* 191,0571). Ce composé avait aussi été mis en évidence comme antioxydant à ce *Rf* (voir *Figure 81, B, section II. C. 1.*). Il était montré dans un travail antérieur que l'acide 5-*O*-caféoylquinique inhibait la mélanogenèse en chélatant un cation cuivre provenant d'un complexe cuivre-tyrosinase [488]. Cet acide isolé de *Lepisorus thunbergianus* ou la fraction butanolique de cette plante étaient proposé comme agent blanchissant la peau à fort potentiel [488]. Dans les deux autres spots actifs anti-tyrosinase d'intensité modérée à forte, les mêmes informations massiques ont été obtenues que dans la partie aérienne de la plante (présences de l'acide 3,5-DCQA et de la lutéoline).



	Lettre	*Rf*	*m/z* (fragments)	Formule moléculaire	Proposition d'identification
			A. artemisiifolia		
PA	a	0.3	725.3912	–	NI
			833.5217	–	NI
	b	0.8	515.1158 (353.0891/191.0569)	$C_{25}H_{24}O_{12}$	Acide 3,5-dicaffeoylquinique
			571.4172	–	Multimère de lutéoline
	c	1.0	451.4531	–	NI
			285.2686	$C_{15}H_{10}O_6$	Lutéoline
			277.2184	–	NI
R	x	0.5	353.0894 (191.0571)	$C_{16}H_{18}O_9$	Acide 5-*O*-caffeoylquinique
	y	0.8	515.1209 (353.0890/191.0571)	$C_{25}H_{24}O_{12}$	Acide 3,5-dicaffeoylquinique
			571.4173	–	Multimère de lutéoline
	z	1.0	285.2686	$C_{15}H_{10}O_6$	Lutéoline
			367.3591	–	NI
			277.2183	–	NI
			S.canadensis		
PA	v	0.1	191.0554	$C_7H_{12}O_6$	Acide quinique
				$C_6H_8O_8$	Acide citrique
			361.1630	–	NI
	m	0.8	431.0953	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Kaempférol glucoramnoside ou Afzéline
			447.0902	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Quercitrine ou Astragaline
			515.1151 (353.0855/191.0549)	$C_{25}H_{24}O_{12}$	Acide 3,5-dicaffeoylquinique
			347.1842	–	NI
	w	1.0	445.2201	–	NI
			537.3024	–	NI
Rhiz.	o	1.0	315,1950	$C_{20}H_{28}O_3$	Solidagenone
			413,2308	–	NI

Figure 84. Analyse HPTLC-activité tyrosinase/HRMS en mode d'ionisation négative : détection des zones actives anti-tyrosinase des différents organes d'A. artemisiifolia et S. canadensis et propositions d'identifications des actifs. Rf = Facteur de rétention. Phase mobile des composés polyphénoliques. Les spectres de masse des spots actifs dans lesquelles des composés restent encore non identifiés à ce jour (NI) sont donnés en Annexe 6.

Dans la partie aérienne de *S. canadensis*, de l'acide quinique ou l'acide citrique ont été proposés pouvant correspondre à l'ion *m/z* 191,0554 détecté dans le spot en front d'éluant de très forte intensité *Rf* 0,1 (a, *Figure 84*). Dans le second spot d'intensité faible, plusieurs informations massiques sont présentes correspondant à des

composés co-élués. Il n'est alors pas possible de savoir à qui appartient l'activité anti-tyrosinase (un ou plusieurs composés). Aucune identification n'a pu être proposée pour l'ion *m/z* 361,1630 (voir *Annexe 6*). De l'acide 3,5-DCQA a pu être identifié (ion *m/z* 515,1151 -> ion *m/z* 353,0855 -> ion *m/z* 191,0546) au même *Rf*0,8 que ce qui a été donné pour *A. artemisiifolia*. L'ion *m/z* 431,0953 peut correspondre à de l'afzéline ou kaempférol glucoramnoside. Enfin, sous ce spot, a été proposé de la quercitrine ou de l'astragaline en correspondance de l'ion *m/z* 447,0902. La présence de dérivés de quercétine avait également été suggérée lors de l'évaluation de l'activité antioxydante par TLC en lien également avec la couleur jaune repérée en TLC-NEU-PEG et la plage de *Rf* (voir *Figure 81, A*, *section II. C. 1.*). Plusieurs dérivés glycosylés du kaempférol ou de la quercétine ont également montré des activités anti-tyrosinase intéressantes dans d'autres travaux antérieures *in vitro*, *in vivo* et *in silico* [486]; confortant les résultats acquis ici. En front de solvant, trois ions étaient détectés mais aucune proposition de structure n'a pu être faite (voir *Annexe 6*). Dans les rhizomes de *S. canadensis*, un composé unique a été caractérisé *Rf*1,0 comme étant de la solidagénone avec l'ion à *m/z* 315,1950 [343]. A notre connaissance, il s'agit de la première fois que cette molécule est identifiée comme active anti-tyrosinase.

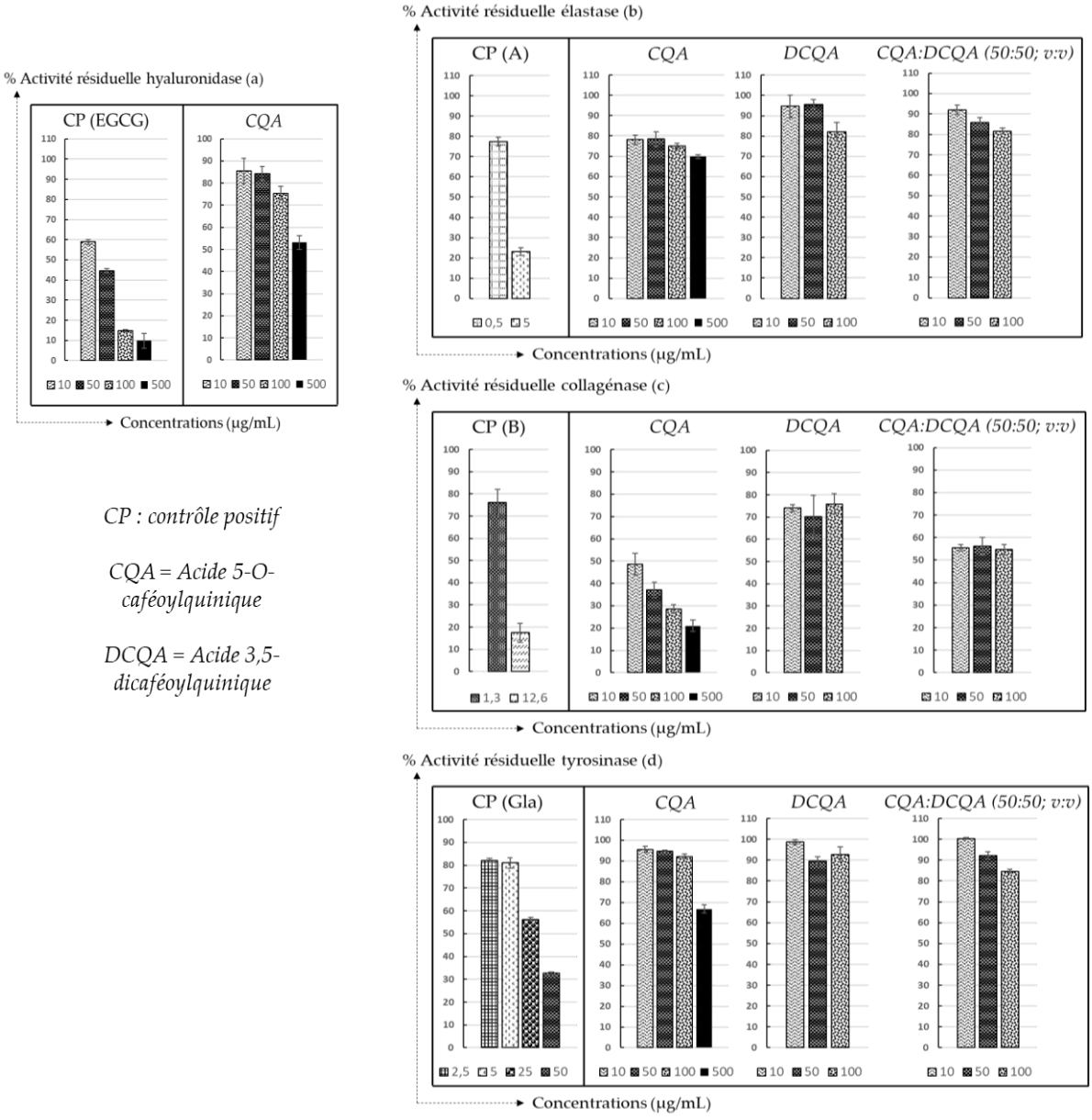
Pour conclure sur ce travail, les principaux inhibiteurs de la tyrosinase identifiés chez *A. artemisiifolia* sont les acides 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA ainsi que la flavone lutéoline. Chez *S. canadensis*, les actifs anti-tyrosinase sont les acides 5-*O*-CQA, 3,5-DCQA également mais aussi citrique ou quinique ; plusieurs flavonoïdes (kaempférol glucoramnoside ou afzéline et la quercitrine ou l'astragaline) ainsi que de le diterpène solidagénone.

4. CRIBLAGE DERMO-COSMETIQUE DE STANDARDS SELECTIONNES ET DISCUSSION SUR LES ACTIVITES BIOLOGIQUES OBSERVEES

De la même façon que ce qui a été proposé avec *F. japonica*, les deux acides phénoliques entant que standards (5-*O*-CQA, 3,5-DCQA) ainsi que leur mélange en proportions équivalentes ont été criblés et évalués sur l'élastase, la collagénase et la tyrosinase dans les mêmes conditions que celles réalisées pour les extraits bruts (voir première partie des travaux *I. D. 2.*). Ces deux composés ont été choisis du fait de leur présence dans l'ensemble des organes de *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*, ainsi que pour leurs activités antioxydantes fortes. Les acides caffeoylquiniques sont par ailleurs réputés pour leur activité antioxydante en effet [369,370] mais aussi leurs activités anti-âge, anti-inflammatoire, protectrice contre les dommages causés par les UV ou encore leurs effets sur la longévité [489–494].

L'acide 5-*O*-CQA a déjà pu montrer ses activités dermo-cosmétiques sur les cibles dans le cadre du modèle *F. japonica*. L'apport dans cette section réside notamment dans le fait d'évaluer celles du 3,5-DCQA et d'examiner les effets synergiques ou antagonistes du mélange des deux molécules. Les résultats des standards sont présentés *Figure 85*. Les efficacités des extraits bruts observées précédemment dans la première partie des travaux *I. D. 2* sont résumées *Figure 86* pour aider à la discussion. Les résultats obtenus révèlent des activités différentes des standards selon la cible considérée (*Figure 85, a-d*).

Sur la hyaluronidase *Figure 85 a*, le CQA présente une activité résiduelle faible avec une effet dose-réponse. Il est difficile de le relier, à lui seul, aux efficacités observées des extraits bruts. En fonction de son abondance (*Figure 86*), aucune tendance n'est identifiable. La plus forte abondance en CQA a été trouvée dans l'extrait de partie aérienne de *S. canadensis* et ce dernier correspond au moins bon inhibiteur de la hyaluronidase. L'extrait de racines d'*A. artemisiifolia,* qui contient quant à lui la plus faible abondance en CQA, est également un faible inhibiteur. Le classement des extraits est davantage relié à la quantité de DCQA. Effectivement, l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* et celui de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* ont les plus forts potentiels et contiennent les plus fortes teneurs en DCQA. *A contrario*, les extraits de racines d'*A. artemisiifolia* et de partie aérienne de *S. canadensis* contiennent les plus faibles teneurs en DCQA et sont les moins bons inhibiteurs. Bien que non testé ici seul sur la cible, il se pourrait donc que le DCQA soit un meilleur inhibiteur de la hyaluronidase que le CQA.



CP : contrôle positif

CQA = Acide 5-O-caféoylquinique

DCQA = Acide 3,5-dicaféoylquinique

Figure 85. Evaluation des activités hyaluronidase (a), élastase (b), collagénase (c) et tyrosinase (d) résiduelles du 5-O-CQA et 3,5-DCQA et de leur mélange. (EGCG) = gallate d'épigallocatéchine ; (A) = N-Méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chlorométhyl cétone ; (B) = 1,10-phénanthroline, monohydrate et (Gla) = glabridine. n = 3 expériences indépendantes pour chaque concentration (µg/mL). Les barres d'erreur représentent ± écart type.

Sur l'élastase *Figure 85 b*, les activités résiduelles du CQA, du DCQA et du mélange CQA:DCQA sont faibles par comparaison au control positif et présentent des effets dose-réponse. Le CQA présente néanmoins la plus forte efficacité. Le mélange se situe quant à lui entre les activités observées sur les acides séparés. Il apparaît que les observations initialement faites sur les activités résiduelles élastase des divers extraits bruts peuvent être corrélées avec les efficacités observées ici avec les deux acides prédominants (*Figure 86*). En effet, les parties aériennes des deux espèces ont les quantités les plus importantes en CQA et sont les meilleurs inhibiteurs. Les parties racinaires quant à elles, qui possèdent les plus faibles teneurs en CQA, sont les moins bons. A 100 µg/mL de plus, les activités du mélange CQA:DCQA et de la partie aérienne d'*A. artemisiifolia* sont proches (respectivement 81,6 ± 1,6% et 93,9 ± 2,2%). Ceci pourrait conforter le fait que l'efficacité de l'extrait de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* est notamment liée aux deux acides phénoliques voir même que les autres composés extraits diminuent légèrement son inhibition contre l'élastase. Par ailleurs, l'extrait de rhizomes de *S. canadensis*, qui s'avérait activateur de l'élastase contient la plus forte abondance en DCQA. Il se pourrait que le DCQA participe à diminuer l'activité de cet extrait. En mélange avec le CQA, l'activité globale se voit augmenter.

Activité résiduelle considérée	***Hyaluronidase (à 100 µg/mL)***					
Classements des EB (EtOH) + → -	EGCG (14,9 ± 0,5%)	Rhizomes de *S. canadensis* (42,2 ± 2,4%)	Partie aérienne d'*A. artemisiifolia* (53,2 ± 5,0%)	5-*O*-CQA (75,4 ± 3,1%)	Racines d'*A. artemisiifolia* (78,3 ± 2,0%)	Partie aérienne de *S. canadensis* (85,0 ± 1,7%)

Activité résiduelle considérée	***Elastase (à 100 µg/mL)***							
Classements des EB (EtOH) + → -	CP (A) à 5 µg/mL (23,2 ± 1,8%)	5-*O*-CQA (75,0 ± 1,5%)	CQA/DCQA (81,6 ± 1,6%)	3,5-DCQA (82,0 ± 4,5%)	Partie aérienne d'*A. artemisiifolia* (93,9 ± 2,2%)	Partie aérienne de *S. canadensis* (99,1 ± 3,4%)	Racines d'*A. artemisiifolia* (activateur; 107,2 ± 2,1%)	Rhizomes de *S. canadensis* (activateur; 114,1 ± 4,6%)

Activité résiduelle considérée	***Collagénase (à 100 µg/mL)***							
Classements des EB (EtOH) + → -	CP (B) à 12,6 µg/mL (17,5 ± 4,4%)	5-*O*-CQA (28,6 ± 2,0%)	Rhizomes de *S. canadensis* (36,9 ± 9,5%)	Partie aérienne de *S. canadensis* (39,6 ± 4,1%)	CQA/DCQA (54,6 ± 2,2%)	3,5-DCQA (75,9 ± 4,6%)	Racines d'*A. artemisiifolia* (activateur; 104,0 ± 5,6%)	Partie aérienne d'*A. artemisiifolia* (activateur; 104,1 ± 6,6%)

Activité résiduelle considérée	***Tyrosinase (à 100 µg/mL)***							
Classements des EB (EtOH) + → -	Glabridine à 50 µg/mL (32,7 ± 0,4%)	Partie aérienne d'*A. artemisiifolia* (80,9 ± 2,4%)	Racines d'*A. artemisiifolia* (81,2± 1,8%)	CQA/DCQA (84,7 ± 0,9%)	Partie aérienne de *S. canadensis* (89,5 ± 1,2%)	Rhizomes de *S. canadensis* (91,9 ± 0,5%)	5-*O*-CQA (92,1 ± 1,2%)	3,5-DCQA (92,8 ± 3,6%)

	Selon l'analyse HPTLC-NEU-PEG**			
Classements des EB (5-*O*-CQA ; *hRf* = 50) + → -	Partie aérienne de *S. canadensis*	Partie aérienne d'*A. artemisiifolia*	Rhizomes de *S. canadensis*	Racines d'*A. artemisiifolia*
Classements des EB (3,5-DCQA ; *hRf* = 90) + → -	Rhizomes de *S. canadensis*	Partie aérienne d'*A. artemisiifolia*	Partie aérienne de *S. canadensis*	Racines d'*A. artemisiifolia*

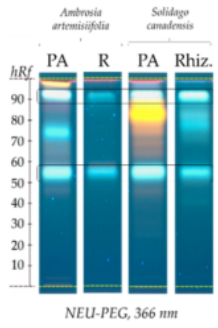


*Figure 86. Résumé des activités obtenues dans le cadre de la première partie des travaux relative au criblage et à l'évaluation des extraits bruts. EB = Extrait brut. PA = Partie aérienne. R = racines. Rhiz. = rhizomes.**Voir I. D. 2. pour plus de détails.*

Sur la collagénase *Figure 85 c*, le CQA et le DCQA ont un comportement très différent. Le CQA est le meilleur inhibiteur des deux, il présente de fortes activités anti-collagénase avec un effet dose-réponse. A 10 µg/mL, il a une activité résiduelle de 48,7 ± 4,8% seulement 2,8 fois supérieure à celle du témoin positif (B) à une concentration proche (12,6 µg/mL). Le DCQA quant à lui, a une activité modérée avec un effet plateau (moyenne de 73%). L'association des deux acides, confère au mélange une efficacité se situant entre les deux acides pris séparément et un comportement semblable au DCQA avec effet plateau (moyenne de 55%). Les deux espèces avaient un comportement très différent sur cette cible (*Figure 86*). Si *S. canadensis* était un très bon inhibiteur, *A. artemisiifolia* présentait des effets activateurs. Pour la collagénase, les efficacités observées ne sont pas directement et uniquement corrélées avec l'abondance relative des deux acides phénoliques. Pour exemple, l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* s'avère avoir le plus fort pouvoir inhibiteur des deux espèces. Il contient la plus forte abondance de DCQA et possède une quantité moindre de CQA, or sur cette enzyme CQA > DCQA. Le mélange CQA/DCQA a quant à lui une moins bonne inhibition que l'extrait. Il se pourrait donc que les deux autres acides présents dans l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* participent grandement et significativement à sa très forte inhibition. Il se pourrait alors que le ratio entre ces deux molécules soit important pour qu'il y ait un effet synergique positif (dans ce cas DCQA > CQA) ou d'autres molécules présentes dans l'extrait pourraient participer positivement à son activité globale. La forte inhibition de l'extrait de partie aérienne de *S. canadensis* peut s'expliquer quant à elle par la forte présence du CQA par rapport au DCQA ou éventuellement par la forte présence de flavonoïdes ou encore par la présence des autres molécules de l'extrait (agissant en synergie ou non également).

Sur la tyrosinase *Figure 85 d*, les résultats obtenus montrent des activités résiduelles très faibles pour le CQA, le DCQA comparées à celle de la glabridine. Tous présentent des effets dose-réponse sauf le DCQA qui révèle un effet plateau après 50 µg/mL. A 100 µg/mL, le CQA et le DCQA ont des activités comparables (92,1 ± 1,2% et 92,8 ± 3,6% respectivement), inférieures à celle du mélange soit 84,7 ± 0,9%. Il est possible donc qu'il existe une certaine synergie entre ces deux acides amenant à une inhibition accrue de la tyrosinase. D'autres proportions de mélanges de CQA et DCQA n'ont pas été testées, mais il se pourrait que l'inhibition en soit affectée positivement ou négativement. Les efficacités des extraits pourraient être affectées par les abondances des deux acides (*Figure 86*). Par exemple, *A. artemisiifolia* a des capacités inhibitrices plus fortes (81% en moyenne pour ses deux organes) que celles de *S. canadensis* (91% en moyenne pour ses deux organes). L'efficacité observée pour *A. artemisiifolia* est par ailleurs celle qui se rapproche le plus de l'efficacité du mélange. Visuellement, sur la plaque HPTLC-NEU-PEG (*Figure 86* également), l'extrait de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* contient autant de CQA que de DCQA ce qui serait cohérent avec l'efficacité du mélange en ratio équivalent. Les autres composés minoritaires de cet extrait pourraient néanmoins intervenir dans l'activité globale observée. L'extrait de racines d'*A. artemisiifolia* dont l'activité est la même que l'extrait de partie aérienne, a les plus faibles quantités de DCQA et de CQA. Il se pourrait que des molécules minoritaires participent grandement à l'activité globale de cette extrait ou que le ratio des deux acides (proportions équivalentes ou non) ait une très forte influence positive. Enfin, l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* possède le plus de DCQA en comparaison des autres extraits et c'est le moins bon candidat sur cette cible. Ceci apparaît cohérent fonction de l'activité du DCQA seul (dernier du classement, *Figure 86*).

En conclusion, les deux acides caffeoylquiniques (seul, en mélange ou intégrés aux extraits) constituent des inhibiteurs des cibles enzymatiques dermo-cométiques intéressants. Ils sont plus particulièrement actifs contre la collagénase, en comparaison avec le témoins postif. Plusieurs études antérieures confortent nos résultats et l'intérêt pour ces composés [490–492,494]. En effet, il avait été suggéré que l'acide 3,5-dicafféoyl-épi-quinique régulait négativement la dégradation du collagène *via* une inhibition de l'activation de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), ce qui a entraîné une diminution de l'activité des métalloprotéinases [490,494]. Ce composé prévient le photovieillissement en améliorant le stress oxydatif et la réponse pro-inflammatoire [490,491]. Enfin récemment, il avait aussi été constaté que les propriétés antioxydantes et inhibitrices de la collagénase d'extraits éthanoliques de *Ipomoea pes-caprae* pouvaient être associées avec le 3,5-DCQA, le CQA ainsi que l'acide férulique [492]. Des extraits d'*Helichrysum italicum* qui contenaient majoritairement du 3,5-DCQA présentaient également de fortes propriétés anti-collagénase et anti-élastase [495].

D. CONCLUSION

Cette seconde partie de travaux était consacrée à la valorisation chimique des trois espèces (*F. japonica*, *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*) dans le secteur dermo-cosmétique. Pour cela une stratégie fiable utilisant des techniques analytiques performantes et efficaces a été proposée avec *F. japonica*. La littérature sur cette espèce était la plus fournie [136,145,147,427–430] et c'était cette plante qui présentait les propriétés protectrices contre le vieillissement cutané les plus fortes en comparaison des deux autres espèces étudiées. La stratégie proposée a alors servi de 'preuve de concept', appliquée ensuite pour l'étude d'*A. artemisiifolia* et *S. canadensis*. Elle pourrait également être employée dans des travaux futurs pour valoriser d'autres EVEE problématiques.

Dans le cas de *F. japonica*, il a été question dans un premier temps, de comparer plus finement par UHPLC-UV-HRMS les compositions phytochimiques de ses feuilles et ses fleurs en particulier. Lors des opérations de gestion de l'espèce, il n'est pas rare que la plante soit collectée en pleine floraison, hors l'extrait de partie aérienne qui avait été criblé et évalué dans *la partie I. de travaux* précédente n'était composé que de feuilles et de cannes. L'analyse différentielle réalisée a permis de mettre en évidence les molécules discriminantes d'un organe à l'autre. Ses feuilles contenaient majoritairement de la polydatine et de l'émodine tandis que dans ses fleurs étaient davantage présents des flavonoïdes comme plusieurs dérivés de quercétine. Dans un second temps, les molécules responsables de l'activité antioxydante ont été caractérisées pour *F. japonica* avec l'approche HPTLC-DPPH. Le couplage de la HPTLC à la MS a permis de compléter les hypothèses émises d'identifications des principaux actifs (acide chlorogénique, quercitrine, catéchine gallate, polydatine, émodine et dérivés, resvératrol, torachrysone glucoside). Pour la première fois sur cette espèce, l'approche HPTLC- Bioautographie/MS a permis d'identifier les principaux inhibiteurs de la tyrosinase (composés pour la plupart identiques à ceux antioxydants). Ensuite, plusieurs standards représentatifs (*Cf.* travaux bioautographiques et largement représentés chez *Fallopia spp.*) sélectionnées ont été criblés et évalués de façon identiques à ce qui avait été réalisé sur les extraits bruts. Le meilleur inhibiteur de la hyaluronidase, de l'élastase et de la collagénase était l'émodine, tandis que le resvératrol

s'est avéré avoir le pouvoir le plus fort anti-tyrosinase avec des effets dose-réponse. L'activité la plus intéressante pour l'ensemble des molécules testées a été sur la collagénase, comme ce qui avait été mis en évidence avec les divers extraits examinés de *F. japonica*. Ces mêmes molécules ont été également suivies plus finement par UHPLC-HRMS pour discuter plus largement des efficacités globales des extraits de *F. japonica* avec leurs compositions phytochimiques. Enfin, l'ajout d'eau dans le solvant d'extraction pur (éthanol) a été évaluée afin d'envisager un enrichissement des extraits en resvératrol, polydatine et émodine. Les teneurs maximales en ces composés ont été mises en avant dans l'extrait de rhizomes (60/40 ; *v/v* ; EtOH/H_2O). Des études futures *in vitro*, *in vivo* et *in silico* devraient être envisagées afin d'évaluer les activités dermo-cosmétiques de ces extraits/actifs et leurs toxicités. Le travail mené sur *F. japonica* (anciennement *Polygonum cuspidatum*) a conduit à une première publication scientifique dont la première page est présentée page suivante.

Chez *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*, plusieurs antioxydants (acides phénoliques dont les 5-*O*-caffeoylquinique ou 5-*O*-CQA et 3,5-dicaffeoylquinique ou 3,5-DCQA, dérivés de quercétine et lutéoline) ont été identifiés. Des inhibiteurs de la tyrosinase ont également pu être caractérisés (acides 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA, lutéoline, acide citrique ou quinique ; plusieurs flavonoïdes dont afzéline et quercitrine ainsi que solidagénone). Les extraits de parties aériennes possédaient plus d'antioxydants que ceux des rhizomes, corroborant avec les activités globales des extraits déterminées en microplaque. Le traitement statistiques d'échantillons des organes à trois stades de croissance différents d'*A. artemisiifolia* a notamment montré que le passage du stade 1 à 2 était caractéristique et induisait une différence d'activité antioxydante positive significative pour la partie aérienne. Il était plus difficile de conclure quant à la répartition de l'activité antioxydante au sein de des racines au cours de leur développement. Par ailleurs, les deux type d'organes (partie aérienne et racines) présentaient de nombreux biomarqueurs communs dont principalement les deux acides 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA. L'ensemble des organes récoltés intra-localisation d'*A. artemisiifolia* pourraient être rassemblés. Les deuxièmes et troisièmes stades de développement seraient à privilégier lors de la récolte pour ce type de valorisation (activité antioxydante). En suivant, les deux acides phénoliques communs aux extraits des deux espèces végétales ont été choisis entant que standards pour être criblés sur cibles enzymatiques. Leur mélange en proportions équivalentes a également été examiné dans le but de déterminer des effets synergiques ou antagonistes sur les enzymes dermo-cosmétiques. Sur la hyaluronidase, les comportements des extraits bruts observés ne peuvent pas être directement liés à l'abondance des deux acides. Néanmoins, l'acide 3,5-DCQA serait un meilleur inhibiteur que le 5-*O*-CQA. Sur l'élastase, les activités résiduelles des divers extraits bruts ont pu être corrélées avec les efficacités observées ici avec les deux acides prédominants. Sur la collagénase, les deux acides ont eu un comportement très différent. L'acide 5-*O*-CQA était le plus efficace contre la cible. Les efficacités observées des extraits bruts quant à elles, n'ont pas pu être corrélées uniquement avec l'abondance des deux acides phénolique. Enfin, sur la tyrosinase, une synergie entre les deux composés permettrait d'avoir une inhibition augmentée sur cette cible. Des études futures *in vitro*, *in vivo* et *in silico* devraient être envisagées également afin d'évaluer les toxicités de ces différents extraits/actifs.

Afin de faciliter davantage le processus de découverte de composés anti-âge puissants, récemment a été crée *ANTIAGE-DB* [475], un outil en libre accès dans lequel a été intégré les propriétés inhibitrices des composés naturels contre élastase, la hyaluronidase et la tyrosinase collectées pour la période 1965-2020. Cette base de données a été développée pour permettre une interrogation flexible et simple des propriétés d'inhibition des composés naturels ainsi que pour effectuer en temps réel une prédiction *in silico* des composés pouvant interagir avec les enzymes étudiées. Le serveur fournit des informations sur leurs interactions au niveau atomique avec les trois enzymes ainsi que sur l'affinité de liaison calculée envers chaque enzyme. L'utilisateur peut acquérir simultanément des informations sur le ligand et son interaction avec les trois enzymes [475]. Il pourrait être intéressant ultérieurement de balayer plus largement les composés identifiés dans les divers organes des trois EVEE (les majoritaires par exemple) afin de mettre en évidence d'autres inhibiteurs puissants.

plants

MDPI

Article

Screening and Evaluation of Dermo-Cosmetic Activities of the Invasive Plant Species *Polygonum cuspidatum*

Vanille Quinty [1], Cyril Colas [2,3], Rouba Nasreddine [2], Reine Nehmé [2], Christine Piot [1], Micheline Draye [1], Emilie Destandau [2], David Da Silva [2,*] and Gregory Chatel [1,*]

[1] EDYTEM, CNRS, Univ. Savoie Mont Blanc, 73000 Chambéry, France
[2] ICOA, CNRS—UMR 7311 BP 6759, Univ. Orléans, CEDEX 2, 45067 Orléans, France
[3] CBM, CNRS—UPR 4301, Univ. Orléans, CEDEX 2, 45071 Orléans, France
* Correspondence: david.da-silva@univ-orleans.fr (D.D.S.); gregory.chatel@univ-smb.fr (G.C.)

Abstract: *Polygonum cuspidatum* (*P. cuspidatum*) is among the world's most problematic invasive plant species with negative ecological, socio-economic and security consequences. Management operations in areas invaded systematically generate a large quantity of plant waste, most often without outlets. Using this plant material could constitute a new alternative treatment for sustainable management. *P. cuspidatum* is well known to have numerous biological properties, containing notably stilbenes, quinones, flavonoids and phenolic acids. The present work proposes a reliable strategy using powerful techniques for the screening and the evaluation of the dermo-cosmetic potential of its aerial parts (AP) and root parts (RP). To the best of our knowledge, only antioxidant and anti-tyrosinase activities were previously evaluated on *P. cuspidatum* among the targets studied (superoxide dismutase, hyaluronidase, elastase, collagenase and tyrosinase). The results revealed strong antioxidant and anti-collagenase activities, moderate anti-hyaluronidase activity, while weak anti-elastase and anti-tyrosinase activities were observed for ethanolic extracts. Different standards selected and screened on the same targets made it possible to correlate the observed residual activities of produced extracts of *P. cuspidatum* from Savoie Mont Blanc and their chemical compositions. A structure-activity study was thus conducted on main molecular families, widely represented in the genus *Polygonum*.

Keywords: *Polygonaceae*; *Polygonum cuspidatum*; invasive plant species; superoxide dismutase; hyaluronidase; elastase; collagenase; tyrosinase

check for updates

Citation: Quinty, V.; Colas, C.; Nasreddine, R.; Nehmé, R.; Piot, C.; Draye, M.; Destandau, E.; Da Silva, D.; Chatel, G. Screening and Evaluation of Dermo-Cosmetic Activities of the Invasive Plant Species *Polygonum cuspidatum*. *Plants* **2023**, *12*, 83. https://doi.org/10.3390/plants12010083

Academic Editors: Paula Lorenzo and Maria Cristina Morais

Received: 7 November 2022
Revised: 15 December 2022
Accepted: 19 December 2022
Published: 23 December 2022

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Invasive alien species (IAS), including invasive plant species [1], constitute one of the main causes of erosion of biodiversity on a global scale, along with the destruction of natural habitats, the overexploitation of resources, pollution and climate change [2]. Native to the southern and oceanic regions of eastern Asia (Japan, Korea, China), Japanese knotweed, or *Polygonum cuspidatum* Siebold. & Zucc., is an example of a geophyte plant in the family *Polygonaceae*. It was first introduced to Britain as an ornamental plant in the 1840s, not least because of its heart-shaped green leaves, graceful habit and fall bloom [3]. At the beginning of the 20th century after a latency phase, it began its impressive colonisation with a very strong dynamic expansion. A simple fragment of the plant, of a few grams, is enough to create a clone [4]. Thus, *P. cuspidatum* quickly became invasive in Europe, America and Australia [5,6]. It is considered by the International Union for Conservation of Nature (IUCN) as one of the hundred most worrying invasive alien species in the world with negative socio-economic and ecological impacts potentially affecting recipient ecosystems. The species dominates the soil space with its dense and deep root network and with its several meters high, prevents light from passing through, depriving other plant species of the sun. Established on the riverbanks, the good water supply and the richness of the

A la vue des potentiels faibles à modérés anti-hyaluronidase des extraits bruts d'*A. artemisiifolia* et de *S. canadensis* et des observations faites sur la hyaluronidase en particulier, il a été question dans la partie de travaux suivante de tester leurs potentiels sur la lipase, cible enzymatique dite complémentaire à la hyaluronidase [101,441,442] (domaine de la nutraceutique).

III. VALORISATION DANS LE SECTEUR NUTRACEUTIQUE D'*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* ET DE *SOLIDAGO CANADENSIS*

A INTRODUCTION

En se basant sur la littérature disponible, *A. artemisiifolia* et *S. canadensis* présentent un potentiel comme agent nutraceutique pour la prévention et le traitement de diverses maladies dont le surpoids, l'obésité ou le diabète de type 2 [265,343,351,372,373]. En effet, récemment dans une étude *in vivo* sur des souris, les auteurs ont montré des effets protecteurs sur le foie et sur les taux de triglycérides lorsque *A. artemisiifolia* était consommée par voie orale. Différentes fractions organiques obtenues à partir de la partie aérienne de cette même plante, présentaient des propriétés hépatoprotectrices prononcées, dépassant celles du médicament *Karsil* et de fortes activités hypocholestérolémiantes, comparables à celle du médicament *Lipanor*. Des propriétés qui sont recherchées pour traiter l'athérosclérose, associée à des troubles cardiaques et vasculaires [265]. Chez *S. canadensis*, plusieurs lignanes isolées de sa partie aérienne, ont présenté une activité hypolipidémiante modérée chez les hamsters nourris avec un régime riche en graisses [372]. Des miels de la plante avaient également des activités antidiabétiques importantes (α-amylase catalysant la dégradation des poly- et oligosaccharides en oligosaccharides plus petits) [351]. Dans une autre étude récente, l'HPTLC associée à des dosages directs des α- et β-glucosidases (enzymes digérant les disaccharides et les oligosaccharides à chaîne courte en glucose) ainsi que de l'α-amylase a été utilisée pour la distinction chimiotaxonomique d'une trentaine de racines d'espèces indigènes et invasives de *Solidago*, dont *S. canadensis*. Les extraits éthanoliques ont montré des activités anti-hyperglycémiques intéressantes et fortes sur toute la gamme de polarité. Des diterpènes de type labdane ont été identifiés comme les composés les plus actifs présentant une inhibition enzymatique prononcée sur les trois cibles [343]. Enfin, un extrait de partie aérienne de *S. canadensis* possédait une autre propriété nutraceutique entant qu'agent masquant [373]. Les travaux précédents se sont ainsi principalement concentrés sur l'évaluation des impacts des deux plantes sur ces types d'enzymes digestives utilisant différents substrats sans tenir compte cependant de la lipase pancréatique [265,343,351,372,373].

Les inhibiteurs de lipase sont apparus ces dernières années comme une approche importante pour le contrôle et le traitement de l'obésité. Le médicament synthétique *Orlistat*, inhibiteur bien connu des lipases gastro-intestinales, engendre souvent des effets désagréables importants tels que des flatulences, des dommages potentiels au foie ou même des réductions significatives des concentrations sériques de cholestérol [63]. Cette troisième partie de travaux se consacre ainsi à l'évaluation d'extraits éthanoliques d'*A. artemisiifolia* et de *S.*

canadensis entant qu'inhibiteurs plus naturels de la lipase (*Figure 87*). Les extraits testés ont été obtenus par macération assistée par micro-ondes. En se basant sur des études précédentes menées sur des produits naturels [496,497], cette technique a été choisie car elle permettait d'une part un temps réduit d'extraction (en comparaison de la macération classique ou de la macération assistée par ultrasons mis en œuvre dans les parties de travaux précédentes) ; d'autre part d'accéder aux acides phénoliques présents dans les deux espèces (5-*O*-CQA et 3,5-DCQA) tout en favorisant leur rendement [496,497]; et enfin de pouvoir étudier et suivre les paramètres d'extraction tout au long du processus (nombre de cycles d'extraction, puissance d'irradiation, température, *etc.*) pouvant influencer les compositions phytochimiques des deux plantes et ainsi leurs activités biologiques (voir la dernière partie de travaux *V.* consacré à ce dernier point).

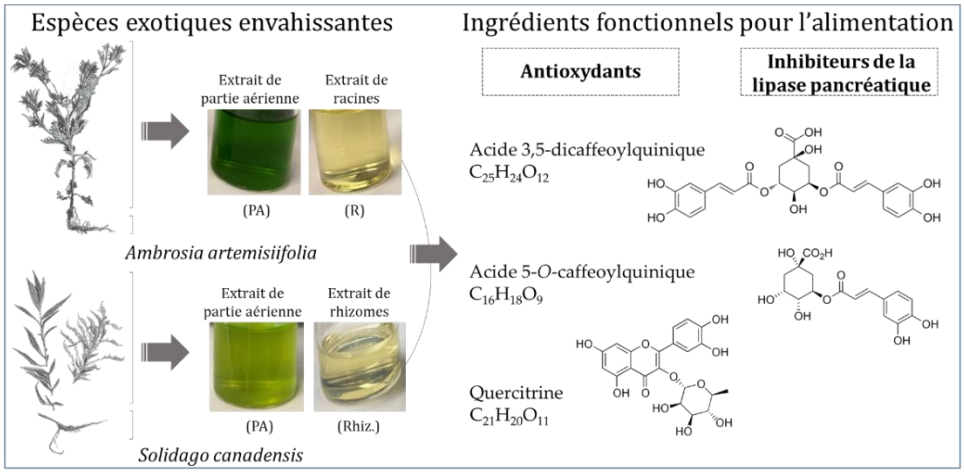


Figure 87. Résumé graphique relatif à la partie de travaux « VALORISATION DANS LE SECTEUR NUTRACEUTIQUE D'AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA ET DE SOLIDAGO CANADENSIS ».

Dans un premier temps, l'ensemble des extraits bruts ainsi que les standards 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA ont été évalués pour la première fois pour leurs capacités anti-lipases. Les compositions phytochimiques des extraits produits d'organes des deux plantes ont dans un second temps été étudiées par UHPLC-UV-Q-TOF-HRMS. Les profils obtenus ont été comparés entre eux ainsi que les abondances relatives des deux acides phénoliques présents dans tous les extraits. L'objectif ensuite était de corréler les capacités inhibitrices observées chez *A. artemisiifolia* et *S. canadensis* avec les abondances des deux marqueurs ciblés dans chaque extrait, et plus largement avec leurs compositions chimiques globales.

B. PROPRIETE NUTRACEUTIQUE

Les extraits bruts d'*A. artemisiifolia* et *S. canadensis* ont été évalués pour la première fois pour leurs capacités à inhiber la lipase pancréatique. Quatre concentrations finales d'extraits éthanoliques (10 ; 50 ; 100 et 500 µg/mL) ont été testées. Les deux étalons (5-*O*-CQA et 3,5-DCQA) ont également été examinés indépendamment aux mêmes concentrations. Le médicament commercialisé *Orlistat*, inhibiteur puissant spécifique et d'action prolongée des lipases gastro-intestinales, a été choisi comme témoin positif. Ce médicament

a été évalué à 100 et 300 µg/mL, car des concentrations empêchaient sa solubilité dans le milieu opératoire. Les résultats obtenus ici sont présentés ci-après *Figure 88*.

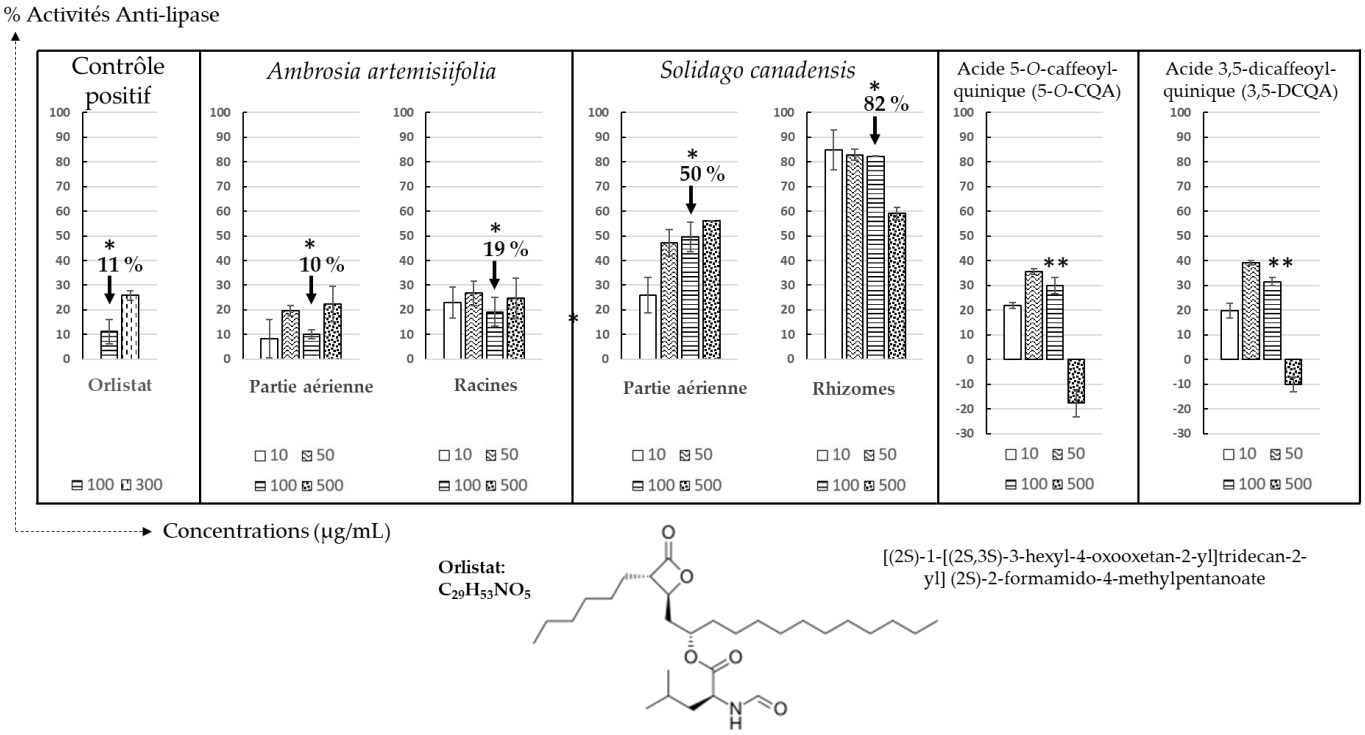


*Figure 88. Evaluation des activités anti-lipase des extraits éthanoliques d'A. artemisiifolia et S. canadensis et des deux acides phénoliques 5-O-CQA et 3,5-DCQA par CE-UV. n = 3 expériences indépendantes pour chaque concentration (µg/mL). Les barres d'erreur représentent ± écart type. *significativement différent p < 0,05 et ** significativement différent de l'autre mais pas significativement différent entre eux.*

Les résultats présentés sur la *Figure 88* révèlent des activités anti-lipases très fortes des extraits de rhizomes et de partie aérienne de *S. canadensis*, tandis que des capacités anti-lipases modérées sont observées chez *A. artemisiifolia* comparables à l'*Orlistat*. A 100 µg/mL, ils (rhizomes de *S. canadensis*, partie aérienne de *S. canadensis*, partie aérienne d'*A. artemisiifolia*, racines d'*A. artemisiifolia* et témoin positif) ont respectivement des pourcentages d'inhibition de 82,3 ± 0,2%, 49,6 ± 5,9%, 10,1 ± 1,7%, 19,2 ± 5,7% et 11,2 ± 5,0%. L'extrait de partie aérienne de *S. canadensis* a un effet dose-réponse et les trois autres extraits montrent un effet plateau. Pour l'extrait le plus actif (rhizomes de *S. canadensis*), une baisse significative est observable à 500 µg/mL (82% à 59%); suggérant un effet non monotonique [443–445].

Contre la lipase pancréatique, les parties racinaires des plantes sont plus actives que leurs parties aériennes respectives. Les deux étalons présentent des activités anti-lipase modérées, légèrement supérieures à l'*Orlistat* pour des concentrations comparables. Un effet dose-réponse est présent aux concentrations 10 et 50 µg/mL puis il y a un effet activateur ou une diminution d'activité importante. En effet, le même comportement non monotonique de l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* est observé chez les deux acides phénoliques (chute à

500 µg/mL de 31% à -14%) [443–445]. L'effet solvant-enzyme était identique pour tous les extraits à toutes les concentrations. Il se pourrait donc qu'un encombrement stérique se produise à forte concentration et que dans ces conditions les limites de solubilité aient été atteintes.

Les résultats obtenus dans une étude précédente [498] sont du même ordre de grandeur : à une concentration de 200 µg/mL, l'extrait de *Rosa damascena* avait un effet d'inhibition égal à 62%. Concernant l'effet 'en cloche' observé, des études antérieures utilisant le dichroïsme circulaire suggéraient que l'interaction entre les composés polyphénoliques et l'enzyme pouvait provoquer un changement conformationnel et le dépliement ultérieur de la structure protéique, ce qui entraînait une diminution de l'activité enzymatique. En étudiant les complexes « composé phénolique-lipase pancréatique », une diminution des structures α-hélicoïdales était observée, à mesure que le rapport « composé phénolique-protéine » augmentait [499].

C. EVALUATION DES COMPOSITIONS PHYTOCHIMIQUES DES ORGANES D'*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* ET DE *SOLIDAGO CANADENSIS*

Comme énoncé antérieurement, si la composition chimique de la partie aérienne d'*A. artemisiifolia* est bien documentée du fait notamment de son allergénicité [227,265–268,351] très peu d'informations sont disponibles sur la composition de sa racine. Pour *S. canadensis*, tes travaux antérieurs portent sur l'ensemble du végétal même si une grande majorité concerne son inflorescence [343,350,351,369]. Cette section propose une évaluation des compositions phytochimiques des extraits éthanoliques produits par MAE d'*A. artemisiifolia* (partie aérienne composée de feuilles et tiges ; et racines) et de *S. canadensis* (partie aérienne composée de feuilles et tiges ; et rhizomes). Les chromatogrammes UV des quatre extraits obtenus sont présentés sur la *Figure 89*. Leurs *BPCs*, mode d'ionisation négatif, sont également montrés *Annexe 7*. Le *Tableau 9*, résume les principales molécules identifiées dans les organes des deux espèces.

Les expériences MS ont été réalisées en mode (-) ESI car il permettait de détecter le plus grand nombre de composés (en comparaison du mode (+) ESI, données non présentées). Pour l'identification des composés, les caractéristiques chromatographiques, les spectres UV, les spectres de masses ainsi que les informations bibliographiques disponibles sur chaque plante ont aidé à réaliser les propositions structurales. Les ions adduit $[M+Cl]^-$ ou $[M+CHO_2]^-$ont souvent confirmé la formule proposée pour l'ion $[M-H]^-$. Les formules moléculaires possibles pour chaque pic sélectionné ont été recherchées dans les bases de données publiques à savoir *MassBank*, *Lotus Base*, *HMBD* et *PubChem* afin de caractériser les différents composés. Les composés 1, 2 et • ont été identifiés sans ambiguïté en comparant leur temps de rétention et leurs données spectrales avec ceux des étalons de référence.

Les empreintes chromatographiques des organes d'*A. artemisiifolia* et de *S. canadensis* présentent à la fois des similitudes en regardant notamment leurs composés majoritaires (*Figure 89*, composés 1, 2, ◆, ✧ et ●)

mais également des différences en se focalisant sur les composés minoritaires (*Figure 89*, composés a-z et a'-s'). Dans l'extrait de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* ont été caractérisés une vingtaine de composés (*Figure 89*, composés a-r et 1, 2, ✧). Ce dernier contient principalement des acides phénoliques (acide *p*-coumarique, 5-*O*-CQA, acide coumaroylquinique, 3,5-DCQA, 4,5-DCQA, acide caftarique, *etc.*) ; des flavonoïdes divers (quercimétrine, tamarixétine, lutéoline et dérivé glucosylé, avicularine, rutine, chrysoériol, isorhamnétine et glucosides *etc.*) mais également de la scopolétine (coumarine, *Figure 89*, d) et des sesquiterpènes lactones (psilostachyine A, péruvine, *etc.*). La partie aérienne d'*A. artemisiifolia* a pour composés largement majoritaires les acides phénoliques : 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA. La scopolétine est également prédominante et les sesquiterpènes lactiques sont largement minoritaires. Bien que plusieurs co-élutions aient été repérées (*Figure 89*, b-d), ces composés apparaissent prédominants. L'extrait de racines d'*A. artemisiifolia*, possède quant à lui une dizaine de molécules (*Figure 89*, composés s-z et 1) comprenant des acides phénoliques dont deux majoritaires (tout comme la partie aérienne de la plante : 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA) et des flavonoïdes la quercétine- 3-*O*-glucoside prédominante ainsi qu'une sesquiterpène lactone (ambrosinal B, *Figure 89*, u) largement minoritaire.

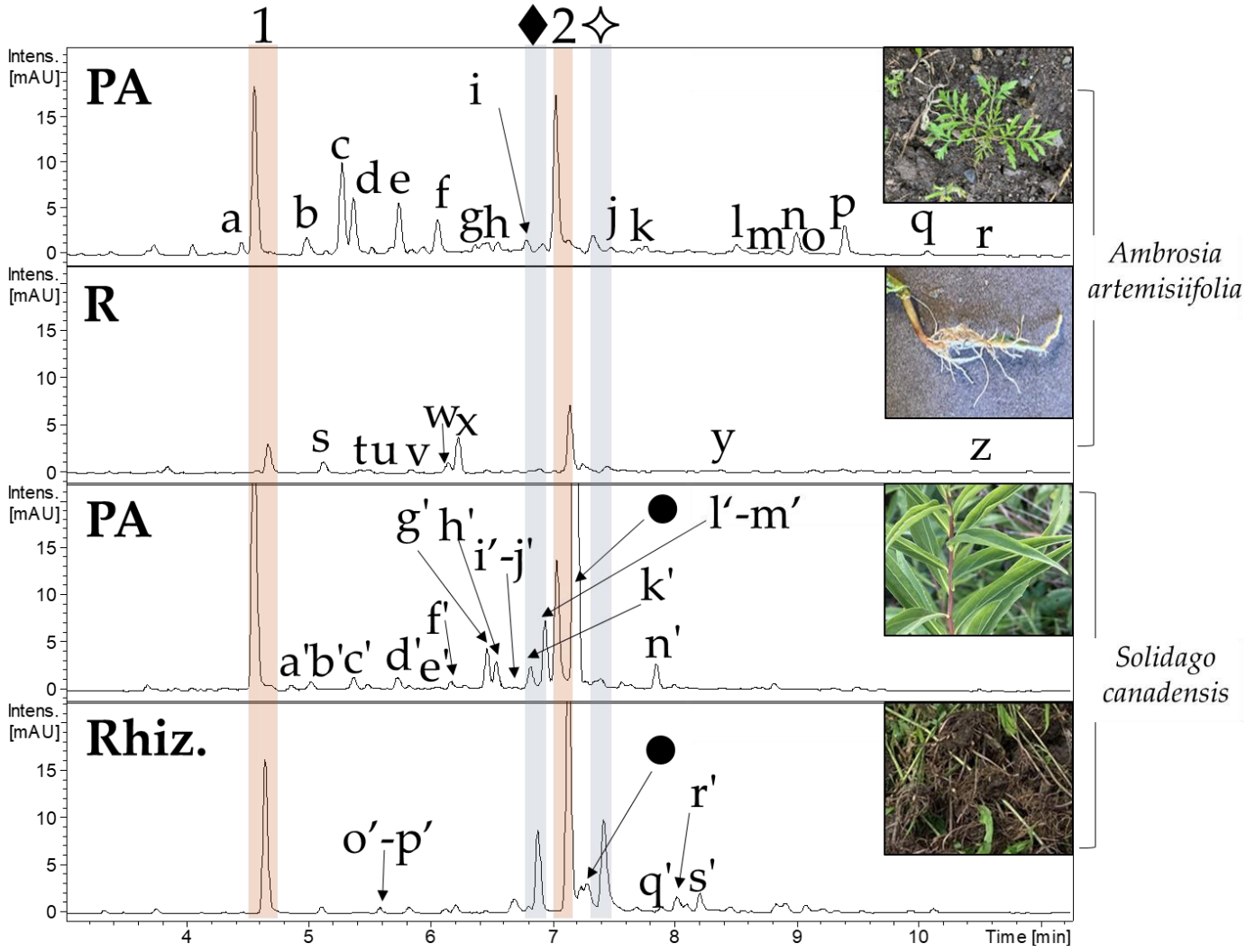


Figure 89. Analyse UHPLC-UV-Q-TOF-HRMS en mode négatif d'ionisation (UV à 285 nm) des extraits bruts d'A. artemisiifolia et S. canadensis. PA = partie aérienne (feuilles et tiges) ; R = racines et Rhiz.= rhizomes. Acide 5-O-caféoylquinique (1), Acide 3,5-dicaféoylquinique (2), quercitrine (•), acide 3,4-dicaféoylquinique (♦) et acide 4,5-dicaféoylquinique (✧). Les propositions d'identifications des composés a-z et a'-s' sont données Tableau 9.

Chez S. *canadensis*, l'extrait de sa partie aérienne possède une dizaine de composés (*Figure 89*, composés a'-m' et 1, 2 et •). Trois composés y sont majoritaires à savoir les deux acides phénoliques 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA ainsi que de la quercitrine (*Figure 89*, composés 1, 2 et •). La plupart des autres composés sont des dérivés de quercétine et de kaempférol. De l'acide quinique ou citrique a également été identifié. L'extrait de ses rhizomes présente trois composés communs avec la partie aérienne de la plante (*Figure 89*, composés 1, 2 et •). Une nouvelle fois ici, le 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA sont très largement majoritaires. Néanmoins cet extrait possède également deux autres acides isomères abondants qui sont le 3,4-DCQA et le 4,5-DCQA (*Figure 89*, composés ◆ et ✧), élués respectivement avant et après le 3,5-DCQA [500,501]. Cet organe contient plusieurs autres composés qui restent non identifiés (*Figure 89*, NI), de l'acide dattélique ainsi que le diterpène solidagénone (*Figure 89*, composés o'-s') [343].

Ainsi, plusieurs composés abondants ont été caractérisés dans les divers extraits obtenus par MAE, comprenant la quercitrine et quatre acides phénoliques (5-*O*-CQA ; 3,5-DCQA ; 3,4-DCQA et 4,5-DCQA). De plus, le 5-*O*-CQA et le 3,5-DCQA (*Figure 89*, composés 1 et 2) très largement prédominants, sont des composés communs aux quatre extraits produits ; également identifiés dans des études antérieures [266,325,332,369]. Il est également possible d'observer des différences dans leurs proportions relatives. De la plus forte à la plus faible abondance en 5-*O*-CQA, les extraits peuvent être classés comme ceci : partie aérienne de *S. canadensis* > partie aérienne d'*A. artemisiifolia* > rhizomes de *S. canadensis* > racines d'*A. artemisiifolia*. Pour le 3,5-DCQA, ils peuvent être classés ainsi : rhizomes de *S. canadensis* > partie aérienne d'*A. artemisiifolia* > partie aérienne de *S. canadensis* > racines d'*A. artemisiifolia*.

La quercitrine avait aussi pu être identifiées dans d'autres travaux antérieurs [325]. Dans notre étude, il s'agit d'un composé majoritaire dans la partie aérienne de *S. canadensis* mais non présent dans les deux autres extraits bruts. Par ailleurs, l'acide 3,4-dicaféoylquinique (*Figure 89*, composé ⧫) n'est observé que dans l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* et l'acide 4,5-dicaféoylquinique (*Figure 89*, composés ✧) uniquement dans l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* et l'extrait de partie aérienne d'*A. artemisiifolia*.

*Tableau 9. Analyses UHPLC-UV-Q-TOF-HRMS en mode ionisation négative : propositions d'identifications des composés présents chez A. artemisiifolia et S. canadensis. Acide caféoylquinique : CQA et acide dicaféoylquinique : DCQA. *Identifications des composés 1, 2 et • confirmées par les normes commerciales. Certaines intensités relatives sont données pour l'extrait de rhizomes de S. canadensis (% d'intensité relative) dans la colonne Fragments. Les couleurs mettent en avant les composés communs entre les quatre extraits.*

Organes	Temps de rétention (min)	UV max λ (nm)	MS [M-H]⁻ Ion moléculaire (*m/z*)	Fragments (*m/z*)	Formule chimique	Propositions d'identification	N° ou lettre ou autre
Partie aérienne d'*Ambrosia*	4,45		163,0388		$C_9H_8O_3$	Acide *p*-coumarique	a
	4,55	323	353,0882	191,0560	$C_{16}H_{18}O_9$	5-*O*-CQA*	1
	4,98		315,0991	301,2847	$C_{16}H_{12}O_7$	Tamarixétine	b

artemisiifolia			431,1926	269,6632	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Apigénine-7-*O*-*β*-*D*-glucoside	
	5,25		311,0775		$C_{13}H_{12}O_9$	Acide caftarique	c
			433,2084		$C_{20}H_{18}O_{11}$	Avicularine	
	5,37		191,0556		$C_{10}H_8O_4$	Scopolétine	d
			337,0931		$C_{16}H_{18}O_8$	Acide 3-*O*-*p*-coumaroylquinique	
	5,76		337,0929		$C_{16}H_{18}O_8$	Acide 4-*O*-*p*-coumaroylquinique	e
	6,06		295,0823		$C_{20}H_{40}O$	Phytol ou Acide propanoïque	f
			427,1971			NI	
	6,23		609,1460	301,3818	$C_{27}H_{30}O_{17}$	Rutine	g
	6,42		477,0672	301,0314	$C_{21}H_{18}O_{13}$	Quercétine 3-*O*-glucuronide	h
	6,84		593,1509	285,5532	$C_{27}H_{30}O_{15}$	Lutéoline 7-*O*- rhamnoside	i
	7,03	326	515,1198	353,0879 191,0535	$C_{25}H_{24}O_{12}$	3,5-DCQA*	2
	7,45	330	515,1192	353,0879 191,4369	$C_{25}H_{24}O_{12}$	4,5-DCQA	✧
	7,52		463,2540	301,3286	$C_{21}H_{20}O_{12}$	Querciméritrine	j
	7,59		301,1210		$C_{15}H_{10}O_7$	Quercétine	k
	8,51		279,1234		$C_{15}H_{22}O_5$	Psilostachyine A	l
			345,0614		$C_{17}H_{14}O_8$	Axillarine	
	8,74		263,1281		$C_{15}H_{20}O_4$	Peruvine ou Coronopiline ou Psilostachyine C ou Artemisiifoline	m
	8,82		623,1035	315,4789	$C_{28}H_{32}O_{16}$	Isorhamnétine-3-rutinoside	n
	9,01		315,0510		$C_{16}H_{12}O_7$	Isorhamnétine	o
	9,39		381,0379		$C_{16}H_{12}O_7$	NI	p
	10,08		299,0559		$C_{16}H_{12}O_6$	Chrysoeriol	q
	10,58		285,2924		$C_{15}H_{10}O_6$	Lutéoline	r
	18,77		277,2188			NI	
Racines d'*Ambrosia artemisiifolia*	4,67	326	353,0889	191,0567	$C_{16}H_{18}O_9$	5-*O*-CQA*	1
	5,17		583,2034			NI	s
	5,45		430,1874			NI	t
	5,61		411,1341		$C_{28}H_{44}O_2$	Ambrosinal B	u
	5,90		595,2971	301,3629	$C_{26}H_{28}O_{16}$	Quercétine-(pentosyl)-hexoside	v
	6,13		523,2195			NI	w
			625,1776			Quercétine 3-*O*-*β*-gentiobioside	
	6,20		463,2561	301,1343	$C_{21}H_{20}O_{12}$	Quercétine- 3-*O*-glucoside	x
	7,15	327	515,1207	353,0890 191,0580	$C_{25}H_{24}O_{12}$	3,5-DCQA*	2
	8,36		537,1032		$C_{30}H_{18}O_{10}$	Amentoflavone	y
	10,55		285,0802		$C_{15}H_{10}O_6$	Lutéoline	z
Partie aérienne de *Solidago canadensis*	4.55	325	353,0884	191,0558	$C_{16}H_{18}O_9$	5-*O*-CQA*	1
	5,01		431,1923	285,4107		Kaempférol-3-*O*-glucoramnoside	a'
	5,24		433,2078		$C_{20}H_{18}O_{11}$	Avicularine	b'
	5,36		191,0558		$C_6H_8O_7$	Acide citrique ou acide quinique	c'
	5,82		463,0885	301,2517	$C_{21}H_{20}O_{12}$	Quercétine-3-*O*-glucopyranoside	d'
	6,17		595,1302		$C_{26}H_{28}O_{16}$	Quercétine-(pentosyl)-hexoside	e'

	6,22		609,1456	301,1669	$C_{27}H_{30}O_{17}$	Rutine	f'
	6,47		463,0891		$C_{21}H_{20}O_{12}$	Hypéroside	g'
	6,53		463,0888		$C_{21}H_{20}O_{12}$	Isoquercitrine	h'
	6,68		579,1351		$C_{26}H_{28}O_{15}$	Quercétine-3-*O*-deoxyhexosyl(1-2)pentoside	i'
	6,72		557,2600			NI	j'
	6,85		593,1509		$C_{27}H_{30}O_{15}$	Nicotiflorine	k'
	6,90		549,1881		$C_{24}H_{22}O_{15}$	Quercetin 3-*O*-(6"-*O*-malonyl)-*β*-*D*-glucoside	l'
	6,93		433,0787		$C_{20}H_{18}O_{11}$	Quercétine 3-*O*-*α*-*L*-arabinopyranoside	m'
	7,04	327	515,1197	353,0879 191,0533	$C_{25}H_{24}O_{12}$	3,5-DCQA*	2
	7,19	347	447,0954	301,0342	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Quercitrine*	•
	7,85		431,0987	285,0431	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Afzéline	n'
Rhizomes de *Solidago canadensis*	4,65	325	353,0896	191.0570	$C_{16}H_{18}O_9$	5-*O*-CQA*	1
	5,59		335,0777		$C_{16}H_{16}O_8$	Acide dattélique	o'
	6,62		509,1307			NI	p'
			559,2774				
			654,1831				
	6,88	324	515,1207	353,0906 *(0.29%)* 191,0540	$C_{25}H_{24}O_{12}$	3,4-DCQA	♦
	7,13	326	515,1210	353,0890 *(9.90%)* 191,0573	$C_{25}H_{24}O_{12}$	3,5-DCQA*	2
	7,26	347	447,0950	301,0275	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Quercitrine*	•
			543,1152			NI	
	7,42	326	515,1209	353,0888 *(1.44%)* 191,0658	$C_{25}H_{24}O_{12}$	4,5-DCQA	✧
	7,85		527,1204			NI	q'
	8,07		557,1302			NI	r'
			682,2136				
	8,22		585,1258			NI	s'
	17,79		315,1992			Solidagénone	

D. CORRELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE ANTI-LIPASE

Malgré le partage de composés communs majoritaires tels que les composés 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA, les comportements d'*A. artemisiifolia* et de *S. canadensis* contre la lipase pancréatique varient considérablement. Cela contraste avec les résultats obtenus pour les activités antioxydantes des différents organes végétaux (voir seconde partie de travaux *II. C. 1.*). Plus précisément, les organes de même typologie (partie aérienne ou racines/rhizomes) ne présentaient pas le même comportement anti-lipase entre eux. En effet, les parties racinaires sont plus actives sur la lipase que leurs parties aériennes respectives. Ces résultats suggèrent que l'abondance du 3,5-DCQA, par rapport au 5-*O*-CQA, peut être un facteur crucial influençant positivement l'activité inhibitrice d'un extrait contre la lipase pancréatique. De plus, l'extrait le plus actif (rhizomes de *S. canadensis*) contient des phytoconstituants supplémentaires tels que les dérivés CQA (*Figure 89 section précédente III. C.*,

composés •,◆ et ✧) ou encore de la quercitrine. Ces composés peuvent jouer un rôle clé dans sa très forte efficacité contre la cible, agissant soit indépendamment, soit en synergie avec les deux acides phénoliques, éventuellement dans des proportions variables ou aux côtés d'autres molécules minoritaires présentes dans l'extrait [499]. Enfin, *A. artemisiifolia*, principalement caractérisée par la présence des deux acides phénoliques 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA (mis à part des composants mineurs), affiche un comportement anti-lipase comparable à ceux des étalons testés séparément ; ce qui paraît cohérent. *A. artemisiifolia* pourrait également contenir des concentrations proches de celles testées en ces deux acides phénoliques.

L'abondance des deux acides phénoliques 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA n'apparaît pas être directement corrélée à leurs propriétés anti-lipases, contrairement à ce qui a été observé précédemment pour les activités antioxydantes. En effet, chez *A. artemisiifolia*, ses racines possèdent une activité anti-lipasique modérée légèrement supérieure à sa partie aérienne. Cependant, c'est l'extrait de partie aérienne qui contient une quantité plus élevée en ces deux acides. De plus, sa partie aérienne a probablement autant de 5-*O*-CQA que de 3,5-DCQA alors que pour ses racines, le 3,5-DCQA est plus abondant. Des molécules minoritaires différentes d'un extrait à l'autre pourraient agir en synergie (effet d'entourage) ou la proportion de 3,5-DCQA par rapport au 5-*O*-CQA pourrait être significative pour expliquer cette légère différence d'efficacité. En ce qui concerne *S. canadensis*, ses rhizomes pour rappel ont la plus forte activité inhibitrice de la lipase pancréatique en les comparant à sa partie aérienne. L'extrait de cette dernière contient une quantité plus élevée de 5-*O*-CQA et une quantité inférieure de 3,5-DCQA et pour l'extrait de rhizomes c'est l'inverse. Est-ce que cette différence à elle seule peut expliquer une telle différence d'activité entre les deux organes ? Il se peut aussi que les dérivés 4-DCQA et le 4,5-DCQA participent activement à l'impressionnante efficacité anti-lipase de l'extrait de rhizomes. Cet organe contient également plusieurs autres composés minoritaires pouvant agir en synergie dont l'acide dattélique ainsi que le diterpène solidagénone qui montrait aussi antérieurement des effets anti-hyperglycémiques intéressants [343].

En comparant les deux parties aériennes entre elles, l'activité anti-lipase d'*A. artemisiifolia* était bien plus faible que l'activité anti-lipase de *S. canadensis*. Si les deux extraits possèdent du 5-*O*-CQA et du 3,5-DCQA, l'extrait de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* contient du 4,5-DCQA qui n'est pas présent dans l'extrait de partie aérienne de *S. canadensis*. Et à l'inverse ce dernier possède de la quercitrine, qui n'est pas retrouvée chez *A. artemisiifolia*. Ainsi, le 4,5-DCQA seul (pas de 3,4-DCQA comme les rhizomes de *S. canadensis*) aux côtés des deux acides phénoliques (5-*O*-CQA et 3,5-DCQA) ne permet pas à *A. artemisiifolia* d'atteindre une activité inhibitrice supérieure à la partie aérienne de *S. canadensis*. Les molécules minoritaires différentes d'un extrait à l'autre peuvent aussi jouer un rôle dans les activités anti-lipases observées. Il se peut enfin que la quercitrine confère à l'extrait de partie aérienne de *S. canadensis* ses intéressantes et prometteuses propriétés anti-lipases.

Des travaux récents, menés sur l'interaction entre la lipase et la quercitrine par spectroscopie de fluorescence, cinétique enzymatique et simulation de dynamique moléculaire, confirment cette dernière hypothèse. En effet, les auteurs ont montré que la quercitrine avait un fort effet d'extinction sur la fluorescence intrinsèque de la lipase. De plus, il s'est avéré que les forces dominantes lors de l'interaction étaient la liaison

hydrogène et les forces de van der Waals et que le ligand perturbait la structure de la lipase. Ils ont également démontré que la quercitrine inhibait la lipase et que l'effet prohibé était dose-dépendant [502].

Dans une revue récente sur le type d'interactions non covalentes *in vitro* possibles entre les composés polyphénoliques et les enzymes digestives [499], il est rapporté que les flavonoïdes ont généralement une activité enzymatique inhibitrice supérieure à celle des acides phénoliques, du fait notamment de la complexité de leurs structures lorsqu'ils interagissent (le plus souvent *via* une approche de *quenching* statique) avec l'enzyme. Divers éléments structuraux peuvent impacter l'activité observée tels que le nombre de groupements -OH et leur localisation dans la structure, la présence de glycosylation, sa position ou encore le nombre d'unités glycosyl. La glycosylation de la quercitrine (par rapport à sa forme aglycone quercétine) offre ainsi une plus grande possibilité d'interaction avec la protéine, augmentant la polarité de l'adduit « composé phénolique-protéine », par la formation de liaisons hydrogène, et diminuant l'environnement hydrophobe près de la site catalytique, nécessaire pour hydrolyser les TG [499].

L'effet inhibiteur des composés polyphénoliques individuels varie également en fonction de l'enzyme analysée. En effet, il a été rapporté que les composés phénoliques ont un effet inhibiteur plus important sur les enzymes hydrolysant les glucides telles que l'α-glucosidase et l'α-amylase, par rapport à la lipase. Certaines propriétés enzymatiques telles que la polarité des protéines, leur structure conformationnelle, leur composition (c'est à dire leur nombre d'acides aminés polaires et hydrophobes), leur poids moléculaire ou encore les caractéristiques de la réaction (pH, température et temps d'incubation) peuvent expliquer ces différences d'efficacité [499]. Les auteurs ont montré que le CQA inhibait l'amylase mais pas la lipase [503].

Dans un autre travail antérieur, plusieurs dérivés des acides caféoylquiniques (CQA), des acides féruloylquiniques (FQA) et des acides dicaféoylquiniques (DCQA) ont présenté différentes activités anti-amylase. Il s'est avéré que plus il y avait de groupes -OH sur la structure de l'acide phénolique, plus l'inhibition était importante, ce qui était attribué à l'encombrement stérique des groupes hydroxyle. Et tandis que certaines caractéristiques structurelles semblent affecter l'effet inhibiteur comme les deux groupes hydroxyle voisins sur le cycle catéchol, d'autres comme un changement de position du groupe -OH des acides *p*-coumariques aux acides *m*-coumariques ne le font pas [504].

Concernant la lipase, il a été montré dans une étude récente que le CQA et ses isomères inhibaient l'activité de la lipase pancréatique. Cependant, les meilleurs inhibiteurs étaient les formes 3,4- et 4,5-DCQA suivies du 3,5-DCQA ; confirmant nos observations et hypothèses. Puis vint le 3-CQA et enfin le 5- et le 4-CQA. Il a donc également été observé que les dérivés de CQA plus petits présentaient une liaison moindre ou plus faible à la lipase [505]. Sinon, il a été rapporté que la liaison au complexe « enzyme-substrat » se produit lorsque des flavonoïdes tels que la quercitrine interagissent avec la cible, indiquant une inhibition de type non compétitive [506]. Un autre mode d'inhibition de type mixte a été observé pour tous les dérivés de CQA testés sur l'amylase montrant une plus grande affinité pour le complexe « enzyme-substrat » [504]. Alors que pour CQA et ses

isomères, l'inhibition était compétitive sur la lipase pancréatique. Par analyse d'amarrage moléculaire, il s'agirait d'une séquence simultanée de la liaison et de l'interaction des isomères CQA avec les résidus de la triade catalytique de lipase pancréatique (His264, Asp177 et Ser153). Enfin, les différents composés ont été stabilisés par une liaison hydrogène et une interaction hydrophobe dans la poche de liaison [505].

E CONCLUSION

Cette partie III de travaux est consacrée à la valorisation de *A. artemisiifolia* et *S. canadensis* entant qu'agents nutraceutiques naturels pour soulager diverses pathologies résultant du stress oxydatif, dont l'obésité. L'ensemble des organes des deux plantes ont montré, et ce pour la première fois sur la lipase pancréatique, des propriétés très intéressantes. Ils présentaient cependant des comportements différents sur l'enzyme. Si les activités pouvaient être comparables ou légèrement supérieures à celle du puissant médicament synthétique commercialisé *Orlistat* dans le cas d'*A. artemisiifolia*, la partie aérienne et les rhizomes de *S. canadensis* ont présentés d'impressionnants pouvoirs inhibiteurs. Les 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA, mis en avant dans la partie de travaux précédente pour leurs propriétés antioxydantes, ont également montrés un potentiel similaire à celui de l'*Orlistat*. Afin de mettre en évidence des relations structure-activité anti-lipase, les compositions phytochimiques des extraits bruts ont été étudiées et comparées entre elles. Cela a permis de confirmer la présence des deux acides phénoliques communs et prédominants dans les quatre extraits végétaux produits.

Les rhizomes de *S. canadensis* étaient de loin les plus actifs (à 100 µg/mL, 82,3% et pour *Orlistat* 11,2%) et contenaient en particulier quatre acides phénoliques prédominants (5-*O*-CQA ; 3,5-DCQA ; 3,4-DCQA et 4,5-DCQA) ainsi qu'en faible quantité de la quercitrine et autres composés minoritaires. Les dérivés de l'acide caféoylquinique ont contribué activement à son activité anti-lipase robuste. De plus, une synergie potentielle entre les acides phénoliques et le flavonol quercitrine, qui était majoritairement trouvé dans la partie aérienne de *S. canadensis*, pourrait se produire et expliquer l'intrigant pouvoir inhibiteur de cet extrait également. Des investigations complémentaires englobant des tests *in vitro*, *in vivo*, et même des essais *in silico*, devraient être menées en suivant de ces travaux pour déterminer les effets biologiques de ces plantes sur les diverses cibles digestives enzymatiques (α- et β-glucosidase, α-amylase). En particulier, il faudrait explorer les effets des deux organes d'*A. artemisiifolia* car ces parties de plantes restent très peu étudiées. Il est d'autre part important de noter que même s'il s'agit de produits naturels, l'ingestion de plantes peut présenter des risques et mettre en danger la vie des consommateurs s'ils n'ont pas été approuvés par des organismes reconnus comme médicaments.

L'ensemble de ces travaux ont donné lieu à une seconde publication scientifique dont la première page est présentée ci-après. L'utilisation des plantes exotiques envahissantes *A. artemisiifolia* et *S. canadensis* entant que nouvelles sources naturelles d'ingrédients fonctionnels (antioxydant et anti-lipase), peut ainsi constituer une nouvelle alternative thérapeutique pour une gestion durable. Des études futures *in vitro* et *in vivo* devraient être envisagées afin d'évaluer les toxicités de ces typologies d'extraits.

Food Bioscience 55 (2023) 103069

Contents lists available at ScienceDirect

Food Bioscience

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fbio

Antioxidant and anti-lipase capacities from the extracts obtained from two invasive plants: *Ambrosia artemisiifolia* and *Solidago canadensis*

Vanille Quinty [a], Rouba Nasreddine [b], Cyril Colas [b,c], Alexandra Launay [b], Reine Nehmé [b], Ali El-Khiraoui [a], Christine Piot [a], Micheline Draye [a], Emilie Destandau [b], David Da Silva [b,*], Gregory Chatel [a,**]

[a] Univ. de Savoie Mont Blanc, CNRS, Laboratoire Environnements, Dynamiques et Territoires de Montagne (EDYTEM), 73000, Chambéry, France[1]
[b] Université d'Orléans, CNRS - UMR 7311, Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), BP 6759, 45067, Orléans, Cedex 2, France[2]
[c] Université d'Orléans, CNRS - UPR 4301, Centre de Biophysique Moléculaire (CBM), 45071, Orléans, Cedex 2, France[3]

ARTICLE INFO

Keywords:
Asteraceae
Invasive plants
Antioxidants
Pancreatic lipase inhibitors
Capillary electrophoresis

ABSTRACT

Ambrosia artemisiifolia and *Solidago canadensis* are invasive plants with adverse ecological, socio-economic, and health impacts. After management operations, the plant waste can represent a definite opportunity for the circular economy. To that end, an evaluation of their chemical compositions using UHPLC-MS was carried out. We also investigated their antioxidant capacities (DPPH•, ABTS•+, CUPRAC, FRAP and iron chelation) and, for the first time, their anti-lipase properties using capillary electrophoresis. The extracts mainly contained two compounds: 5-*O*-caffeoylquinic acid and 3,5-dicafeoylquinic acids. Notably, *S. canadensis* is characterized by the presence of two additional compounds, 3,4-dicaffeoylquinic and 4,5-dicaffeoylquinic acids, which are abundant in its roots, as well as quercitrin in its aerial parts. The findings revealed significant antioxidant capacities. Specifically, with the DPPH• assay, the aerial part of *S. canadensis* exhibited stronger antioxidant activity than that of *A. artemisiifolia* at every tested concentration. At 50 μg/mL, the percentages of inhibition DPPH• were 24.3 ± 3.2% and 56.7 ± 3.4% respectively. At the same concentration, the root parts were marginally less active than the aerial parts. By HPTLC-DPPH, the main antioxidant markers were highlighted. *S. canadensis* was a better anti-lipase agent than *A. artemisiifolia* with enzymatic inhibition percentages of 82.3 ± 0.2% and 49.6 ± 5.9% respectively (at 100 μg/mL). The two acids present in all the crude extracts were tested separately as pancreatic lipase inhibitors. In conclusion, these plants could potentially be utilized for mitigating various pathologies arising from oxidative stress, including obesity.

1. Introduction

Ambrosia artemisiifolia and *Solidago canadensis*, belonging to the Asteraceae family and native to North America, are neophyte plants that have negative impacts on security, health, ecology, and socioeconomics. *A. artemisiifolia*, known for being a particularly allergenic biological pollutant, thrives primarily in disturbed open habitats. It is considered one of the most hazardous invasive plant species in Europe due to its abundant pollen production, which triggers severe allergic reactions, including respiratory, cutaneous, and ocular manifestations. Additionally, it significantly reduces agricultural yields in crops such as sunflower, soybean, and corn (Qin et al. 2013; Mihajlovic, Radosavljevic, Burazer, Smiljanic, & Cirkovic Velickovic, 2014). *S. canadensis*, another invasive plant widely spread in Europe, forms dense monospecific stands and poses a significant threat to biodiversity. With its very competitive

* Corresponding author.
** Corresponding author.
E-mail addresses: vanille.quinty@univ-smb.fr (V. Quinty), rouba.nasreddine@univ-orleans.fr (R. Nasreddine), cyril.colas@univ-orleans.fr (C. Colas), alexandra.launay@univ-orleans.fr (A. Launay), reine.nehme@univ-orleans.fr (R. Nehmé), ali.el-khiraoui@etu.univ-smb.fr (A. El-Khiraoui), christine.piot@univ-smb.fr (C. Piot), micheline.draye@univ-smb.fr (M. Draye), emilie.destandau@univ-orleans.fr (E. Destandau), david.da-silva@univ-orleans.fr (D. Da Silva), gregory.chatel@univ-smb.fr (G. Chatel).
[1] https://edytem.osug.fr.
[2] https://www.icoa.fr.
[3] http://cbm.cnrs-orleans.fr.

https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103069
Received 10 May 2023; Received in revised form 11 August 2023; Accepted 22 August 2023
Available online 24 August 2023
2212-4292/© 2023 Published by Elsevier Ltd.

IV. INFLUENCE DES PARAMETRES D'EXTRACTION SUR LES TENEURS EN ACTIFS PRINCIPAUX CHEZ *AMBROSIA ARTEMSIIFOLIA* ET *SOLIDAGO CANADENSIS*

A INTRODUCTION

Comme énoncé auparavant, aucun travail antérieur ne concernait l'étude des compositions phytochimiques des extraits d'*A. artemisiifolia* et de *S. canadensis* obtenus par macération assistée par micro-ondes (MAE) ou l'étude des paramètres d'extraction (par MAE) pouvant impacter leurs compositions phytochimiques et de ce fait leurs propriétés biologiques et teneurs en actifs. Les travaux menés dans la troisième partie de travaux, ont ainsi permis d'étudier les compositions des extraits éthanoliques bruts réalisés par MAE des organes aériens (feuilles avec tiges) et racinaires (rhizomes ou racines) ; en se rapprochant de protocoles d'extraction utilisés sur d'autres extraits végétaux [496,497]. Plusieurs composés déjà identifiés dans des extraits ou fractions divers des deux espèces ont pu être surlignés tandis que d'autres non pas pu être caractérisés.

Il a été montré également dans la troisième partie de travaux *III. C.* que les acides phénoliques 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA étaient des composés communs et prédominants dans les différents organes des deux espèces *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*. Leurs proportions relatives variaient néanmoins d'un organe à l'autre. Malgré ces ressemblances, les divers organes ont eu des comportements différents sur les cibles enzymatiques évaluées (voir la première partie des travaux *I. D.* et la troisième partie des travaux *III. B.*. Le *Tableau 10* ci-après récapitule les données obtenues antérieurement dans ces travaux. Les extraits souvent en tête de classement ou à la dernière place étaient ceux de la partie aérienne d'*A. artemisiifolia* et des rhizomes de *S. canadensis*.

Tableau 10. Classements résumés des extraits bruts d'Ambrosia artemisiifolia et de Solidago canadensis sur les cibles dermo-cosmétique et nutraceutique évaluées dans la première partie des travaux I. D. et la troisième partie des travaux III. B. Respectivement en vert et gris, le meilleur et le moins bon inhibiteur. Les proportions relatives des standards d'acides

Activité résiduelle considérée	***Hyaluronidase (à 100 µg/mL)***			
Classements des EB (EtOH) + - →	Rhizomes de *S. canadensis*	Partie aérienne d'*A. artemisiifolia*	Racines d'*A. artemisiifolia*	Partie aérienne de *S. canadensis*
Proportions relatives en 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA	3,5-DCQA > 5-*O*-CQA	5-*O*-CQA = 3,5-DCQA	3,5-DCQA > 5-*O*-CQA	5-*O*-CQA > 3,5-DCQA
Comportements des standards	3,5-DCQA > 5-*O*-CQA			

Activité résiduelle considérée	***Tyrosinase (à 100 µg/mL)***			
Classements des EB (EtOH) + - →	Partie aérienne d'*A. artemisiifolia*	Racines d'*A. artemisiifolia*	Partie aérienne de *S. canadensis*	Rhizomes de *S. canadensis*
Proportions relatives en 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA	5-*O*-CQA = 3,5-DCQA	3,5-DCQA > 5-*O*-CQA	5-*O*-CQA > 3,5-DCQA	3,5-DCQA > 5-*O*-CQA
Comportements des standards	5-*O*-CQA = 3,5-DCQA			

Activité résiduelle considérée	***Elastase (à 100 µg/mL)***			
Classements des EB (EtOH) + - →	Partie aérienne d'*A. artemisiifolia*	Partie aérienne de *S. canadensis*	Racines d'*A. artemisiifolia*	Rhizomes de *S. canadensis*
Proportions relatives en 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA	5-*O*-CQA = 3,5-DCQA	5-*O*-CQA > 3,5-DCQA	3,5-DCQA > 5-*O*-CQA	3,5-DCQA > 5-*O*-CQA
Comportements des standards	5-*O*-CQA > 3,5-DCQA			

Activité résiduelle considérée	***Lipase (à 100 µg/mL)***			
Classements des EB (EtOH) + - →	Rhizomes de *S. canadensis*	Partie aérienne de *S. canadensis*	Racines d'*A. artemisiifolia*	Partie aérienne d'*A. artemisiifolia*
Proportions relatives en 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA	3,5-DCQA > 5-*O*-CQA	5-*O*-CQA > 3,5-DCQA	3,5-DCQA > 5-*O*-CQA	5-*O*-CQA = 3,5-DCQA
Comportements des standards	5-*O*-CQA = 3,5-DCQA			

Activité résiduelle considérée	***Collagénase (à 100 µg/mL)***			
Classements des EB (EtOH) + - →	Rhizomes de *S. canadensis*	Partie aérienne de *S. canadensis*	Racines d'*A. artemisiifolia*	Partie aérienne d'*A. artemisiifolia*
Proportions relatives en 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA	3,5-DCQA > 5-*O*-CQA	5-*O*-CQA > 3,5-DCQA	3,5-DCQA > 5-*O*-CQA	5-*O*-CQA = 3,5-DCQA
Comportements des standards	5-*O*-CQA > 3,5-DCQA			

Partie aérienne composée de feuilles et tiges.
EB = extrait brut. EB obtenus par macération assistée par ultrasons (hyaluronidase, élastase, collagénase, tyrosinase) et par macération assistée par micro-ondes (lipase).

A la lecture de ce *Tableau 10*, trois hypothèses peuvent être émises pouvant favoriser les efficacités des extraits : i) pour que l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* ait une efficacité accrue sur l'élastase et la tyrosinase, il faudrait que 5-*O*-CQA ≥ 3,5-DCQA en terme de proportions relatives ii) il faudrait que 5-*O*-CQA > 3,5-DCQA (en se basant sur le comportement des standards testés séparément) pour que l'extrait de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* soit plus efficace contre la collagénase ; et iii) afin que l'extrait de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* soit un meilleur candidat sur la lipase, il faudrait que 3,5-DCQA > 5-*O*-CQA (en se basant sur le meilleur candidat soit l'extrait de rhizomes de *S. canadensis*).

Plusieurs paramètres se rapportant à la MAE peuvent affecter sa qualité et son efficacité, c'est pourquoi ils doivent être adaptés de façon judicieuse selon les objectifs recherchés [379,382,507–511]. Cette quatrième partie de travaux se consacre ainsi à l'étude des paramètres d'extraction pouvant influencer les quantités d'extractibles (rendement d'extraction) des deux plantes et plus particulièrement les teneurs en actifs principaux (5-*O*-CQA et 3,5-DCQA) des extraits d'*A. artemisiifolia* (partie aérienne) et *S. canadensis* (rhizomes) produits pouvant impacter les activités biologiques visées pour ces EVEE. Pour cela, la méthodologie des plans d'expérience pour surfaces de réponse a été employée [406,507–509,512,513].

La méthodologie du plan d'expérience sert à l'optimisation du choix et de l'organisation/enchaînement des essais expérimentaux. Elle est aussi utile à la visualisation de l'évolution et du niveau d'influence des réglages réalisables des paramètres influents sélectionnés au préalable [403,406]. Ceci visant à acquérir le maximum d'informations avec le moins d'essais et la meilleure précision possible sur les réponses calculées selon le modèle choisi [402]. Il s'agit d'une démarche rigoureuse qui implique de suivre scrupuleusement les règles établies mathématiquement et qui peut s'avérer plutôt rapide (trois à quatre fois plus efficaces que les démarches habituelles de conduite d'essais pour des résultats identiques) à un moindre coût.

Dans le cadre de ces travaux, deux plans d'expériences (un par organe) pour surfaces de réponse ont été mis en place pour déterminer les effets de plusieurs paramètres expérimentaux (quatre facteurs par plan d'expérience), sur la quantité de matière extraite et/ou les teneurs en actifs principaux (réponses). Les informations recueillies avec les plans d'expériences ont été mises en relation avec les hypothèses mentionnées au-dessus sur les activités biologiques des extraits bruts. L'objectif était alors d'identifier les paramètres optimaux de la MAE permettant d'enrichir les extraits en actifs (5-*O*-CQA et 3,5-DCQA) tout en modulant leur abondance relative.

B. CONSTRUCTION DU PLAN D'EXPERIENCES

1. DETERMINATION DES PARAMETRES EXPERIMENTAUX (FACTEURS) ET DE LEURS DOMAINES D'ETUDE

Pour le premier plan d'expérience, les quatre facteurs pris en compte dans les optimisations sont la ♦1puissance d'irradiation, le ♦2nombre de cycles d'extraction et par conséquent le temps d'extraction, la ♦3composition du solvant (seul ou en mélange) ainsi que son ♦4volume, modulant le ratio matrice végétale/solvant(s). L'organe choisi pour ce plan correspond aux parties aériennes d'*A. artemisiifolia* et plus précisément aux rassemblements des parties aériennes des surfaces de prélèvement 1 à 10 d'Hauteluce (voir *Tableau 11*). Pour le second plan d'expérience, ont été étudiés les trois mêmes derniers facteurs et la ♦5température. L'organe choisi pour ce second plan correspond aux rhizomes de *S. canadensis* et plus précisément aux rassemblements des rhizomes des surfaces de prélèvement 1 à 10 de Veigy-Foncenex (voir *Tableau 11*).

Le domaine d'étude de la ♦1puissance d'irradiation a été choisi pour couvrir l'intégralité de la gamme disponible sur l'appareil micro-ondes employé soit de 200 à 1 000 W. Un ♦2cycle d'extraction équivaut à 30 s, comme cela était le cas dans les conditions initiales choisies en corrélation avec les études antérieures menées sur diverses matrices végétales [496,497]. Aucune surpression n'a été remarquée durant le temps d'irradiation, n'indiquant de ce fait pas de perte de matière. Afin de ne pas excéder une demi-heure d'extraction, le nombre de cycles d'extraction a été arrêté à 5, espacés d'une période de refroidissement de 5 min. A la fin du dernier cycle suivi des 5 min de descente en température, 1 min de ventilation est ajoutée avant ouverture du four. Soit donc pour cinq cycles consécutifs, un temps total d'extraction de 28,5 min (<30 min). La ♦3composition du solvant correspondait à un mélange de deux solvants éco-compatibles (EtOH et H_2O) couvrant le domaine d'étude 0 à 100% en terme de pourcentage volumique d'H_2O dans le mélange H_2O/EtOH. Le ♦4volume de solvant variait entre 5 mL et 25 mL permettant alors d'avoir des ratios matrice végétale/solvant(s) entre 5 $g.mL^{-1}$ et 25 $g.mL^{-1}$. Cette gamme de volume assurait par ailleurs une immersion suffisante de l'organe broyé durant l'entièreté de l'opération. Enfin, l'étendue de variation de la ♦5température mesurée dans le réacteur était compris entre 20 °C et 100 °C. Les points d'ébullition de l'H_2O pure et de l'EtOH pur sont respectivement de 100 °C et de 78,5 °C, un mélange des deux solvants boue à une certaine température dans cet intervalle. Le système étant de plus fermé, il est possible de travailler à des températures supérieures au point d'ébullition du solvant pouvant potentiellement améliorer les rendements d'extraction. La limite haute a été choisie pour éviter d'éventuelles dégradations/isomérisation et autres modifications chimiques des composés phénoliques ciblés [496].

Le *Tableau 11* ci-après résume les facteurs et domaine d'étude choisis.

*Tableau 11. Facteurs et domaine d'étude pour les deux plans d'expériences réalisés. *= 4ème facteur du premier plan et ** = 4ème facteur du second plan.*

	Nb de cycle(s)	V (mL)	Proportion eau dans EtOH	Puissance* (W)	Température** (°C)
Niveau (-α)	1	5	0	200	40
Niveau (-1)	2	10	25	400	45
Niveau (-0)	3	15	50	600	50
Niveau (+1)	4	20	75	800	55
Niveau (+α)	5	25	100	1000	60

α = 2

Les paramètres fixes étaient alors la nature de l'organe, la masse d'organe séché par réacteur soit 1 g, la granulométrie de la matrice soit 0,5 mm et la température soit 45 ° (+/- 5 °C) ou la puissance d'irradiation soit 700 W selon le plan d'expérience considéré.

Les incompatibilités physiques d'association de niveaux entre les facteurs ont été écartées pour que la construction du plan d'expérience puis la réalisation des essais ne soient pas impossibles. Les expériences ont été randomisées au moyen du logiciel statistique *Ellistat*, de ce fait effectuées en respect de l'ordre aléatoire donné afin de minimiser des contraintes extérieures inconnues. Les matrices expérimentales des deux plans, détaillant les conditions expérimentales de chaque essai sont présentées dans la partie expérimentale *Tableaux 14* et *15*.

2. EVALUATION DE LA QUANTITE EXTRAITE ET DES TENEURS EN ACTIFS PRINCIPAUX (REPONSES)

Quatre grandeurs d'intérêt (Y_1 à Y_4) ou *réponses* ont été mesurées pour les optimisations de la MAE et exprimées quantitativement. La première réponse (Y_1) était le rendement d'extraction permettant d'estimer la masse de métabolites extraits (g) à partir d'un gramme de matière végétale engagé. La quantité extraite était suffisante pour rendre l'opération répétable. Les trois autres réponses mesurées correspondaient aux teneurs en actifs (5-*O*-CQA ou 3,5-DCQA) déterminés en amont et calculées à partir des données obtenues *via* l'analyse UHPLC-UV/ESI-TQ-MS des extraits. Ainsi, la seconde réponse (Y_2) correspondait à la teneur en actif 5-*O*-CQA et la troisième réponse (Y_3) à la teneur en actif 3,5-DCQA. Enfin la quatrième et dernière réponse (Y_4) était la somme des aires des deux acides phénoliques 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA. Seuls ces deux actifs principaux majoritaires des extraits et fonctionnant sur un maximum de cibles dermo-cosmétique et nutraceutique ont été pris en compte dans cette évaluation. Pour chacune des réponses, c'est la moyenne des *triplicatas* qui a été considérée. Les gammes utilisées pour la quantification des deux molécules sont données dans la partie expérimentale *Annexe 8*. L'ensemble des réponses mesurées ont été intégrées aux matrices expérimentales (voir *Annexe 9*).

C. EFFETS DES PARAMETRES D'EXTRACTION

1. REPRESENTATIVITE DES REPONSES

Le logiciel statistique *Ellistat* a permis l'interprétation des données et la création des régressions polynomiales modélisant les différentes réponses (en prenant en compte les termes linéaires et quadratiques). La régression se veut simplifiée afin de surligner les facteurs qui sont les plus impactants. Les termes non significatifs, c'est à dire pour lesquels $p > 0,05$, n'ont pas été retenus et ont été éliminés. L'élimination des termes s'est fait dans un ordre décroissant d'importance : du terme le moins significatif (avec une *p* élevée) au plus significatif (avec une *p* la plus faible possible). Les coefficients de régression polynomiale pour *A. artemisiifolia* sont donnés dans le *Tableau 12* et pour *S. canadensis* dans le *Tableau 13*. Ces *Tableaux 12 et 13* regroupent également les coefficients de corrélation multiple (R^2, $R^{2ajusté}$ et $R^{2prévu}$) compris entre 0 et 1 ainsi que les équations obtenues pour chacune des réponses (Y_1 à Y_4).

Concernant les coefficients de régression polynomiale : si son signe est « - », cela veut dire que l'augmentation du niveau de la variable considérée conduit à une correction défavorable de la réponse considérée. Si au contraire, son signe est « + », cela veut dire que l'augmentation du niveau de la variable considérée conduit à une correction positive de la réponse considérée. D'autre part, plus un coefficient possède une valeur absolue haute, plus l'effet de la variable considérée sur la réponse considérée est haute.

Tableau 12. Coefficients de régression polynomiale obtenus fonction des variables pour la modélisation des réponses Y1 à Y4 à partir de partie aérienne d'A. artemisiifolia. Les termes non-significatifs (p > 0,05) ont été exclus. Les équations correspondantes sont données en bas du tableau. p ≤ 0,001 en gris et p ≤ 0,002 en orange.

Variable considérée	**Coefficients de régression polynomiale**			
	Partie aérienne d'Ambrosia artemisiifolia (feuilles et tiges)			
	Rendement d'extraction (Y_1)	Teneur en 5-*O*-CQA (Y_2)	Teneur en 3,5-DCQA (Y_3)	Somme des aires des 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA (Y_4)
Constante				
Puissance (W)	-0,039	0,401	0,161	1265,900
Nb de cycle(s)				
V (mL)	1,710	17,303	8,820	60097,200
Proportion d'eau dans EtOH	0,374	5,301		11047,800
Puissance (W)*Puissance (W)	3,40E-05	-3,13E-04	-1,28E-04	-9,94E-01
Nb de cycle(s)*Nb de cycle(s)				
V (mL)*V (mL)	-0,040	-0,597	-0,294	-2046,790
Proportion d'eau dans EtOH* Proportion d'eau dans EtOH	-0,002	-0,082	-0,013	-207,437
R^2	0,91	0,92	0,95	0,94

$R^{2\ ajusté}$	0,89	0,91	0,94	0,92
$R^{2\ prévu}$	0,77	0,81	0,89	0,83
nb ddl	25	25	26	25
S	1,72	26,53	7,71	74230,38
Y_1 = Rendement (%) = - 0,039*Puissance (W) + 1,710*V (mL) + 0,374*Proportion eau dans EtOH + 3,40E-05*Puissance (W)*Puissance (W) - 0,040*V (mL)*V (mL) - 0,002*Proportion eau dans EtOH*Proportion eau dans EtOH				
Y_2 = Teneur en 5-*O*-CQA (µg/mL) = + 0,401*Puissance (W) + 17,303*V (mL) + 5,301*Proportion eau dans EtOH - 3,13E-04*Puissance (W)*Puissance (W) - 0,597*V (mL)*V (mL) - 0,082*Proportion eau dans EtOH*Proportion eau dans EtOH				
Y_3 = Teneur en 3,5-DCQA (µg/mL) = + 0,161*Puissance (W) + 8,820*V (mL) - 1,28E-04*Puissance (W)*Puissance (W) - 0,294*V (mL)*V (mL) - 0,013*Proportion eau dans EtOH*Proportion eau dans EtOH				
Y_4 = SOMME Aires (5-*O*-CQA+3,5-DCQA) = + 1269,900*Puissance (W) + 6,0097,200*V (mL) + 11047,800*Proportion eau dans EtOH - 9,94E-01*Puissance (W)*Puissance (W) - 2046,790*V (mL)*V (mL) - 207,437*Proportion eau dans EtOH*Proportion eau dans EtOH				

Tableau 13. Coefficients de régression polynomiale obtenus fonction des variables pour la modélisation des réponses Y1 à Y4 à partir de partie racinaire de S. canadensis. Les termes non-significatifs (p > 0,05) ont été exclus. Les équations correspondantes sont données en bas du tableau. p ≤ 0,001 en gris, p < 0,05 en orange et p ≤ 0,01 en vert.

Variable considérée	**Coefficients de régression polynomiale**			
	Rhizomes de Solidago canadensis			
	Rendement d'extraction (Y_1)	Teneur en 5-*O*-CQA (Y_2)	Teneur en 3,5-DCQA (Y_3)	Somme des aires des 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA (Y_4)
Constante				
Température (°C)	-0,735	0,937	2,089	
Nb de cycle(s)				
V (mL)	2,192			16722,600
Proportion d'eau dans EtOH	0,460	0,712		2904,810
Température (°C)*Température (°C)	0,009		-0,015	54,396
Nb de cycle(s)*Nb de cycle(s)	0,102			
V (mL)*V (mL)	-0,061			-599,695
Proportion d'eau dans EtOH* Proportion d'eau dans EtOH	-0,003	-0,013	-0,007	-60,538
R^2	0,95	0,75	0,84	0,76
$R^{2\ ajusté}$	0,94	0,73	0,83	0,73
$R^{2\ prévu}$	0,90	0,40	0,75	0,45
nb ddl	24	28	28	26

S	1,32	8,88	7,85	47512,57
Y_1 = Rendement* (%) = - 0,735*Température (°C) + 2,192*V (mL) + 0,460*Proportion eau dans EtOH + 0,009*Température (°C)*Température (°C) + 0,102*Nb de cycle(s)*Nb de cycle(s) - 0,061*V (mL)*V (mL) - 0,003*Proportion eau dans EtOH*Proportion eau dans EtOH				
Y_2 = Teneur en 5-*O*-CQA (µg/mL) = + 0,937*Température (°C) + 0,712*Proportion eau dans EtOH - 0,013*Proportion eau dans EtOH*Proportion eau dans EtOH				
Y_3 = Teneur en 3,5-DCQA (µg/mL) = + 2,089*Température (°C) - 0,015*Température (°C)*Température (°C) - 0,007*Proportion eau dans EtOH*Proportion eau dans EtOH				
Y_4 = SOMME Aires (5-*O*-CQA+3,5-DCQA) = + 1,672E+04*V (mL) + 2905*Proportion eau dans EtOH + 54,4*Température (°C)*Température (°C) - 599,7*V (mL)*V (mL) - 60,54*Proportion eau dans EtOH*Proportion eau dans EtOH				

Pour les deux plans d'expériences pour surfaces de réponse, la constante n'a jamais été prise en compte dans les régressions car il s'agissait d'un terme avec une $p > 0,05$ dans chacun des cas.

Pour le plan d'expérience relatif à *A. artemisiifolia* (*Tableau 12*), les $R^{2ajusté}$ ajustés pour les quatre réponses Y_1 à Y_4 sont respectivement 0,89 ; 0,91 ; 0,94 et 0,92 ; signifiant que les régressions modélisées permettent d'expliquer respectivement 89 ; 91 ; 94 et 92% des réponses expérimentales. Quelles que soient les réponses observées *Tableau 12*, le nombre de cycles et l'interaction quadratique nombre de cycles* nombre de cycles n'ont pas d'effets significatifs sur les réponses en comparaison des trois autres facteurs. La proportion en eau de plus, n'affecte que très peu la teneur en 5-*O*-CQA. Pour le plan d'expérience relatif à *S. canadensis* (*Tableau 13*), les $R^{2ajusté}$ ajustés pour les quatre réponses Y_1 à Y_4 sont respectivement 0,95 ; 0,75 ; 0,84 et 0,78 ; signifiant que les régressions modélisées permettent d'expliquer respectivement 95 ; 75 ; 84 et 78% des réponses expérimentales. Dans le *Tableau 13*, la réponse Y_1 suit la même logique que pour *A. artemisiifolia.* En effet excepté le nombre de cycles, l'ensemble des autres facteurs a une influence sur les différentes réponses. Les réponses Y_2 à Y_4 sont uniquement influencées par la température et la proportion en eau.

Dans les quatre sections suivantes, les diagrammes de surfaces de réponse pour les réponses Y_1 à Y_4 dans le cas d'*A. artemisiifolia*, sont présentés dans les *Figures 90, 92, 94 et 96* et ceux dans le cas de *S. canadensis* dans les *Figures 91, 93, 95 et 97*. Les résultats des *Tableaux 12 et 13* y sont également discutés en fonction de la réponse considérée.

2. FACTEURS D'INFLUENCE DU RENDEMENTS D'EXTRACTION

Les diagrammes de surface de réponse pour la réponse Y_1 à savoir le rendement d'extraction en % dans le cas d'*A. artemisiifolia*, sont présentés *Figure 90*. Ceux correspondant à *S. canadensis* sont donnés *Figure 91*.

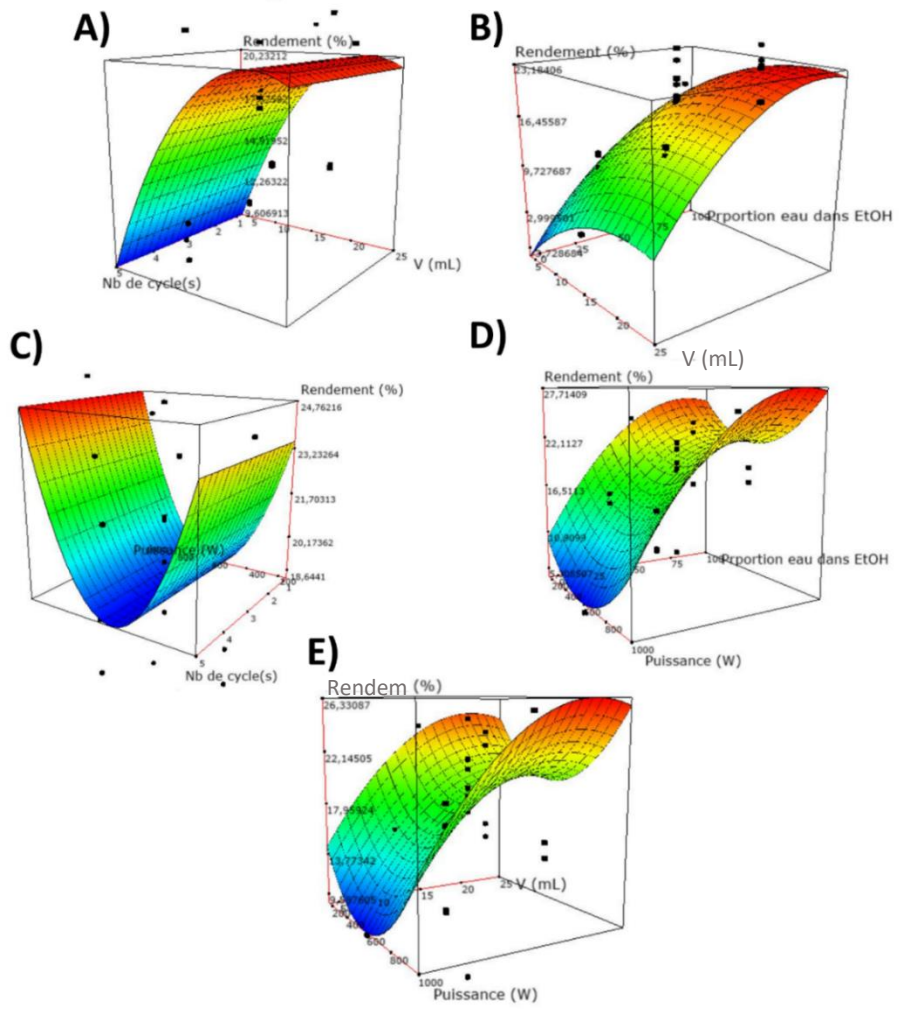


Figure 90. Diagrammes de surface de réponses des rendements d'extraction (en %) à partir de de partie aérienne d'Ambrosia artemisiifolia en fonction des niveaux des principaux paramètres de MAE.

Chez *A. artemisiifolia*, d'après la régression linéaire multiple obtenue Y1 et les différentes valeurs des coefficients affectés aux facteurs (*Tableau 12*), le rendement d'extraction est notamment influencé par trois des quatre facteurs étudiés c'est-à-dire, par ordre d'importance le volume (mL) de solvant en contact avec 1 g de matière sèche (coefficient de 1,710), la proportion en eau du solvant (coefficient de 0,374) et enfin par la puissance d'irradiation (W) apposée (coefficient de -0,039). Le nombre de cycles réalisés a quant à lui peu d'effets sur le rendement d'extraction. Il convient de noter également que les interactions quadratiques Puissance (W)*Puissance (W) ; V (mL)*V (mL) et Proportion d'eau dans EtOH* Proportion d'eau dans EtOH ont toujours une influence sur la réponse étudiée. Ainsi, l'analyse des divers diagrammes de surface de réponse *Figure 90*, révèle

que plus le volume et la proportion en eau de solvant augmentent, meilleur est le rendement (*Figure 90, A et B*) et que la puissance peut avoir des effets défavorables (*Figure 90, C-E*). Les rendements obtenus étaient compris entre 4,46% et 25,49%. Le rendement le pus faible correspond à celui de l'extrait éthanolique et le plus fort l'extrait produit avec la pussance maximale de 1000 W (la plus haute testée). Pour maximiser le rendement d'extraction, il faudrait être dans les conditions suivantes (prédiction réalisée avec le logiciel) : puissance de 1000 W (valeur la plus haute), 1 cycle de 30 s (temps le plus court), un volume de 21,6 mL et une proportion en eau de 86,2.

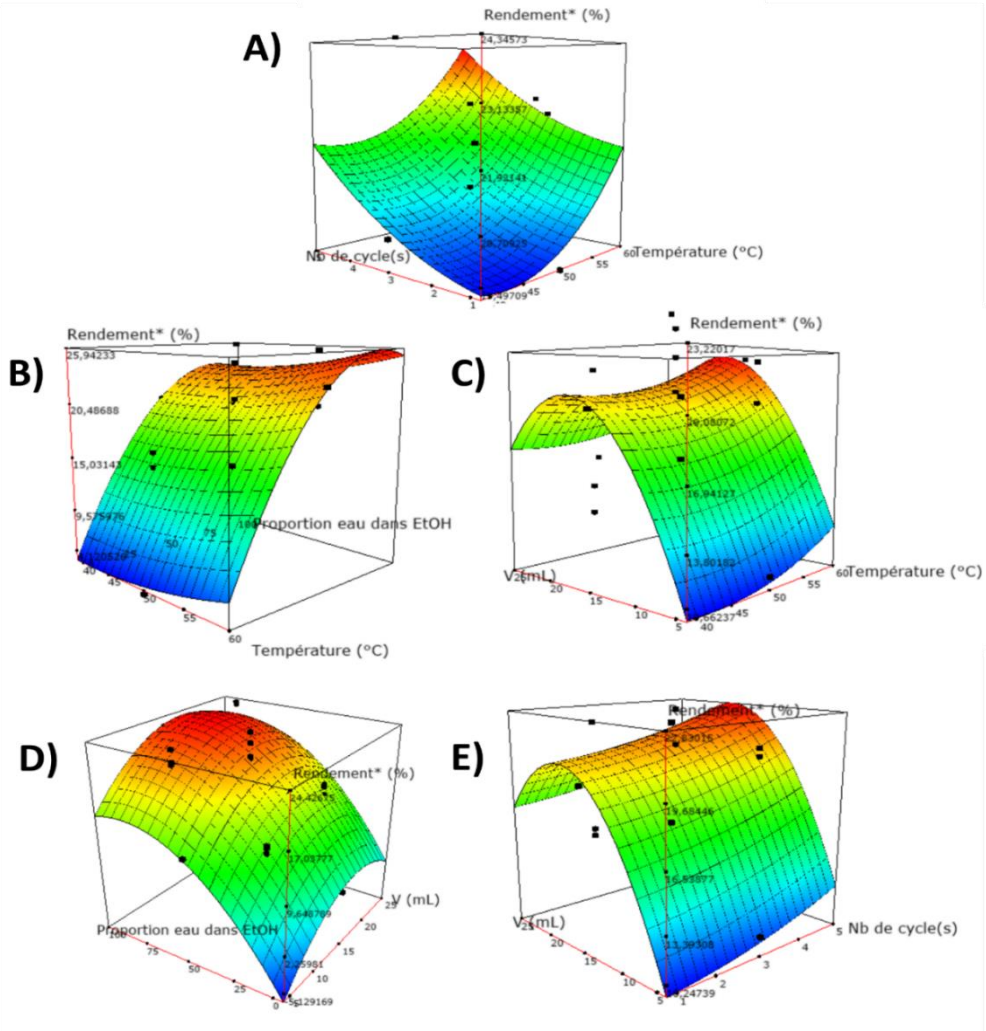


Figure 91. Diagrammes de surface de réponses des rendements d'extraction (en %) à partir de partie racinaire de Solidago canadensis en fonction des niveaux des principaux paramètres de MAE.

Chez *S. canadensis*, d'après la régression linéaire multiple obtenue Y_1 et les différentes valeurs des coefficients affectés aux facteurs (*Tableau 13*), le rendement d'extraction est notamment influencé par trois des quatre facteurs étudiés c'est-à-dire, par ordre d'importance le volume de solvant en contact avec 1 g de matière sèche (coefficient de 2,192), la proportion en eau du solvant (coefficient de 0,460) et enfin par la température (coefficient de -0,039). Le nombre de cycles réalisés a quant à lui moins d'effets sur le rendement d'extraction. Les termes quadratiques ont eux aussi tous une influence sur cette réponse. Ainsi, les diagrammes *Figure 91*, révèlent que plus la température, le nombre de cycles et la proportion en eau augmentent, meilleur est le

rendement (*Figure 91, A et B*) et que le volume a une influence forte (*Figure 91, C-E*). Les rendements obtenus étaient compris entre 3,79% et 26,09%. Pour maximiser le rendement d'extraction, il faudrait être dans les conditions suivantes (prédiction réalisée avec le logiciel) : température de 60 °C (la plus haute), 5 cycles de 30 s (temps le plus long), un volume de 18,1 mL et une proportion en eau de 82,8.

Si les deux plans d'expériences sont comparés, l'organe en lui-même a peu d'influence sur la réponse mais les paramètres liés à l'équipement sont primordiaux à étudier. La proportion H_2O/EtOH est importante a considérée : l'eau ajoutée à l'éthanol permet d'extraire une plus large gamme de composés et ainsi d'obtenir des rendements d'extraction plus élevés. Une température (ou une puissance) élevée permet d'augmenter le rendement. Chez *A. artemisiifolia*, un temps court d'extraction a amélioré le rendement tandis que chez S. canadensis, plus le temps d'extraction était important, meilleur était le rendement d'extraction.

Les résultats acquis rejoignent ceux d'autres travaux antérieurs menés sur des végétaux divers [509,512,514,515]. Ils rapportent en effet qu'une augmentation du temps et de la température d'extraction était associée à une amélioration de l'efficacité de l'extraction [509,512,514,515]. L'effet de la température était par ailleurs plus visible lorsque le temps d'extraction était plus long [514]. Les micro-ondes provoquent une augmentation de la diffusivité du solvant et de la solubilité des composés, ainsi qu'une diminution de la viscosité du solvant, ce qui a un effet positif sur l'efficacité de l'extraction [509]. Dans cette étude sur le café torréfié [514], la température était le facteur le plus prépondérant (comportement non linéaire) par rapport au temps d'extraction et au ratio matrice/solvant. Il était également montré que plus le ratio matrice/solvant était élevé, plus la quantité d'extractibles l'était également. Dans cet autre travail réalisé sur des déchets d'*Achillea millefolium* [509], la puissance des micro-ondes avait également un effet positif sur le rendement d'extraction tandis que le ratio matrice/solvant et la concentration en éthanol ont eu des effets négatifs. Les auteurs de ce travail effectué sur *Hibiscus sabdariffa* [515] avaient montré que le rendement d'extraction augmentait en augmentant le pourcentage d'éthanol dans le solvant jusqu'à un maximum, puis diminuait. En effet, bien que le mélange EtOH/H_2O ait une bonne capacité d'absorption des micro-ondes et chauffe donc plus rapidement améliorant ainsi l'efficacité de l'extraction, des pourcentages plus élevés d'éthanol entraînent une diminution de la constante diélectrique et une augmentation du facteur de dissipation ; et par conséquent le rendement d'extraction obtenu est plus faible.

3. TENEURS EN 5-*O*-CQA

Les diagrammes de surface de réponse pour la réponse Y_2 à savoir la teneur en 5-*O*-CQA en µg/mL dans le cas d'*A. artemisiifolia*, sont présentés *Figure 92*. Ceux correspondant à *S. canadensis* sont donnés *Figure 93*.

Chez *A. artemisiifolia*, d'après la régression linéaire multiple obtenue Y_2 et les différentes valeurs des coefficients affectés aux facteurs (*Tableau 12*), la teneur en 5-*O*-CQA est grandement et positivement influencée par le volume (mL) de solvant en contact avec 1 g de matière sèche (coefficient de 17,303), la proportion en eau

du solvant (coefficient de 5,301) et enfin par la puissance d'irradiation (W) apposée (coefficient de 0,401) dans cet ordre d'importance. Le nombre de cycles réalisés traduisant la durée du processus d'extraction a quant à lui peu d'effets sur la teneur en 5-*O*-CQA. Les termes quadratiques jouent également un rôle d'influence sur la réponse et ont des effets légèrement défavorables (tous les coefficients sont de signe « - »). Ainsi, l'analyse des diagrammes de surface *Figure 92*, montre des courbes prononcées dans la plupart des cas (*Figure 92, A-E*). Les teneurs en 5-*O*-CQA obtenues étaient comprises entre 0 et 335 µg/mL. Pour maximiser la teneur en cet acide phénolique, il faudrait être dans les conditions suivantes (prédiction réalisée avec le logiciel) : puissance de 641 W, 1 cycle de 30 s (temps le plus court), un volume de 14,7 mL et une proportion en eau de 31,0.

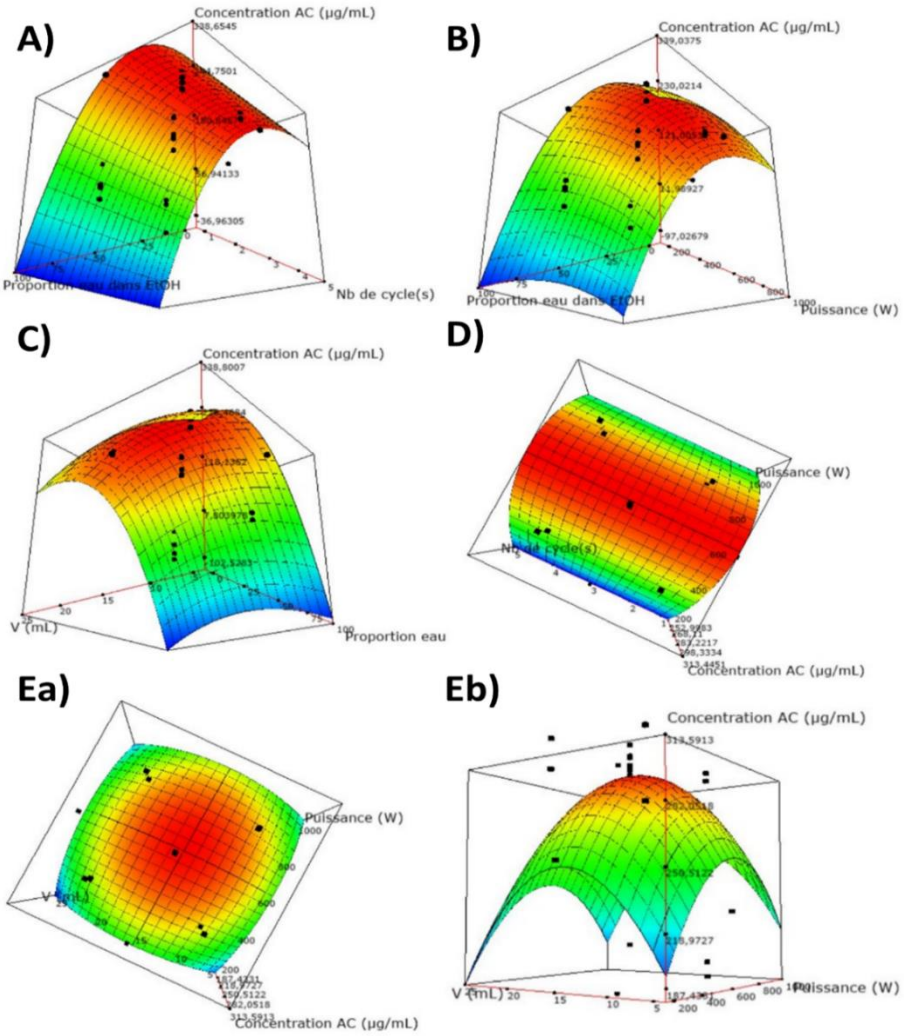


Figure 92. Diagrammes de surface de réponses des teneurs en 5-O-CQA (en µg/mL ; = concentration AC) à partir de de partie aérienne d'Ambrosia artemisiifolia en fonction des niveaux des principaux paramètres de MAE.

Chez *S. canadensis*, d'après la régression linéaire multiple obtenue Y_2 et les différentes valeurs des coefficients affectés aux facteurs (*Tableau 13*), la teneur en 5-*O*-CQA n'est affectée que par deux des quatre facteurs étudiés c'est-à-dire, par ordre d'importance la température (coefficient de 0,937) et la proportion en eau (coefficient de 0,712). De plus, seul le terme quadratique Proportion d'eau dans EtOH* Proportion d'eau dans

EtOH a une influence défavorable sur la réponse. Ainsi, les diagrammes *Figure 93*, révèlent que plus la température augmente, meilleure est la réponse (*Figure 93, A et E*) et que le volume et la proportion en eau ont une forte influence (*Figure 93, B-D*). Les teneurs en 5-*O*-CQA obtenues étaient comprises entre 4 et 78 µg/mL. Pour maximiser la teneur en cet acide phénolique, il faudrait être dans les conditions suivantes (prédiction réalisée avec le logiciel) : température de 60 °C (la plus élevée), 1 cycle de 30 s (le plus court), un volume de 5 mL (le plus faible) et une proportion en eau de 27,6.

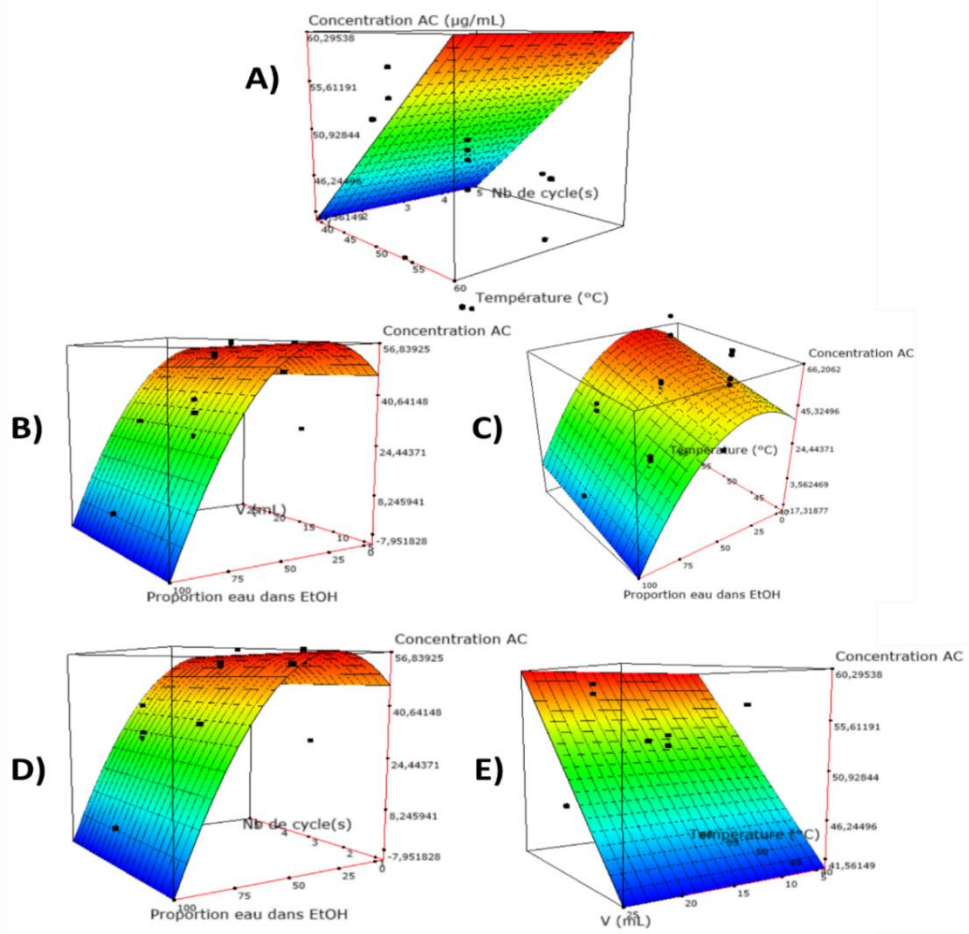


Figure 93. Diagrammes de surface de réponses des teneurs en 5-O-CQA (en µg/mL ; = concentration AC) à partir de partie racinaire de Solidago canadensis en fonction des niveaux des principaux paramètres de MAE.

Dans les deux cas, la proportion en eau ajoutée à l'EtOH ne doit pas dépasser les 30% pour extraire le maximum de 5-*O*-CQA. Le temps d'extraction et le volume de solvant nécessaires sont relativement faibles pour son extraction, ce qui est intéressant en terme d'économies d'énergie et de consommation de solvants. Plus la température est élevée, meilleure est l'extraction du 5-*O*-CQA.

Nos résultats rejoignent ceux d'autres études antérieures de même type menés sur des végétaux divers [512,516]. Dans cette étude visant à optimiser les conditions d'extraction (par lixiviation) du 5-*O*-CQA à partir d'un sous-produit du café vert (*Coffea arabica*), il a été observé qu'une augmentation de la température et un faible ratio matrice/solvant améliorait le rendement en 5-*O*-CQA. Les conditions optimales pour l'extraction de cet acide

phénolique étaient une température de 60 °C, un intervalle de temps de 45 min, un ratio matrice/solvant de 25 mg/mL et une composition de solvant EtOH/H_2O (50/50 ; *v/v*). Par ailleurs, une augmentation de 54% du rendement en 5-*O*-CQA avait été observée lorsque la température passait de 45 °C à 75 °C [512]. L'énergie d'activation du 5-*O*-CQA était inférieure à 10 kJ/mol indiquant un processus d'extraction de la matrice au liquide contrôlé notamment par diffusion [512]. Dans ce travail antérieur où il était question d'optimiser les conditions de macération agitée afin d'améliorer la teneur en un autre acide caffeoylquinique proche (3-*O*-CQA)[516], il était montré que son extraction était plus efficace avec le mélange EtOH/H_2O qu'avec les solvants purs à 30 °C. Il y avait également une amélioration du rendement en 3-*O*-CQA lorsque l'eau à haute température a été utilisée. Enfin, Le 5-*O*-CQA est un composé thermorésistant qui pourrait être extrait à une plage de températures plus élevée [512]. Il faudrait cependant tenir compte que certaines substances importantes biologiquement actives présentes également dans les extraits des EVEE pourraient être dégradées à des températures plus hautes tel que le 3,5-CQA [496,512].

4. TENEURS EN ACIDE 3,5-DCQA

Les diagrammes de surface de réponse pour la réponse Y_3 à savoir la teneur en 3,5-DCQA en µg/mL dans le cas d'*A. artemisiifolia*, sont présentés *Figure 94*. Ceux correspondant à *S. canadensis* sont donnés *Figure 95*.

Chez *A. artemisiifolia*, d'après la régression linéaire multiple obtenue Y_3 et les différentes valeurs des coefficients affectés aux facteurs (*Tableau 12*), la teneur en 3,5-DCQA est positivement influencée par le volume (coefficient de 8,820) et la puissance d'irradiation (coefficient de 0,161), dans cet ordre d'importance. Les termes quadratiques Puissance (W)*Puissance (W), Proportion d'eau dans EtOH* Proportion d'eau dans EtOH et V (mL)*V (mL) ont également des effets défavorables sur la réponse car tous sont de signe négatif. L'analyse des diagrammes de surface *Figure 94*, rend compte de courbes prononcées quand il s'agit de la puissance et de la proportion en eau (*Figure 94, A-C, E et F*) et que plus la proportion en eau diminue plus il a de 3,5-DCQA. Les teneurs en 3,5-DCQA obtenues étaient comprises entre 5 et 108 µg/mL. Pour maximiser la teneur en cet acide phénolique, il faudrait être dans les conditions suivantes (prédiction réalisée avec le logiciel) : puissance de 641 W, 1 cycle de 30 s (le plus court), un volume de 14,7 mL et une proportion en eau nulle.

Chez *S. canadensis*, d'après la régression linéaire multiple obtenue Y_3 et les différentes valeurs des coefficients affectés aux facteurs (*Tableau 13*), la teneur en 3,5-DCQA n'est affectée que par la température (coefficient de 2,089). Les termes quadratiques Température (°C)*Température (°C) et Proportion d'eau dans EtOH* Proportion d'eau dans EtOH ont d'autre part des effets défavorables sur la réponse. En analysant les diagrammes *Figure 95*, il est montré que plus la température augmente et plus la proportion d'eau diminue, plus la teneur en 3,5-DCQA hausse. Les teneurs en 3,5-DCQA obtenues étaient comprises entre 6 et 81 µg/mL. Pour maximiser la teneur en cet acide phénolique, il faudrait être dans les conditions suivantes (prédiction réalisée avec le logiciel) : température de 60 °C (la plus élevée), 1 cycle de 30 s (le plus court), un volume de 5 mL (le plus faible) et une proportion en eau nulle.

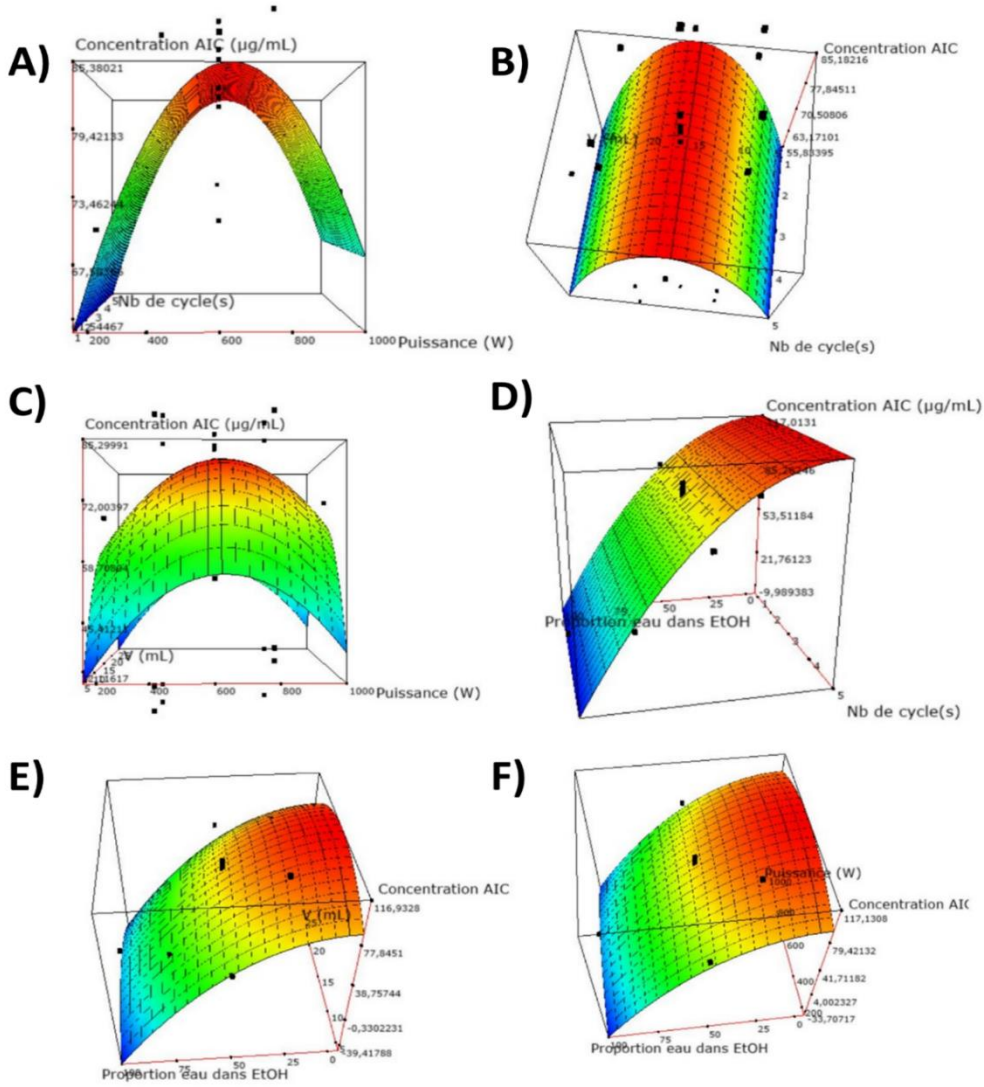


Figure 94. Diagrammes de surface de réponses des teneurs en 3,5-DCQA (en µg/mL ; = concentration AIC) à partir de de partie aérienne d'Ambrosia artemisiifolia en fonction des niveaux des principaux paramètres de MAE.

Dans les deux cas, la proportion en eau ajoutée à l'EtOH doit être égale à zéro (donc 100% du solvant pur EtOH) pour extraire le maximum de 3,5-DCQA. Le temps d'extraction et le volume de solvant nécessaires sont relativement faibles pour son extraction, ce qui est intéressant en terme d'économies d'énergie et de consommation de solvants ; comme ce qui avait pu être observé avec le 5-*O*-CQA. Plus la température est élevée, meilleure est l'extraction de cet acide phénolique.

Une étude précédemment menée sur des sous-produits de l'artichaut montrait quant à elle que l'éthanol fournissait les concentrations les plus faibles d'acides caféoylquiniques et de composés phénoliques totaux [437] ; différant de notre travail et pouvant peut être s'expliquer par les types d'espèce végétale étudiés ou les conditions opératoires qui sont différentes. Les résultats obtenus ici rejoignent ceux d'autres travaux antérieurs menés sur des espèces végétales différentes [496,513,516]. Dans une étude portant sur la comparaison de plusieurs méthodes d'extraction dont la MAE d'acides dicaféoylquiniques à partir d'une plante halophile [496], les auteurs ont montré que la durée de l'extraction n'influençait que très peu l'extraction de DCQA, comme cela est le cas

dans notre travail. Il a été également remarqué que lorsque la durée de l'extraction augmentait, la température croissait ce qui pouvait engendrer une isomérisation du pic de DCQA. La puissance pouvait également induire ce phénomène de dédoublement au-delà de 500 W. Enfin, 3 cycles permettaient un accroissement du rendement d'extraction global mais aussi des quantités de DCQAs. Dans cette étude antérieure également [516], une diminution importante du rendement en 3,5-DCQA avait été constatée à une température de 90 °C lors de l'extraction (alors que le 3-*O*-CQA était stable dans ces conditions). Le taux d'instabilité thermique était d'environ 7,7 × 10−3 mg/g par minute. En effet, l'apparition de son isomère (4,5-DCQA) avait été observée. La quantité de 4,5-DCQA produite était par ailleurs proportionnelle au taux de diminution du 3,5-DCQA, ce qui confirmait la transformation (par migration d'acyle).

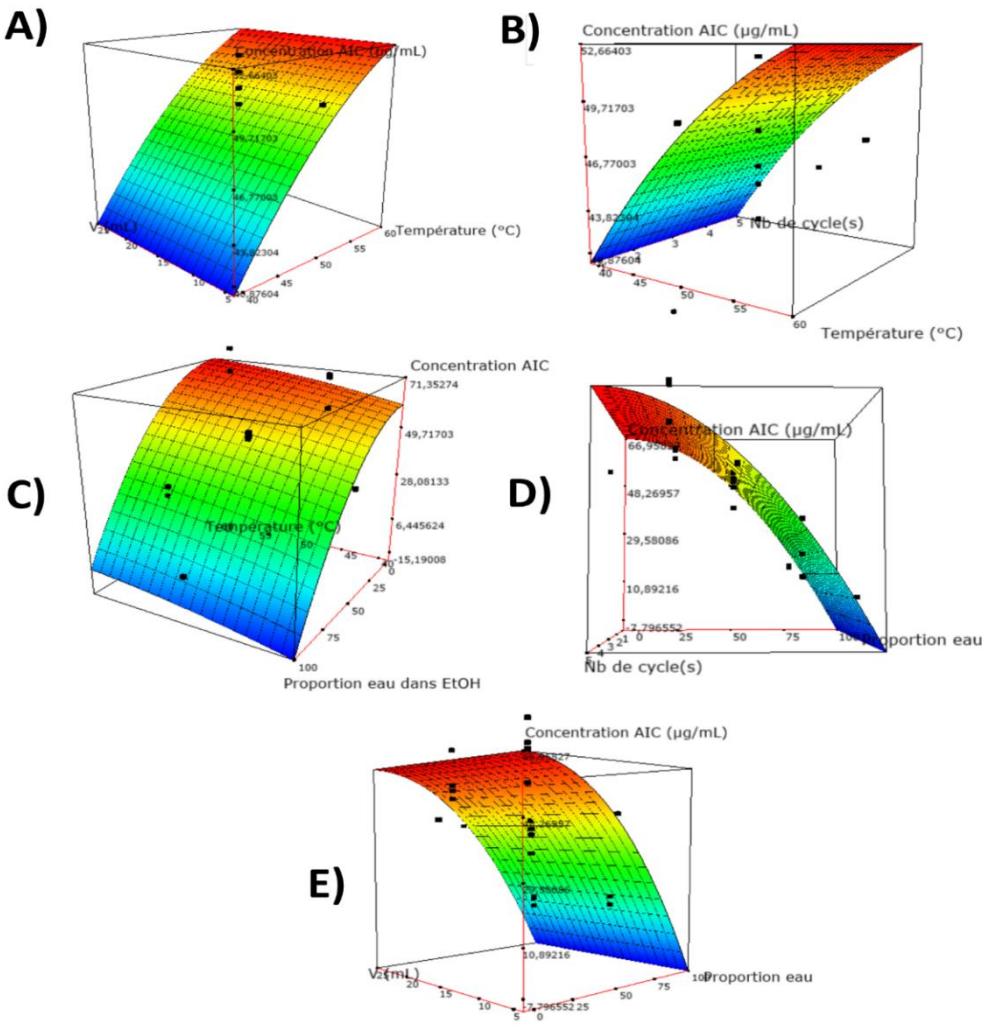


Figure 95. Diagrammes de surface de réponses des teneurs en 3,5-DCQA (en µg/mL ; = concentration AIC) à partir de partie racinaire de Solidago canadensis en fonction des niveaux des principaux paramètres de MAE.

Dans ce travail antérieur *a contrario* [513], les conditions d'extraction optimales, déterminées à l'aide de la méthodologie de surfaces de réponse et permettant la récupération de 3,5-DCQA étaient une température d'extraction de 95 °C et une composition en solvant EtOH/H_2O (57/43 ; *v/v*). Le phénomène d''isomérisation du 3,5-DCQA en 4,5-DCQA et 3,4-DCQA était néanmoins observé à de plus hautes températures.

5. SOMMES DES ACIDES 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA

Les diagrammes de surface de réponse pour la réponse Y_4 à savoir la somme des aires chromatographiques des pics de 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA dans le cas d'*A. artemisiifolia*, sont présentés *Figure 96*. Ceux correspondant à *S. canadensis* sont donnés *Figure 97*.

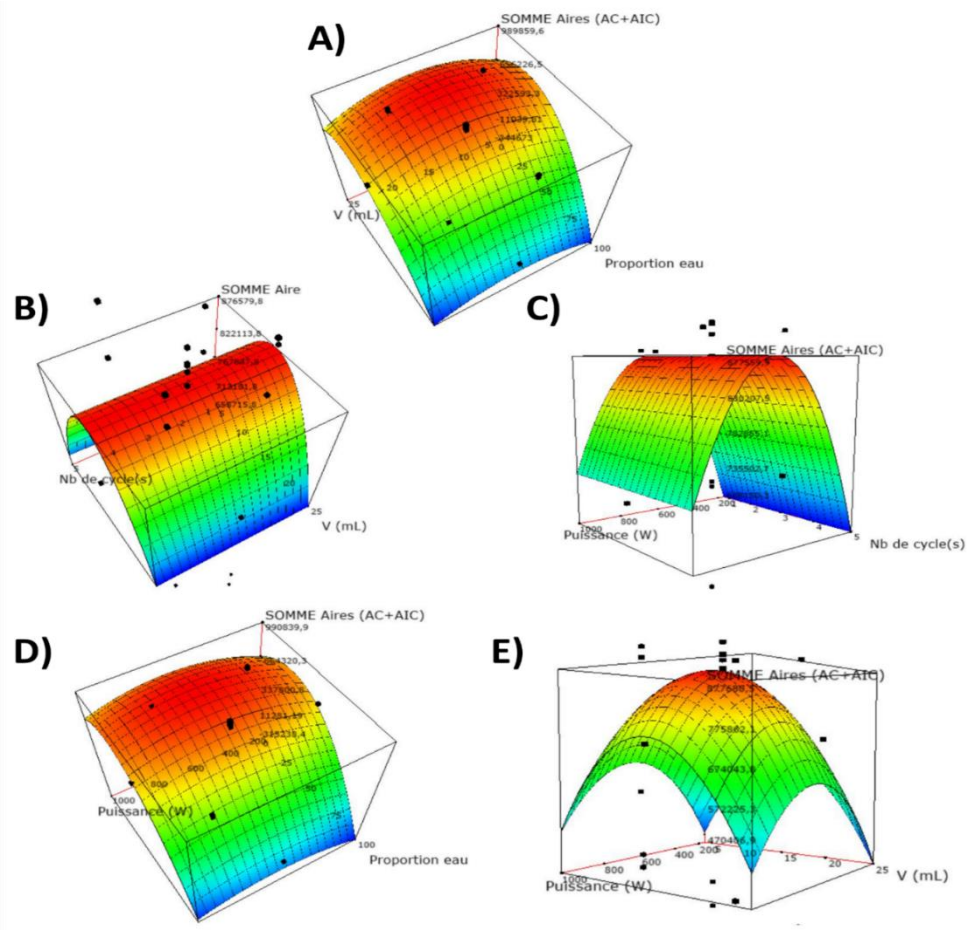


Figure 96. Diagrammes de surface de réponses de la somme des aires en 5-O-CQA et 3,5-DCQA (= somme aires pics AC+AIC) à partir de de partie aérienne d'Ambrosia artemisiifolia en fonction des niveaux des principaux paramètres de MAE.

Chez *A. artemisiifolia*, d'après la régression linéaire multiple obtenue Y_4 et les diverses valeurs des coefficients affectés aux facteurs (*Tableau 12*), la somme des deux acides phénoliques est notamment influencée par le volume (coefficient de 60097,200), la proportion en eau (coefficient de -0,994) et la puissance d'irradiation (coefficient de 1265,900) ; dans cet ordre d'importance. Les termes quadratiques liés à ces trois variables ont eux-aussi des effets défavorables sur la réponse (notamment V (mL)*V (mL)) ayant tous un signe « - ». Les diagrammes de surface *Figure 96*, présentent des courbes toutes très prononcées avec un effet de type « gaussien ». Pour maximiser cette réponse, il faudrait être dans les conditions suivantes (prédiction réalisée avec le logiciel) : puissance de 641 W, 1 cycle de 30 s (le plus court), un volume de 14,7 mL et une proportion en eau de 27,6%. Ceci est davantage cohérent avec les observations faites sur l'acide 5-*O*-CQA que celles réalisées sur l'acide 3,5-DCQA. Dans la partie aérienne de l'espèce, l'acide 5-*O*-CQA était majoritaire sur le second acide phénolique quelles que

soient les conditions de l'essai considéré (voir *Annexe 9*), pouvant expliquer que le comportement de la somme des aires soit plus proche de l'acide 5-*O*-CQA que de celui du 3,5-DCQA.

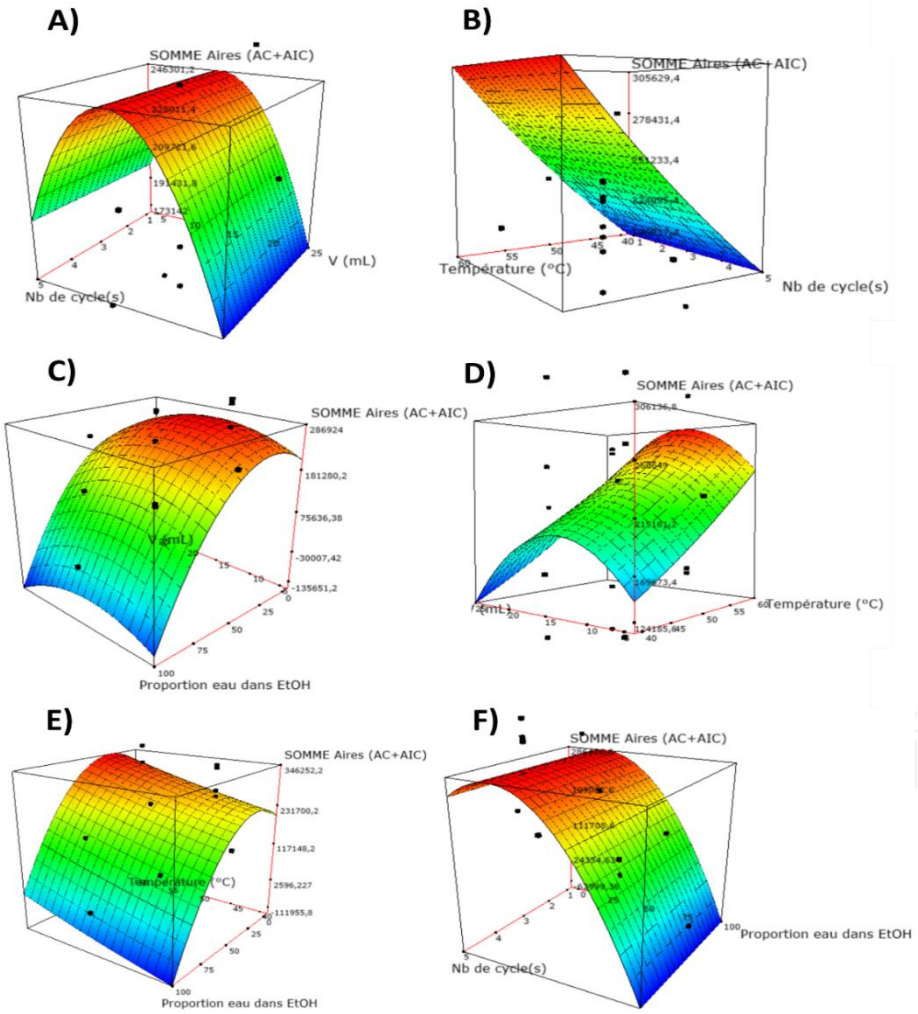


Figure 97. Diagrammes de surface de réponses de la somme des aires en 5-O-CQA et 3,5-DCQA (= somme aires pics AC+AIC) à partir de partie racinaire de Solidago canadensis en fonction des niveaux des principaux paramètres de MAE.

En regardant plus précisément les résultats obtenus sur cette plante *Annexe 9*, il s'avère que tous les extraits réalisés avec 25% d'eau, ont des teneurs en 5-*O*-CQA comprises entre 290 et 335 µg/mL et des teneurs en 3,5-DCQA allant de 92 à 107 µg/mL. Il est aussi possible de noter que l'extrait 100% EtOH contient 210 µg/mL de 5-*O*-CQA et 108 µg/mL de 3,5-DCQA soit pratiquement 2 fois plus de 5-*O*-CQA que de 3,5-DCQA. Il semblait néanmoins qu'en terme de proportions relatives d'après l'analyse UHPLC-UV-Q-TOF-HRMS menée (voir la troisième partie des travaux *III. C.*), qu'il y avait autant de l'un que de l'autre. La quantification des deux acides (voir *Annexe 8*) a permis de surligner que pour une même teneur en acide, l'aire du 3,5-DCQA est plus grande visuellement que l'aire du 5-*O*-CQA, ce qui reste donc cohérent avec les hypothèses émises.

Chez *S. canadensis*, d'après la régression linéaire multiple obtenue Y_4 et les différentes valeurs des coefficients affectés aux facteurs (*Tableau 13*), la somme des deux acides phénoliques est notamment influencée

par le volume (coefficient de 16722,600) et la proportion en eau (coefficient de 2904,810) ; dans cet ordre d'importance. Le terme quadratique Température (°C)*Température (°C) a aussi une influence positive avec un coefficient de 54,396 tandis que les deux termes quadratiques Proportion d'eau dans EtOH* Proportion d'eau dans EtOH et V (mL)*V (mL) ont des effets défavorables sur la réponse. En analysant les diagrammes *Figure 97*, il est montré que plus la proportion en eau diminue et la température augmente plus la somme des aires des deux acides hausse (*Figure 97, B, E et F*). Différentes courbures sont aussi observables lorsque le volume est considéré (*Figure 97, A, C et D*). Pour maximiser Y_4, il faudrait être dans les conditions suivantes (prédiction réalisée avec le logiciel) : température de 60 °C (la plus haute), 1 cycle de 30 s (le plus court), un volume de 13,97 mL et une proportion en eau de 24,14%.

Avec ce plan d'expérience, les mêmes conditions ont été trouvées avec les deux acides pris séparément à savoir la température de 60 °C et le nombre de cycles de 1. En revanche, les volumes prédits étaient plus faibles à savoir 5 mL. De plus, pour le 5-*O*-CQA la proportion en eau prédite était de 27,6%, proche de celle prédite pour la somme, alors que pour le 3,5-DCQA, la proportion en eau prédite était nulle. Dans l'extrait brut éthanolique de rhizomes de *S. canadensis*, le 3,5-DCQA prédominait sur le 5-*O*-CQA (voir la troisième partie des travaux *III. C.*). Ceci est confirmé avec les teneurs obtenues ici : 48 et 27 µg/mL respectivement pour le 3,5-DCQA et le 5-*O*-CQA. Or dans les différents extraits réalisés pour le plan d'expérience, ce n'est pas toujours le cas (voir *Annexe 9*) pouvant expliquer que les tendances observées avec la somme des aires chromatographiques des pics des deux acides phénoliques soient plus proches de celles du 5-*O*-CQA que de celles du 3,5-DCQA.

Les résultats acquis avec les plans d'expériences réalisés ici, rejoignent ceux de travaux récents menés sur d'autres espèces végétales [513,516]. Antérieurement, il a été observé que les rendements d'extraction du 5-*O*-CQA et du 3,5-DCQA suivaient une forme parabolique à mesure que l'éthanol variait [513]. Cela reflète l'importance de la polarité du solvant sur l'extraction des CQA. L'éthanol améliore la solubilité des CQA et l'eau aide à désorber les molécules de la matrice, donc un optimal est atteint avec un mélange des deux [513,516]. Le 3,5-DCQA avait besoin d'une fraction d'éthanol plus élevée (entre 45 à 75%) que le 5-*O*-CQA (entre 30 et 65%) pour être bien extrait [513]. Dans cette étude environ 50% de l'activité antioxydante mesurée dans les extraits (racines de chicorée) s'expliquait par la présence des deux acides caféoylquiniques [513]. Les acides dicaféoylquiniques sont connus pour être moins solubles dans l'eau que les acides monocaféoylquiniques tels que le 5-*O*-CQA. Cela peut être dû à la partie 'acide caféique', légèrement soluble dans l'eau mais assez soluble dans les solvants organiques comme l'éthanol. Avec deux acides caféiques ramifiés, le 3,5-DCQA est moins soluble dans l'eau que le 5-*O*-CQA qui n'en possède qu'un [513,516]. Dans cet autre travail précédent [516], les rendements d'extraction des deux composés suivaient également une tendance parabolique, avec des valeurs optimales à 70%. l'éthanol. Pour des pourcentages d'éthanol supérieurs à 70%, les rendements d'extraction diminuaient respectivement de 48,5% et 17,67% pour les acides mono- et di-caféoylquinique. Il était montré d'autre part que les conditions opératoires optimales d'extraction du 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA étaient obtenues soit avec 70% d'éthanol à une température de 50 °C, soit avec 100% d'eau à une température de 90 °C. La cinétique d'extraction a montré que la durée du processus peut être aussi courte que 1 minute dans l'eau à haute température. Pour

des températures inférieures à 40 °C, leur extraction était très faible. A partir de 50 °C, le rendement d'extraction devenait proportionnel à l'augmentation de la température et du temps d'extraction [516].

D. VERS L'ENRICHSSEMENT DES EXTRAITS EN ACTIFS ?

Trois hypothèses ont été posées en introduction de cette dernière partie de travaux pouvant favoriser les efficacités des extraits à savoir : i) pour que l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* ait une efficacité accrue sur l'élastase et la tyrosinase, il faudrait que 5-*O*-CQA ≥ 3,5-DCQA en terme de proportions relatives ii) il faudrait que 5-*O*-CQA > 3,5-DCQA (en se basant sur le comportement des standards testés séparément) pour que l'extrait de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* soit plus efficace contre la collagénase ; et iii) afin que l'extrait de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* soit un meilleur candidat sur la lipase, il faudrait que 3,5-DCQA > 5-*O*-CQA (en se basant sur le meilleur candidat soit l'extrait de rhizomes de *S. canadensis*). Afin d'apporter des éléments de réponse, le rapport entre la concentration de 5-*O*-CQA et la concentration de3,5-CQA (voir *Annexe 9*) a été utilisé. De cette façon, pour une valeur égale à 1,0 il y avait autant des deux acides. Pour une valeur supérieure à 1,0, il y avait plus de 5-*O*-CQA que de 3,5-DCQA et inversement pour une valeur inférieure à 1,0.

Concernant la première de ces hypothèses i), les résultats du plan d'expérience avec l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* montrent que l'ensemble des essais réalisés excepté le n°17 (100% EtOH), le n°23 (25:75 ; *v:v* ; H_2O:EtOH) et le n°31 (100% H_2O) (voir *Annexe 9*), remplissent la condition 5-*O*-CQA ≥ 3,5-DCQA. L'extrait n°10 (75:25 ; *v:v* ; H_2O:EtOH) est celui qui contient le plus de 5-*O*-DCQA tout en réalisant la condition souhaitée. Ces extraits devraient être plus actifs sur l'élastase et la tyrosinase. Il se peut néanmoins que d'autres molécules présentes dans ces typologies d'extraits puissent agir en synergie positivement ou négativement sur les deux cibles dermo-cosmétiques.

Concernant la seconde hypothèse ii), les résultats du plan d'expérience avec l'extrait de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* montrent que l'intégralité des essais réalisés excepté le n°31 (100% H_2O) (voir *Annexe 9*), satisfont à la condition 5-*O*-CQA > 3,5-DCQA. Il s'avère par ailleurs que l'extrait brut éthanolique est compris dans les extraits proposés pour satisfaire 5-*O*-CQA > 3,5-DCQA, pourtant ce type d'extrait (100% EtOH) ne présentait aucune inhibition sur la collagénase. Il avait même un étonnant effet activateur (voir la première partie des travaux *I. D. 2. c)*). Ainsi, si ces typologies d'extraits pourraient permettre d'obtenir une meilleure efficacité contre la collagénase, il est possible que l'effet activateur soit conservé dans le cas ou d'autres molécules de l'extraits y contribuent et y sont toujours présentes.

Pour vérifier les efficacités des extraits supposés actifs contre la collagénase, plusieurs typologies d'extraits issus des deux plans d'expériences ont été évalués sur la cible. Les résultats de ces tests sont présentés *Figure 98*.

Chez *A. artemisiifolia*, les trois types d'extraits bruts (EB) examinés présentent un comportement activateur très fort avec un effet non-monotonique 'en cloche' identique à ce qui avait été observé sur l'extrait brut éthanolique (voir la première partie des travaux *I. D. 2. c)*) [443–445]. Seul l'EB 100% H_2O à 100 µg/mL néanmoins présente une inhibition faible (90%). Les deux EB hydroalcooliques ont par ailleurs des comportements activateurs bien plus forts que les EB aux solvants purs. En contenant plus de 5-*O*-CQA que de 3,5-DCQA, il était attendu une meilleure efficacité sur la cible collagénase. Ces résultats suggèrent donc que la partie aérienne d'*A. artemisiifolia* possède un effet activateur avéré difficilement valorisable avec cette enzyme. Plusieurs molécules présentes dans les différents extraits testés jouent potentiellement un rôle important dans l'activation de cette cible enzymatique (collagénase).

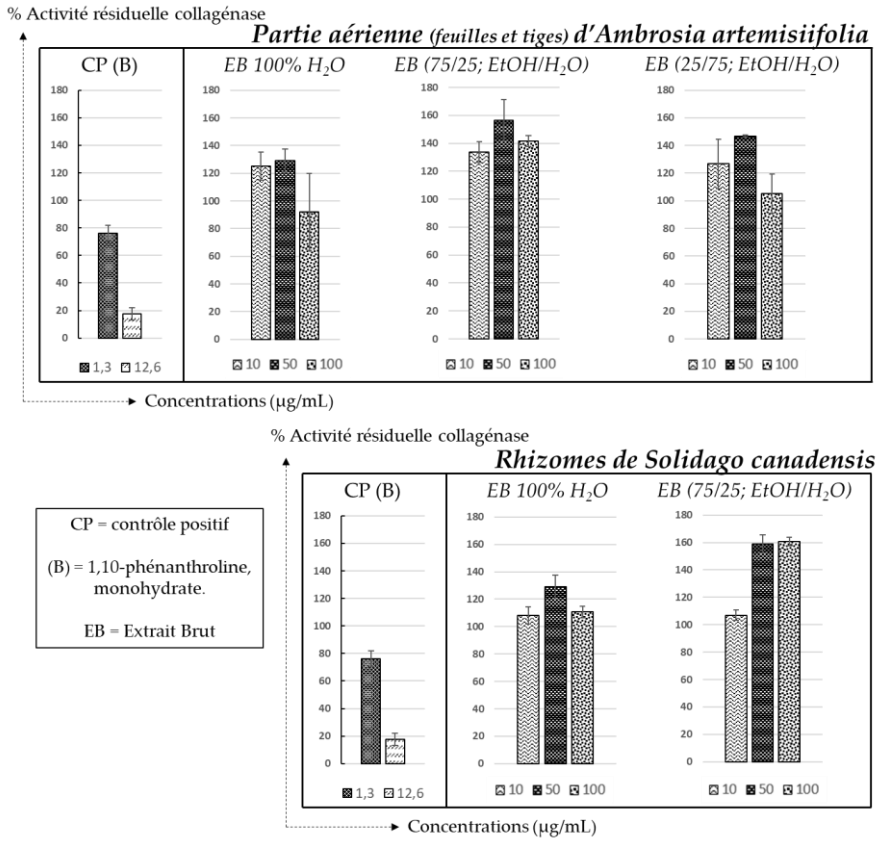


Figure 98. Evaluation des activités résiduelles collagénase des extraits bruts issus des plans d'expériences. Extraits N°31, N°23 et N°11 (voir Annexe 9) de gauche à droite pour les extraits de A. artemisiifolia. Extraits N°31 et N°23 (voir Annexe 9) de gauche à droite pour les extraits de S. canadensis. n = 3 expériences indépendantes pour chaque concentration (µg/mL). Les barres d'erreur représentent ± écart type.

Chez *S. canadensis*, les résultats montre également des extraits activateurs prononcés sur la collagénase. Ces derniers confortent donc le fait que l'extrait brut éthanolique criblé initialement a un pouvoir anti-collagénase bien plus intéressant et qui pourrait être valorisé. Pourtant, les deux types d'extraits évalués ici contenaient plus de 3,5-DCQA que de 5-*O*-CQA comme l'extrait alcoolique et auraient pu avoir un comportement proche ou comparable. Il se pourrait que des molécules nouvelles ou communes mais présentes en plus fortes/faibles concentrations en comparaison de l'extrait éthanolique puissent leurs conférer ces propriétés surprenantes. Ou,

il se pourrait que ces extraits ne contiennent pas de dérivés de CQAs (3,4 et 4,5-DCQA) ou encore que la condition à respecter soit 5-*O*-CQA < 3,5-DCQA en se basant sur les comportements des standards séparés.

Enfin, concernant la dernière hypothèse iii), seul l'extrait n°31 (100% H_2O) remplit la condition 3,5-DCQA > 5-*O*-CQA. Cet extrait pourrait être un agent nutraceutique plus efficace sur la lipase pancréatique. Il se peut cependant que d'autres molécules présentes dans ce type d'extrait puissent agir en synergie positivement ou négativement sur cette cible.

E CONCLUSION

Trois hypothèses ont pu être émises pouvant favoriser les efficacités observées des extraits éthanoliques (obtenus par MAE) chez *A. artemisiifolia* et *S. canadensis* dans les sections de travaux précédentes, en relation avec la présence des acides phénoliques (5-*O*-CQA et 3,5-DCQA) et leur abondance relative. Ces composés étaient majoritaires et présents dans l'ensemble des organes des deux plantes. Cette partie IV de travaux s'est alors consacrée à l'étude des paramètres d'extraction par MAE pouvant influencer les quantités d'extractibles (rendement d'extraction) des deux EVEE et plus particulièrement les teneurs des deux actifs principaux pouvant impacter les activités biologiques visées. La partie aérienne d'*A. artemisiifolia* et les rhizomes de *S. canadensis* ont plus particulièrement été étudiés. L'eau et l'éthanol ont été choisis comme solvants d'extraction car ils sont considérés comme non toxiques, de qualité alimentaire, peu coûteux et respectueux de l'environnement. Deux plans d'expérience pour surfaces de réponse ont été mis en œuvre pour déterminer les effets des paramètres expérimentaux sur les réponses attendues. Le logiciel statistique *Ellistat* a alors permis l'interprétation des données et la création des régressions polynomiales modélisant les différentes réponses.

Les résultats acquis ici rejoignaient globalement ceux d'autres travaux antérieurs de même type réalisés sur des végétaux divers. L'organe en lui-même a eu peu d'influence sur le rendement d'extraction mais les paramètres liés à l'équipement avaient un impact sur cette réponse. Une proportion en eau dans le ratio H_2O/EtOH élevée permettait d'extraire une plus large gamme de composés et ainsi d'obtenir des rendements d'extraction plus élevés. Une température (ou une puissance) élevée permettaient également d'augmenter la réponse. Généralement, les solvants ont une plus grande capacité à solubiliser les composants à des températures plus élevées, améliorant la pénétration dans la matrice en raison d'une diminution de la tension superficielle et de la viscosité du solvant [515]. Chez *A. artemisiifolia*, un temps court d'extraction a amélioré le rendement tandis que chez *S. canadensis*, plus le temps d'extraction était important, meilleur était le rendement d'extraction. Les différents mélanges eau-éthanol testés ont permis des modifications de la constante diélectrique qui a influencé l'optimisation du temps d'irradiation [515]. Pour les deux EVEE, concernant la teneur en 5-*O*-CQA, la proportion en eau ajoutée à l'EtOH ne devait pas dépasser les 30% pour extraire le maximum de ce composé. Concernant la teneur en 3,5-DCQA cette fois-ci, la proportion en eau ajoutée à l'EtOH devait quant à elle être égale à zéro pour extraire le maximum de ce second composé. Pour les deux acides pris indépendemment, le temps d'extraction et le volume de solvant nécessaires étaient relativement faibles pour leurs extractions, ce qui est intéressant en

terme d'économies d'énergie et de consommation de solvants. Par ailleurs, plus la température était élevée, meilleure était leurs extractions. Néanmoins, la température a un grand effet sur la stabilité des acides dicaféoylquiniques. Ainsi, le 4,5-O-DCQA est plus stable que le 3,5-DCQA, le plus sensible étant le 3,4-DCQA. Les di-CQA peuvent s'isomériser ou se dégrader en mono-CQA, en acide caféique et en d'autres composés [496,516]. L'isomérisation pourrait être due au fait que les CQA di-acyles sont plus stables lorsque la liaison ester avec l'acide quinique existe sous forme de liaison équatoriale plutôt qu'axiale [516]. Le 5-*O*-CQA quant a lui est thermorésistant ; sa dégradation se produit à de très hautes températures [513]. Dans notre cas toutefois, il s'est avéré que les acides 3,4-DCQA et 4,5-DCQA présents dans l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* pouvaient aider aux activités anti-hyaluronidases, anti-collagénases ou encore anti-lipases globales de l'extrait éthanolique brut (voir la troisième partie des travaux *III. B* et *C*). Ce phénomène de dégradation thermique pourrait être bénéfique dans ces cas précis. Enfin, les tendances observées avec la somme des aires chromatographiques des pics des deux acides phénoliques étaient plus proches de celles du 5-*O*-CQA que de celles du 3,5-DCQA.

La 1ère hypothèse était 'Afin que l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* ait une efficacité accrue sur l'élastase et la tyrosinase, il fallait que 5-*O*-CQA ≥ 3,5-DCQA en terme de proportions relatives'. L'ensemble des essais réalisés excepté le n°17 (100% EtOH), le n°23 (25/75 ; H_2O/EtOH) et le n°31 (100% H_2O) remplissaient les conditions. L'extrait n°10 (75/25 ; H_2O/EtOH) était celui qui contenait le plus de 5-*O*-DCQA tout en réalisant les conditions souhaitées. Ces extraits devraient ainsi être plus actifs sur l'élastase et la tyrosinase. La 2ème hypothèse était 'Il faudrait que 5-*O*-CQA > 3,5-DCQA (en se basant sur le comportement des standards testés séparément) pour que l'extrait de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* soit plus efficace contre la collagénase'. L'intégralité des essais réalisés excepté le n°31 (100% H_2O) satisfont à la condition 5-*O*-CQA > 3,5-DCQA. L'extrait brut éthanolique était donc compris dans les propositions pourtant il ne présentait aucune inhibition sur la collagénase. Il avait même un étonnant comportement activateur avec un effet non-monotonique. Ainsi, si ces typologies d'extraits pourraient permettre d'obtenir une meilleure efficacité contre la collagénase, il est possible que l'effet activateur soit conservé dans le cas ou d'autres molécules de l'extraits y contribuent et y sont toujours présentes. Avec des tests complémentaires évaluant plusieurs extraits issus des plans d'expériences, cette dernière supposition s'est vérifiée. La 3ème et dernière hypothèse était 'Afin que l'extrait de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* soit un meilleur candidat sur la lipase, il fallait que 3,5-DCQA > 5-*O*-CQA (en se basant sur le meilleur candidat soit l'extrait de rhizomes de *S. canadensis*)'. Seul l'extrait n°31 (100% H_2O) remplissait la condition. Cet extrait pourrait être un agent nutraceutique plus efficace sur la lipase pancréatique et devrait faire l'object de travaux futurs.

Des tests d'activités biologiques *in vitro* supplémentaires devraient être réalisés afin de déterminer les efficacités des extraits produits ici et vérifier les hypothèses émises. Des études complémentaires devraient être menées afin de caractériser les différents extraits hydro-alcooliques produits et identifier les molécules qui n'étaient pas présentes initialement dans les extraits éthanoliques. Des tests *in silico* pourraient permettre d'identifier plus aisément les molécules responsables des activités observées et leurs toxicités. En suivant des tests de toxicité cutanée et *in vivo* pourraient être envisagés. Les extraits enrichis en CQAs pourraient constituer un ingrédient à forte valeur ajouté.

V. ETUDE DE LA VARIABILITE PHYTOCHIMIQUE DES ESPECES VEGETALES EXOTIQUES ENVAHISSANTES

A INTRODUCTION

La première et la seconde partie de travaux ont évalué et surligné les potentiels prometteurs dermo-cosmétiques de *F. japonica*, *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*. *F. japonica* est celle qui a montré les plus forts pouvoirs protecteurs contre le vieillissement cutané. La troisième partie de travaux quant à elle, a montré les capacités impressionnantes d'*A. artemisiifolia* et de *S. canadensis* entant qu'agents nutraceutiques contre la lipase pancréatique. Les efficacités observées sur les différentes cibles étudiées ont été liées à la présence de composés polyphénoliques présents dans les divers organes des trois espèces (acides phénoliques, flavonoïdes, anthraquinones, stilbènes *etc.*) ; ce qui est souvent le cas dans les extraits naturels [457]. Parmi les antioxydants présents dans les extraits, il y avait des acides phénoliques, des dérivés de quercétine et de lutéoline, de la catéchine gallate, des stilbènes et anthraquinones ou encore de la torachrysone glucoside. Chez *F. japonica*, l'émodine était le meilleur actif contre la hyaluronidase, l'élastase ou encore la collagénase, tandis que le resvératrol s'est avéré être un actif fort anti-tyrosinase. Ces actifs étaient localisés avant tout dans les rhizomes de l'espèce. Chez *A. artemisiifolia*, les principaux actifs anti-lipase étaient les acides 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA, localisés dans ses deux organes. Chez *S. canadensis*, plusieurs actifs potentiels anti-lipase (acides caffeoylquiniques, flavonol) étaient retrouvés dont certains localisés spécifiquement dans sa partie aérienne (quercitrine) ou dans ses rhizomes (3,4-DCQA et 4,5-DCQA).

Les propriétés thérapeutiques et l'efficacité d'un actif peuvent par ailleurs être impactées par des facteurs liés directement à la physiologie de la plante comme sa nutrition ou son stade de développement ou par des facteurs environnementaux ou technologiques tels que le type de sol, l'approvisionnement en eau, le mode de collecte employé, les stress induits par divers stimuli, lumière, température, altitude, localisation géographique, nouvel environnement ou encore la pollution [121,369,449,517–527]. Au cours du temps, des saisons, des mois voire des journées, les mécanismes de biosynthèses engendrent une accumulation plus au moins importante des métabolites constitutifs. Le moment optimal de la récolte varie, évidemment, selon les espèces végétales mais aussi de l'organe de la plante collectée [308,355]. Afin de conserver le maximum d'actifs, il s'agit donc d'éléments importants à considérer. Dans une optique de valorisation chimique, une meilleure connaissance du contenu moléculaire des différents organes des espèces végétales par l'étude de tels facteurs s'avère indispensable.

Chez *Fallopia* spp., il avait été constaté qu'il n'y avait pas de corrélation apparente entre leurs niveaux de polyploïdie et la chimie des flavonoïdes, mais une variation géographique des profils de flavonoïdes parmi certaines populations avait été détectée [525]. Dans des miels de *F. japonica* collectés dans diverses régions de Roumanie, il a été montré récemment des variations de teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes totaux selon leurs provenances ; en corrélation avec leurs activités antioxydantes. Cependant, aucune différence

significative en termes de TPC et TFC ($p < 0,01$) ainsi qu'en terme de capacité antioxydante ($p < 0,05$) entre les zones de collecte n'a été enregistrée [528]. Dans une autre étude, il a été montré que les niveaux de flavonoïdes dans les feuilles de *F. japonica* augmentaient avec l'altitude de leurs sites de croissance. L'espèce s'était chimiquement acclimatée aux régions de haute altitude, dans lesquelles existent des conditions environnementales sévères telles qu'un rayonnement UV plus élevé [521,526]. Chez *Solidago* sp., il a été montré que la capacité antioxydante des miels de verge d'or unifloraux pouvait être différente selon les pays d'origine, en corrélation avec l'intensité de la couleur et la teneur en polyphénols. [351,353,529]. Aucune donnée antérieure n'a été trouvée concernant la composition polyphénoliques d'*A. artemisiifolia* de provenances différentes ou autres aspects évoqués ci-dessus.

C'est dans ce contexte, que cette dernière partie de travaux se consacre à renforcer les connaissances quant aux paramètres pouvant influer sur la composition polyphénolique globale des trois espèces végétales (organes, localisations géographiques, stades de croissance). Il est aussi question d'évaluer l'impact des paramètres considérés sur les compositions phytochimiques plus généralement en étudiant les rendements d'extraction des zones de prélèvements réalisées en Savoie Mont Blanc.

Dans ces travaux, deux parcelles expérimentales par espèce végétale à deux altitudes différentes (basse altitude environ 250-400 m et haute altitude 850-1150 m) ont pu être explorées afin d'étudier la variabilité polyphénolique (intra- et inter-parcelle) et ainsi la conservation des actifs en fonction de la localisation géographique (altitude, type de terrain, surface délimitée de prélèvement) selon l'organe et le mode de conservation choisi. Tous les échantillons récoltés, extraits par macération assistée par ultrasons (selon les conditions déterminées dans la première partie de travaux *I. B.* avec *F. japonica*), ont été déposés sur des plaques HPTLC. Les systèmes d'élution et de révélation ont été adaptés pour regarder spécifiquement les composés polyphénoliques [530]. Un premier examen visuel a alors permis de rendre compte de la variabilité polyphénolique des extraits bruts.

Bien que la TLC soit outil d'aide puissant au profilage de nombreux échantillons en parallèle, un des inconvénients majeurs de la chromatographie planaire réside en sa subjectivité, dépendant fortement de la perception de l'analyste (reconnaissance des formes et comparaison des *tracks* analyste-dépendantes) [431]. C'est pourquoi les images/chromatogrammes des séries de plaques produites ont été soumises au logiciel rTLC. Ce logiciel statistique en *open source* propose une procédure standardisée et des outils de visualisation informatifs qui permettent d'explorer les données de manière objective, reproductible et complète [431]. Avec les photographies de la ou les plaque(s) chromatographique(s) directement, l'application Web rTLC donne accès à une cartographie du regroupement des divers échantillons déposés. Etant donné que les chromatogrammes contiennent des centaines de pixels, la multidimensionnalité associée est utilisée afin d'extraire un maximum d'informations des images. Il est alors possible de procéder à des analyses multivariées des chromatogrammes planaires, basées sur des modèles mathématiques, telle que l'ACP [523]. Le prétraitement des plaques étant particulièrement important avant d'effectuer les analyses statistiques [431], des corrections de lecture visant à

améliorer la qualité de l'ensemble de données ont pu être utilisées. Il est possible par exemple d'appliquer des corrections de ligne de base, de lissage, de bruit de l'image, de mise à l'échelle, de gauchissement, de contraste, de centrage moyen, de standardisation ou encore normalisation des données. Dans notre cas, les plaques éluées linéairement, n'ont pas subi d'effets de bord particuliers amenant une bonne reproductibilité d'analyse. Les choix de correction se sont faits en fonction de la meilleure séparation des organes et de la meilleure variance pour l'ensemble des cas.

B. VARIABILITE PHYTOCHIMIQUE DE *FALLOPIA JAPONICA*

1. VARIABILITE POLYPHENOLIQUE : INFLUENCE DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE

L'influence de la localisation géographique sur la composition polyphénolique de *F. japonica* a été étudiée. Les deux parcelles examinées étaient celles de Praz sur Arly et Voglans. Les feuilles et les tiges quant à elles provenaient de Saint-Alban-d'Hurtières *Figure 99, F et T* respectivement. Deux plaques (n°1 et n°2), sur laquelle ont été déposés les extraits de ses organes (*Figure 99*), ont été soumises au logiciel rTLC pour les traitements statistiques des échantillons. Deux ACPs avec correction ligne de base ont été réalisées : la première à partir des plaques n°1 et n°2 (A) et la seconde à partir de la plaque n°2 (B), uniquement. Ces dernières sont présentées *Figure 100, A et B*.

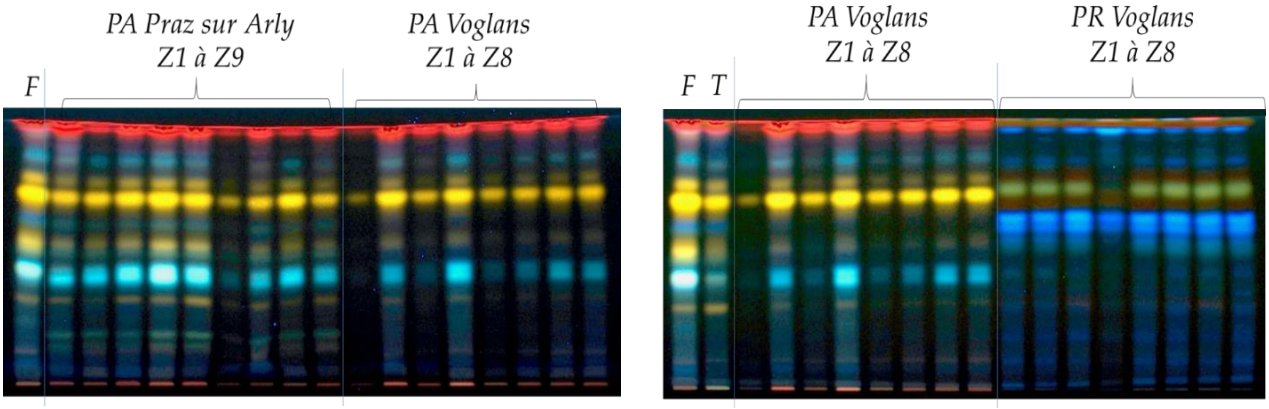


Figure 99. Plaques HPTLC réalisées pour étudier l'influence de la localisation géographique chez F. japonica. A gauche : plaque n°1 et à droite plaque n°2. PA = partie aérienne = feuilles+tiges+fleurs et PR = partie racinaire = rhizomes. Z = zones. Systèmes d'élution et de révélation associés à la famille des composés phénoliques.

Les différents organes (*Figure 99, PA et PR*) de *F. japonica* possèdent des compositions polyphénoliques très différentes entre elles, comme ce qui avait été constaté dans la première partie de travaux *I. F. 3* et antérieurement [79]. La partie aérienne correspond bien à l'association des feuilles et des tiges, en comparant visuellement les trois types de profils (*Figure 99, F, T et PA*). Pour chaque organe, l'ensemble des empreintes

polyphénoliques sont similaires entre elles avec néanmoins des spots aux mêmes *Rfs* d'intensités variables. La partie aérienne de la z4 de Praz sur Arly et les feuilles sont celles qui présentent les plus fortes intensités de spots et donc qui possèdent le plus de composés polyphénoliques. Il se pourrait que dans cette z4, l'échantillon soit constitué majoritairement de feuilles. Pour les rhizomes (*Figure 99, PR*), c'est la z3 de Voglans qui est la plus riche en composés polyphénoliques présentant des spots d'intensités plus élevées que celles des autres zones. A l'inverse, les profils les moins riches sont pour la partie aérienne la z1 de Voglans et pour les rhizomes la z4 de Voglans. Dans l'extrait de rhizomes de la z4, le spot vert moyennement polaire commun à toutes les zones est absent ici.

L'analyse multivariée *Figure 100, A* et celle *Figure 100, B* montrent respectivement des pourcentages d'explication de la variabilité de 88,1% et 90,7%. Chaque partie de plante est associée à un groupe distinct. Pour les deux ACPs, la séparation des organes se fait selon la seconde composante avec une variance de 11,6% et 19,2% (respectivement pour la A et la B). L'ellipse bleue peu large témoigne de la proximité intra-localisation des rhizomes des 8 zones de Voglans et d'une certaine homogénéité des échantillons dans le système élution-révélation mis en œuvre. Seule la z4 semble très légèrement se distinguer du groupe, corroborant ce qui peut être observée visuellement avec la plaque n°2.

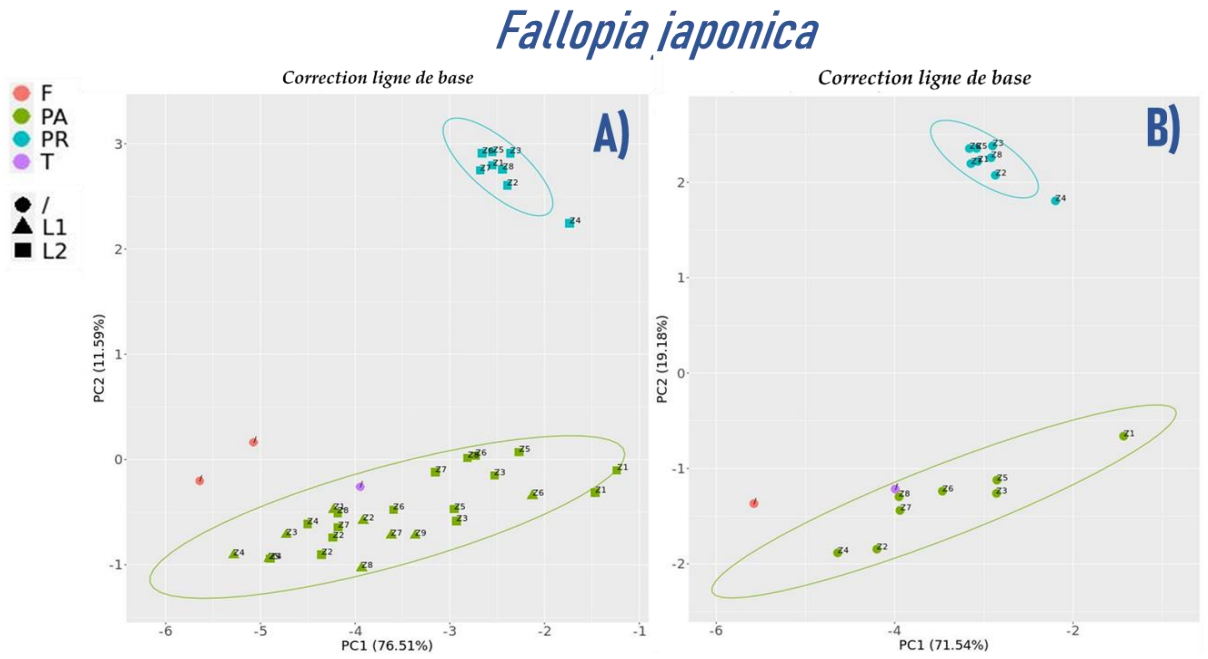


Figure 100. Analyses en composante principale des différents organes de F. japonica (feuilles ou F ; tiges ou T ; rhizomes ou PR ; partie aérienne ou PA (feuilles+cannes). L1 et L2 = Praz sur Arly et Voglans, respectivement. Z = zone et / = localisation géographique Saint-Alban-d'Hurtières.

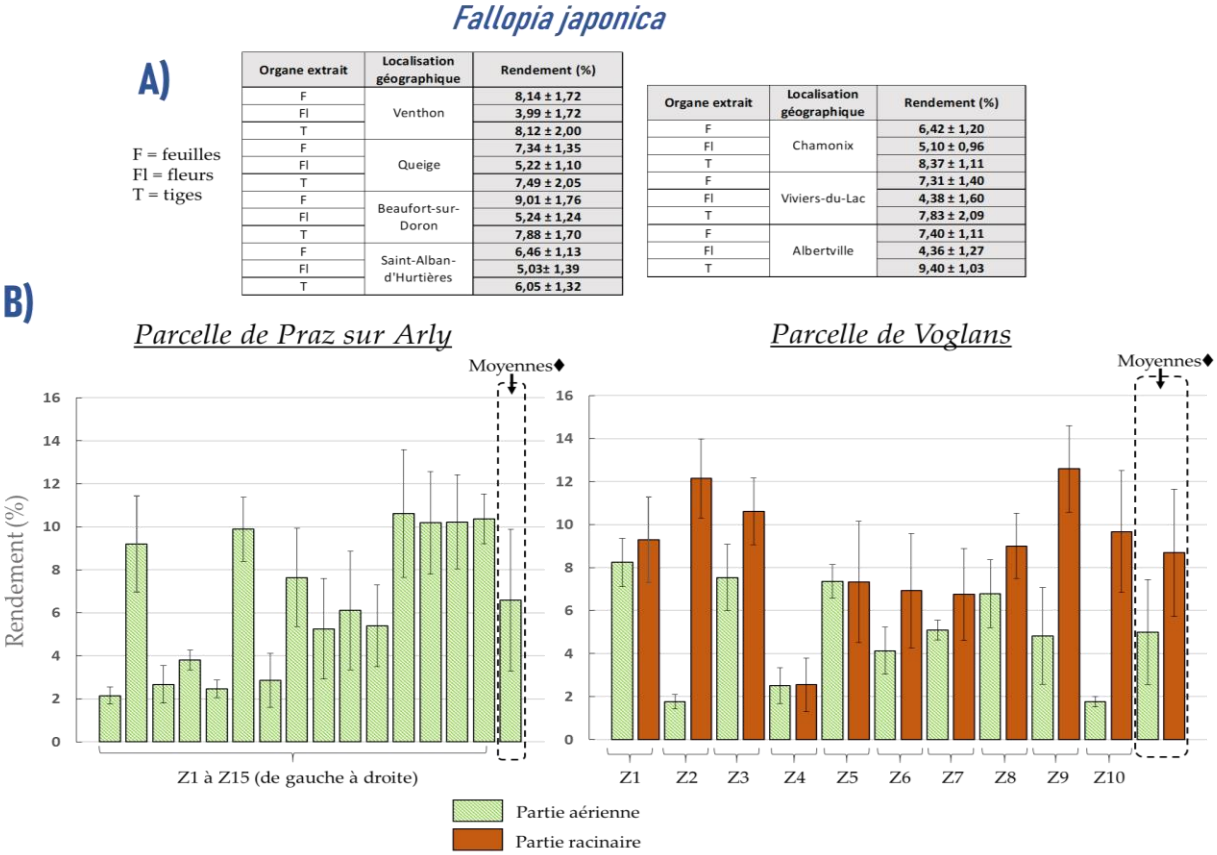
Les ellipses vertes sont quant à elles plus diffuses *Figure 100, A et B*, témoignant d'une disparité plus importante des profils polyphénoliques des parties aériennes. Visuellement, si la composition apparaît semblable pour l'intégralité des extraits des deux localisations, de multiples différences d'intensité de spots sont observables.

Ceci peut expliquer à la fois cette proximité des échantillons mais une hétérogénéité plus importante ou encore le nombre d'extraits pour cet organe qui est plus élevé (en comparaison avec les rhizomes). De plus, l'extrait de tige est regroupé avec le groupement des extraits de parties aériennes alors que les deux extraits de feuilles sont légèrement écartés. Cette observation est cohérente car l'extrait de partie aérienne est ainsi produit qu'il contient le plus souvent une plus grande quantité de cannes que de feuilles. Il apparaît clairement que les teneurs en composés polyphénoliques sont plus importantes dans l'extrait de feuilles que dans celui de cannes.

En conclusion, ces résultats suggèrent que les parties aériennes de *F. japonica* provenant de localisations différentes du territoire Savoie Mont Blanc d'une part et ses rhizomes d'autre part (de zones intra-parcelles) pourraient être rassemblées dans le cadre d'une valorisation chimique, au stade de développement étudié.

2. IMPACTS DE L'ORGANE ET DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE SUR LES RENDEMENTS D'EXTRACTION

Les impacts de l'organe et de la localisation géographique sur les rendements globaux d'extraction ont été étudiés chez *F. japonica*. La *Figure 101, A* présente pour ses différents organes aériens (feuilles, fleurs, tiges) les rendements d'extraction moyens obtenus par localisation géographique. La *Figure 101, B* quant elle montre les rendements d'extraction moyens obtenus par organe et par zone de prélèvement des deux parcelles Praz sur Arly et Voglans.



Organe extrait	Localisation géographique	Rendement (%)
F	Venthon	8,14 ± 1,72
Fl		3,99 ± 1,72
T		8,12 ± 2,00
F	Queige	7,34 ± 1,35
Fl		5,22 ± 1,10
T		7,49 ± 2,05
F	Beaufort-sur-Doron	9,01 ± 1,76
Fl		5,24 ± 1,24
T		7,88 ± 1,70
F	Saint-Alban-d'Hurtières	6,46 ± 1,13
Fl		5,03± 1,39
T		6,05 ± 1,32

Organe extrait	Localisation géographique	Rendement (%)
F	Chamonix	6,42 ± 1,20
Fl		5,10 ± 0,96
T		8,37 ± 1,11
F	Viviers-du-Lac	7,31 ± 1,40
Fl		4,38 ± 1,60
T		7,83 ± 2,09
F	Albertville	7,40 ± 1,11
Fl		4,36 ± 1,27
T		9,40 ± 1,03

Figure 101. Présentation des rendements d'extraction moyens en % (n = 6) obtenus : A) des organes de F. japonica dans chaque localisation géographique ; B) par zones pour les deux organes de F. japonica. Z = zone. Les moyennes ♦ correspondent aux moyennes de l'ensemble des zones par organe. Partie aérienne composée de feuilles et cannes et partie racinaire des rhizomes.

Les *résultats de la Figure 101, A* montrent des rendements d'extraction moyens par organe considéré similaires d'une localisation géographique à l'autre. Les fleurs sont l'organe qui présente les plus faibles rendements moyens des organes aériens (5%). Les rendements moyens des feuilles et des tiges sont très proches entre eux. En fonction de la localisation géographique, le rendement d'extraction moyen maximal est observé pour la feuille ou pour la tige. Les rendements moyens des organes séparés sont du même ordre de grandeur que ceux observés des parties aériennes de la plante (*Figure 101, B*). Les résultats de la *Figure 101, B* montrent souvent de meilleurs rendements moyens à partir des rhizomes qu'à partir de la partie aérienne dans la parcelle de Voglans. Sur la parcelle de Praz sur Arly, il peut être remarqué une certaine disparité des rendements moyens obtenus des parties aériennes dans les diverses surfaces de prélèvement. Sur quinze surface prélevées en effet, le plus faible rendement est de 2,15 ± 0,40% (z1, *Figure 101, B*) tandis que le plus fort est de 10,62 ± 2,97% (z12, *Figure 101, B*) soit près de 5 fois supérieur. Si un tiers des surfaces ne dépassent pas les 4,3% de rendement (z1, z3-z5 et z7, *Figure 101, B*), il s'avère que 6 surfaces ont des rendements compris entre 7,0 et 13,6% (z2, z6 et z12-z15, *Figure 101, B*). Dans la deuxième parcelle (Voglans), la même tendance est observable. La différence entre les rendements moyens le plus faible (z2, *Figure 101, B*) et le plus élevé (z1, *Figure 101, B*) pour la partie aérienne est significative (respectivement 1,76 ± 0,33% et 8,24 ± 1,11%).

Par ailleurs, en comparant les deux moyennes des parties aériennes, de l'intégralité des surfaces des deux localisations géographiques, elles sont globalement similaires entre elles 6,59 ± 3,30% pour 5,00 ± 2,44%. Enfin, pour les rhizomes de Voglans, six des 10 surfaces (z1, z5-z8 et z10) ont des rendements moyens proches entre eux en considérant les écarts types qui se chevauchent (variant entre 6,8% et 9,7%). Sur z2, z3 et z9, les plus fortes valeurs de rendements moyens sont obtenues soit respectivement 12,14 ± 1,83%, 10,61 ± 1,55% et 12,59 ± 2,01%. La z4 est la seule surface se distinguant clairement des autres avec un rendement moyen ne dépassant pas les 2,6%, comparable à celui obtenu avec la partie aérienne de cette même z4.

Ces résultats suggèrent que i) selon l'activité biologique visée, les organes aériens peuvent être rassemblées entre eux et ii) les parties aériennes de *F. japonica* d'une part et ses rhizomes d'autre part, provenant de localisations différentes du territoire Savoie Mont Blanc pourraient être rassemblées dans le cadre d'une valorisation chimique, au stade de développement étudié.

C. VARIABILITE PHYTOCHIMIQUE D'*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA*

1. VARIABILITE POLYPHENOLIQUE : INFLUENCE DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE

L'influence de la localisation géographique sur la composition polyphénolique d'*A. artemisiifolia* a également été étudiée. Les deux parcelles examinées étaient celles de Cruet et Hauteluce. Les feuilles provenaient également de Cruet *Figure 102, F*. Deux plaques (n°1 et n°2), sur laquelle ont été déposés les extraits de ses

organes (*Figure 102*) ainsi que deux standards (acides 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA), ont été soumises au logiciel rTLC pour les traitements statistiques des échantillons. Quatre ACPs avec correction de ligne de base ont été réalisées (*Figure 103*).

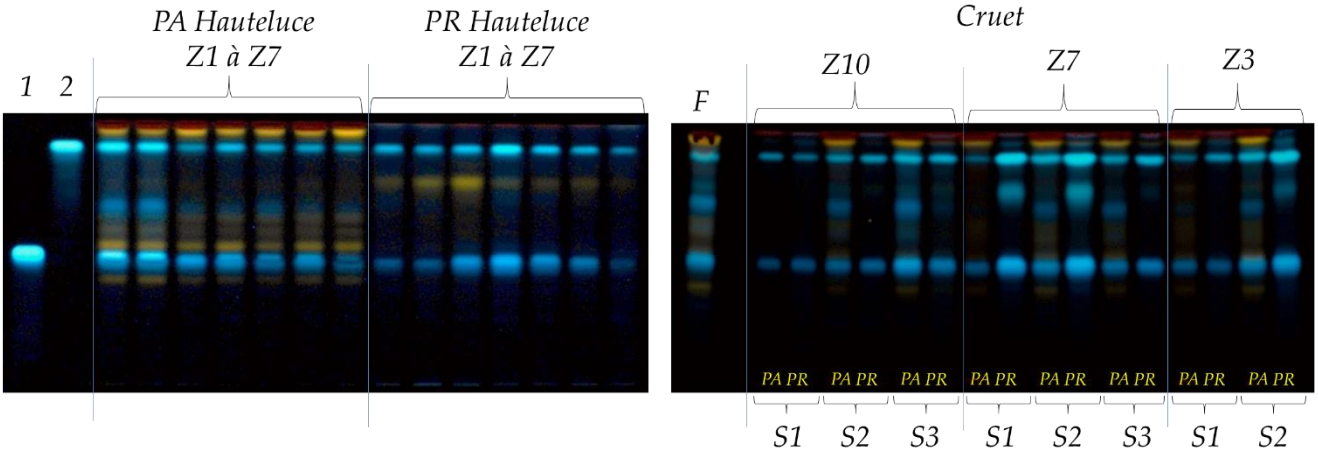


Figure 102. Plaques HPTLC réalisées pour étudier l'influence de la localisation géographique chez A. artemisiifolia. A gauche : plaque n°1 et à droite plaque n°2. PA = partie aérienne = feuilles+tiges et PR = partie racinaire = racines. Z = zones. Luminosité augmentée sur la plaque n°1 via le logiciel VisionCATS. 1 = acide 5-caféoylquinique et 2 = acide 3,5-dicaféoylquinique. S1 à S3 = Stades de croissance 1 à 3. Systèmes d'élution et de révélation NEU-PEG associés à la famille des composés phénoliques.

Les différents organes (*Figure 102, PA et PR*) d'*A. artemisiifolia* possèdent des compositions polyphénoliques relativement proches entre elles, comme ce qui avait été constaté aux dans la première partie de travaux *I. F. 3*. Bien que les acides 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA soient communs aux organes, plusieurs composés peuvent néanmoins être différenciants (spots orangés ou encore rouges présents dans l'organe aérien mais pas dans celui racinaire). Les feuilles ont un profils polyphénolique proche de la partie aérienne (*Figure 102, F et PA*). La composition de l'extrait de feuilles ressemble davantage à celles des parties aériennes provenant d'Hauteluce (en comparaison avec Cruet). Pour chaque organe, l'ensemble des empreintes polyphénoliques sont semblables entre elles avec néanmoins des spots aux mêmes *Rfs* d'intensités irrégulières.

L'ACP des échantillons de Hauteluce (*Figure 103*, plaque n°1 à gauche) conduit à deux regroupements correspondant respectivement aux extraits de parties aériennes et aux extraits de racines. Les deux acides sont aux extrémités de l'ACP et de part et d'autre des groupements. Un co-dépôt aurait été plus pertinent pour correspondre plus aux profils polyphénoliques des organes qui contiennent les deux. Dans cette expérience le pourcentage d'explication de la variabilité est de 85,6%. Les groupes se séparent différemment selon la composante 2 de ce qui a été observé dans la *section IV. B. 1.* précédente chez *F. japonica*. En effet, les empreintes polyphénoliques des deux typologies d'organes sont particulièrement proches, comme interprété lors de l'examen visuel. Ceci n'aide pas à avoir une séparation prononcée des organes. L'ACP des mêmes échantillons (*Figure 103*, plaque n°1 à droite) mais cette fois si réalisée à partir de la photographie retravaillée a permis une distinction plus importante des deux organes. En effet, le pourcentage d'explication de la variabilité est alors passé à 88,5% et la séparation des organes s'en voit nettement améliorée (ellipses séparées entièrement).

Pour l'ACP relative à Cruet (*Figure 103*, plaque n°2), la proximité entre les différents échantillons est également observable. La séparation des deux types d'organes se fait selon la seconde composante avec une variance faible de 5,9%. Les deux ellipses sont particulièrement diffuses et se chevauchent entre elles, confirmant à nouveau les observations visuelles des profils polyphénoliques des parties de la plante très proches entre eux. La diffusivité peut également témoigner de différences de compositions entre les extraits de stades de développement distincts.

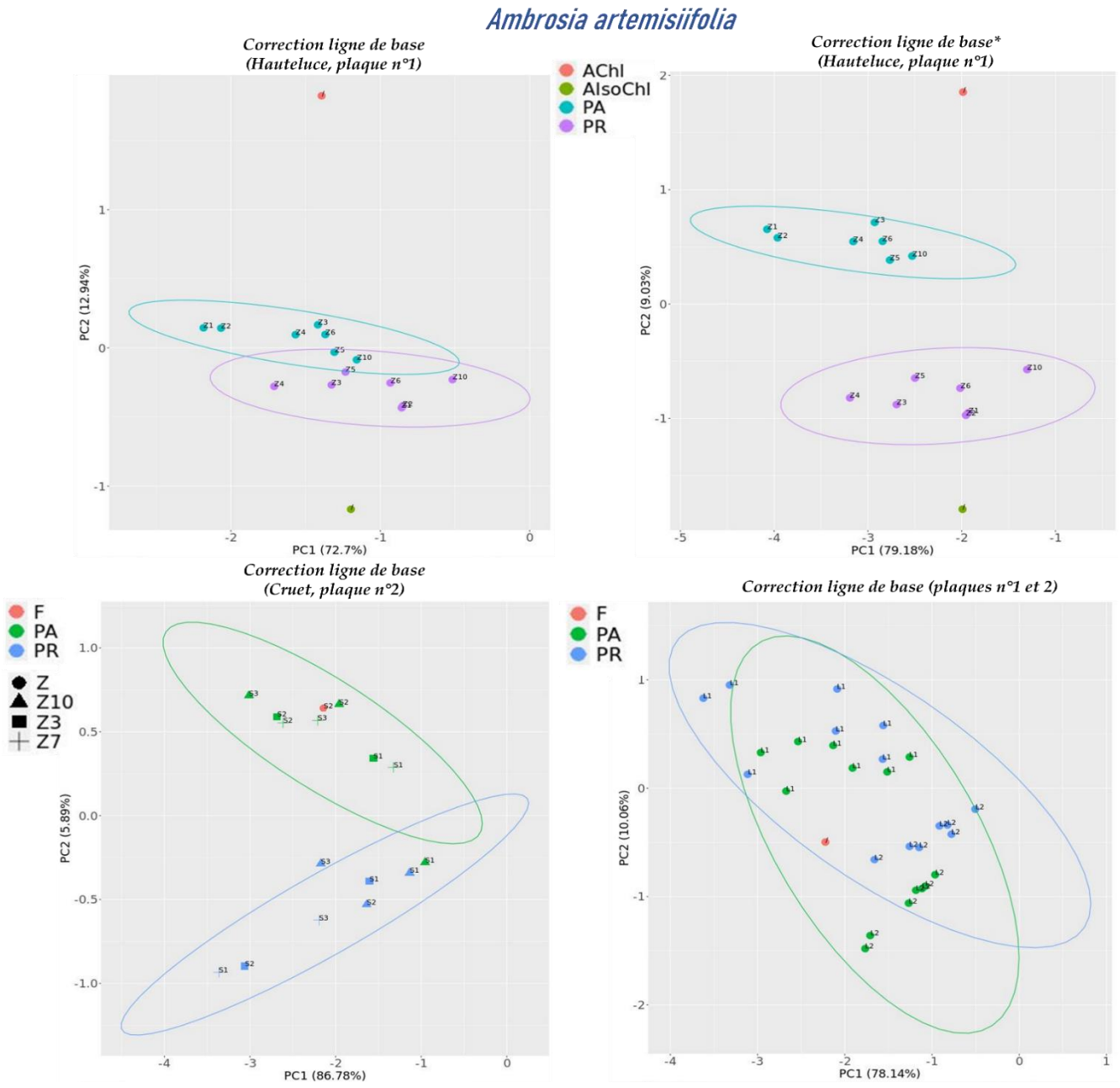


*Figure 103. Analyse en composantes principales des différents organes d'Ambrosia artemisiifolia (feuilles ou F ; partie aérienne (feuilles+tiges) ou PA et partie racinaire ou PR). Z = zone. S1-S3 correspondent aux stades de développement 1 à 3. Correction de la ligne de base appliquée. *Signifie que la luminosité a été augmentée.*

Dans la *Figure 102* en effet, la composition en composés polyphénoliques d'un stade à l'autre peut variée. Par exemple, en regardant plus en détail la z10 de Cruet, il s'avère que la composition du stade levée de la partie aérienne se distingue de celles des deux autres stades (spot bleu *Rf*0,72 et spot orange apolaire *Rf*0,95 non présents au premier stade). Il apparaît à la lecture de l'analyse multivariée, que les extraits des parties aériennes du stade levée sont moins proches du reste du regroupement (stades végétatifs 2 et 3) et qu'ils s'assimilent préférentiellement au groupe des racines. (*Figure 102*, z10 stade levée). L'extrait de feuilles semble quant à lui proche des stades végétatifs plus avancés des extraits de parties aériennes, confirmant les interprétations visuelles.

La dernière analyse multivariée (*Figure 103*, plaques n°1 et 2) se base sur le rassemblement des données obtenues avec les deux plaques et donc les deux localisations géographiques. Les deux échantillons des standards ont été retirés dans ce cas d'étude. Par rapport aux analyses précédentes menées sur *A. artemisiifolia*, il n'est plus du tout possible de séparer clairement les deux organes aérien et racinaire. Il y a plutôt une séparation en fonction de la plaque considérée selon la composante 2 avec une variance de 10,1%.

En conlusion de cette section, les divers extraits d'*A. artemisiifolia* provenant de localisations différentes du territoire Savoie Mont Blanc ont des compositions polyphénoliques particulièrement proches entre elles, pouvant justifier leur rassemblement dans le cadre d'une valorisation chimique simplifiée.

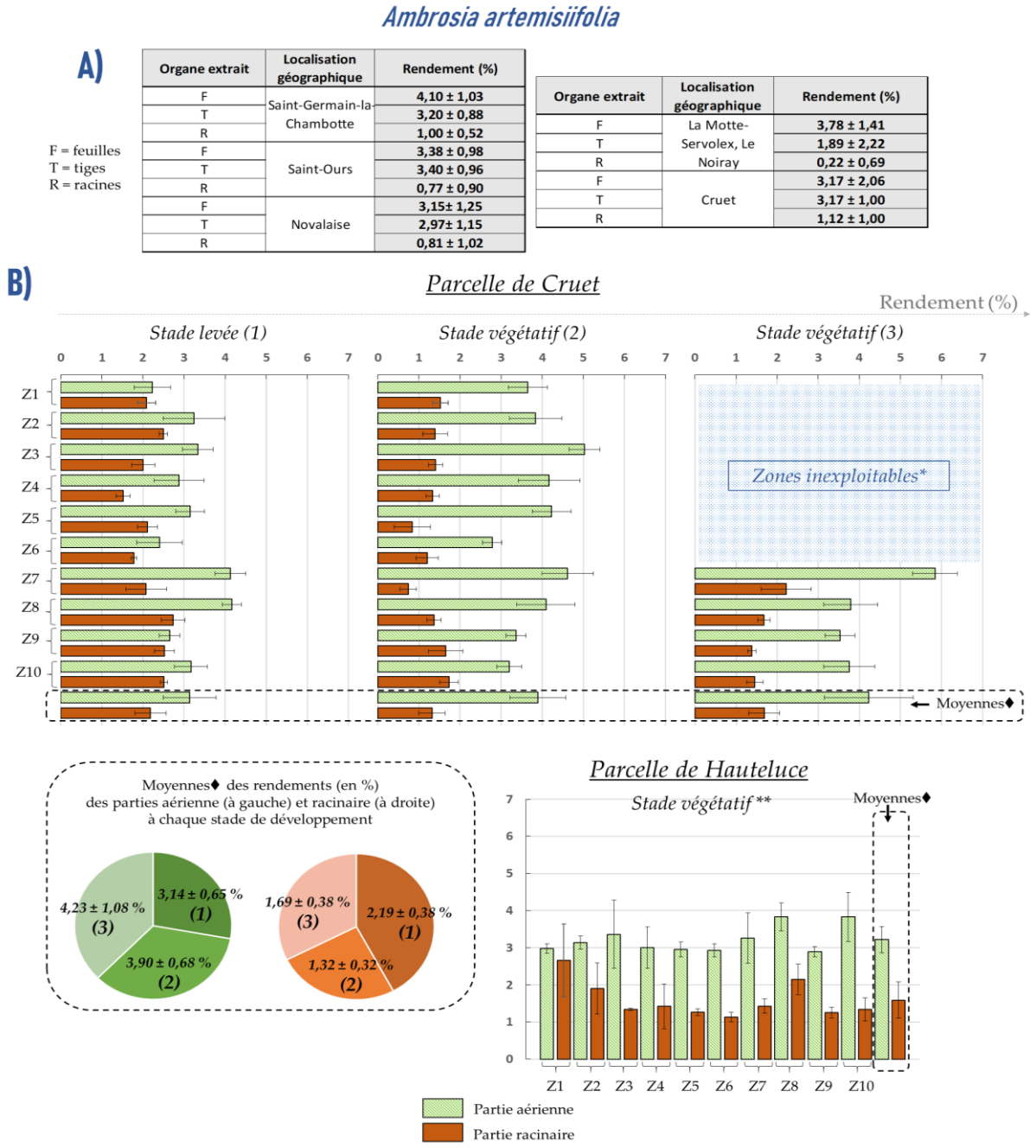
2. IMPACTS DE L'ORGANE, DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE ET DU STADE DE DEVELOPPEMENT SUR LES RENDEMENTS D'EXTRACTION

Les impacts de l'organe, de la localisation géographique ainsi que du stade de développement sur les rendements globaux d'extraction ont été étudiés chez *A. artemisiifolia*. La *Figure 104, A* présente pour ses différents organes (feuilles, tiges, racines) les rendements d'extraction moyens obtenus par localisation géographique. La *Figure 104, B* quant elle montre les rendements d'extraction moyens obtenus par organe et par zone de prélèvement des deux parcelles Hauteluce et Cruet.

Les résultats de la *Figure 104, A* montrent des rendements d'extraction moyens par organe considéré comparables d'une localisation géographique à l'autre. Les racines sont l'organe qui présente les plus faibles rendements moyens des différents organes (1%). Les rendements moyens des feuilles et des tiges sont très proches entre eux. Les rendements moyens des organes aériens séparés sont du même ordre de grandeur que ceux observés des parties aériennes (*Figure 104, B*).

Chez *A. artemisiifolia*, ceux sont les parties aériennes qui engendrent les meilleurs rendements (*Figure 104, B*), peu importe le stade de croissance et la localisation géographique considérés. Pour cet organe, la quantité de matière extraite en fonction du stade de développement de l'espèce varie légèrement. Les résultats *Figure*

104, B suggèrent effectivement que plus *A. artemisiifolia* croît plus les rendements moyens obtenus sont élevés. Dans la parcelle de Cruet, une hausse nette des valeurs de rendements est observable entre le stade de levée et le stade végétatif intermédiaire pour les surfaces en commun z1 à z6. La z1 par exemple passe de 2,23 ± 0,44% à 3,65 ± 0,47%. En regardant cette fois-ci les racines au fur et à mesure que la plante grandit, leur conduite est différente. Il s'avère que les quantités de matière extraite suivent une courbe parabole (écarts types semblables). C'est alors le stade végétatif (2) qui possède le rendement moyenné de l'ensemble des z1-z10 le plus faible soit 1,32 ± 0,32%. Le plus fort rendement présenté est alors observé au stade de levée avec une valeur de 2,19 ± 0,38%. Enfin, les comportements des deux types d'organes intra-parcelles sont globalement proches entre eux.



Organe extrait	Localisation géographique	Rendement (%)
F	Saint-Germain-la-Chambotte	4,10 ± 1,03
T		3,20 ± 0,88
R		1,00 ± 0,52
F	Saint-Ours	3,38 ± 0,98
T		3,40 ± 0,96
R		0,77 ± 0,90
F	Novalaise	3,15± 1,25
T		2,97± 1,15
R		0,81 ± 1,02

Organe extrait	Localisation géographique	Rendement (%)
F	La Motte-Servolex, Le Noiray	3,78 ± 1,41
T		1,89 ± 2,22
R		0,22 ± 0,69
F	Cruet	3,17 ± 2,06
T		3,17 ± 1,00
R		1,12 ± 1,00

*Figure 104. Présentation des rendements d'extraction moyens en % (n = 6) obtenus : A) des organes de A. artemisiifolia dans chaque localisation géographique : B) par zones pour les deux organes d'A. artemisiifolia. Z = zone. Les moyennes ♦ correspondent aux moyennes de l'ensemble des zones par organe. *Des intempéries ont détruits les plants se situant dans les zones 1 à 6. **Stade végétatif entre le stade 2 et 3. Partie aérienne composée de feuilles et tiges et partie racinaire des racines.*

Pour la seconde parcelle expérimentale à Hauteluce, les rendements moyennés des organes aériens et racinaires sont respectivement de 3,22 ± 0,36% et 1,59 ± 0,49%. Ils se rapprochent de ceux observés au stade végétatif (2) de Cruet. La collecte de la plante invasive sur Hauteluce a été organisée et réalisée au même moment que la dernière récolte réalisée sur Cruet (stade végétatif (3)). Cependant à Hauteluce, la plante avait un stade de développement moins avancé et une taille moindre en comparaison de Cruet. L'altitude de la parcelle d'Hauteluce (1150 m) est environ 3 fois supérieure à celle de la parcelle de Cruet (360 m). Ce paramètre pourrait impacter la croissance d'*A. artemisiifolia*.

Pour conclure d'une part, selon l'activité biologique visée, les organes aériens peuvent être rassemblées entre eux. D'autre part, ses parties aériennes et souterraines de localisations géographiques différentes pourraient être rassemblées afin d'être valoriser chimiquement. Cependant, il se pourrait que les rendements globaux puissent être légèrement diminués en particulier pour l'organe aérien si les parcelles associées se situent à une altitude avoisinant les 1100 m.

D. VARIABILITE PHYTOCHIMIQUE DE *SOLIDAGO CANADENSIS*

1. VARIABILITE POLYPHENOLIQUE : INFLUENCE DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE

L'influence de la localisation géographique sur la composition polyphénolique de *S. canadensis* a aussi été étudiée. Les deux parcelles examinées étaient celles de de Perrignier et Veigy-Foncenex. Les feuilles et les rhizomes quant à eux provenaient d'Yvoire *Figure 105, F et R*. Deux plaques (n°1 et n°2), sur laquelle ont été déposés les extraits de ses organes (*Figure 105*) ont été soumises au logiciel rTLC pour les traitements statistiques des échantillons. Trois ACPs ont été réalisées (*Figure 106*) : la première sans correction à partir des plaques n°1 et n°2 (*Figure 106, A*), la seconde avec correction ligne de base à partir de la plaque n°1 (*Figure 106, B*) et la dernière avec correction ligne de base à partir de la plaque n°2 (*Figure 106, C*).

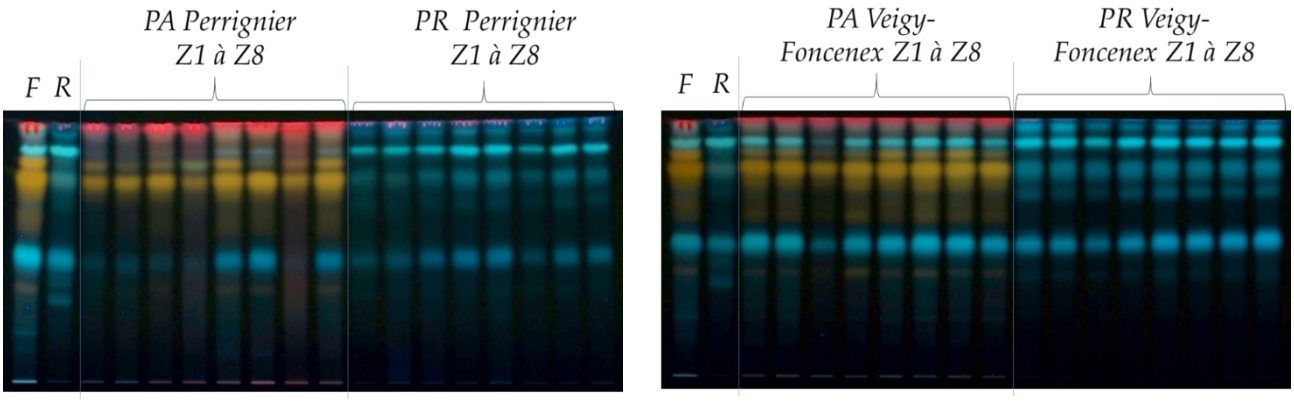


Figure 105. Plaques HPTLC réalisées pour étudier l'influence de la localisation géographique chez S. canadensis. A gauche : plaque n°1 et à droite plaque n°2. PA = partie aérienne = feuilles+tiges+fleurs et PR = partie racinaire = rhizomes. Z = zones. Systèmes d'élution et de révélation NEU-PEG associés à la famille des composés phénoliques.

Les divers organes (*Figure 105, PA et PR*) de *S. canadensis* possèdent des compositions polyphénoliques différentes entre elles avec cependant des composés communs, comme ce qui avait été constaté dans la première partie de travaux *I. F. 3*. Si pour la parcelle de Veigy-Foncenex, les deux acides 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA sont parfaitement visibles dans l'ensemble des organes déposés, pour la parcelle de Perrignier, ces composés sont notamment présents dans les racines. La plupart des profils polyphénoliques des parties aériennes de cette localité en effet présente des spots d'intensité largement moindre en acides phénoliques. Pour chaque organe des deux localisations géographiques, l'ensemble des empreintes polyphénoliques sont équivalentes entre elles avec néanmoins des spots aux mêmes *Rfs* d'intensités variables. Les compositions chimiques des feuilles et des parties aériennes sont voisines (*Figure 105, F* et *PA*). Les rhizomes d'Yvoire sont proches des PR des deux autres localisations géographiques (*Figure 105, R* et *PR*) mais un spot bleuté supplémentaire est présent en son sein dans la plage des composés polaires à moyennement polaires (*Rf* <0,5).

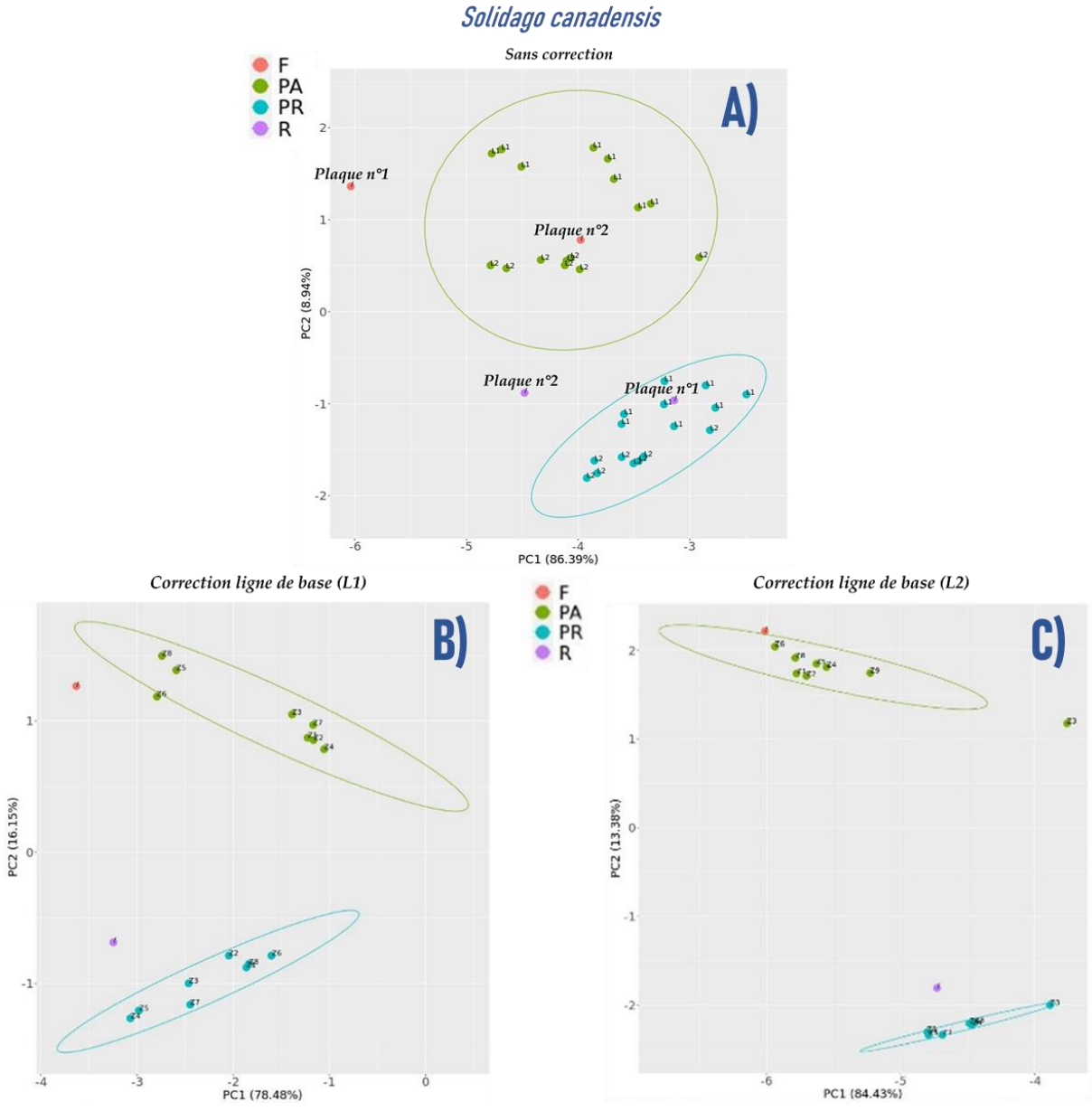


Figure 106. Analyse en composantes principales des différents organes de Solidago canadensis (Partie racinaire = PR = rhizomes ; partie aérienne = PA (feuilles+tiges+fleurs). L1 = Perrignier et L2 = Veigy-Foncenex. Z = zone et / = localisation géographique Yvoire. Les feuilles (F) et les rhizomes (R) proviennent d'Yvoire.

Sur Veigy-Foncenex, en dehors de la z3, les couples partie aérienne/rhizomes (PA/PR) de chaque zone peuvent contenir les mêmes teneurs en composés phénoliques, les intensités des spots étant particulièrement proches visuellement. La parcelle de Perrignier quant à elle présente de plus grandes disparités intra-localisation. En effet dans les parties aériennes : ce sont celles des z5, z6 et z8 qui sont les plus riches en composés phénoliques. Pour les rhizomes, ce sont ceux des z4, z5, z7 et z8 qui se distinguent par des spots d'intensité plus élevés et donc par une plus forte richesse en composés polyphénoliques.

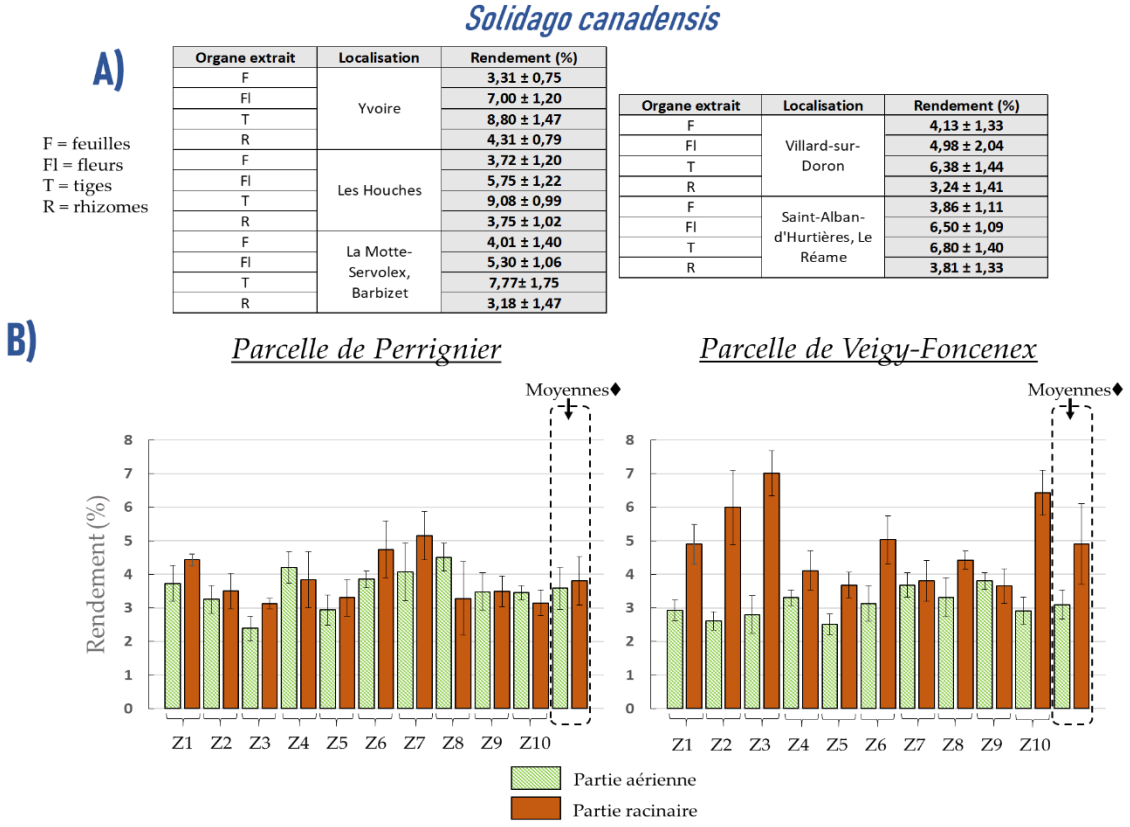
Dans la première ACP (*Figure 106, A*), la séparation des organes se fait selon la deuxième composante avec une variance de 8,9%. Les organes sont distingués et séparés entre eux en deux groupes. Les ellipses correspondantes sont assez diffuses, notamment pour le regroupement des parties aériennes de la plante, témoignant d'une disparité importante entre les profils des deux localisations géographiques. Il apparaît de plus, qu'à l'intérieur des groupes, deux sous-groupes sont présents. Ces derniers correspondent aux deux plaques HPTLC. Cet effet plaque n'a pas pu être corriger. De plus, après révélation NEU-PEG (*Figure 105*), les couleurs/teintes des spots étaient différentes pouvant expliquer ce constat. Visuellement en effet, la composition polyphénolique des deux parcelles Perrignier et Veigy-Foncenex ne sont pas similaires en tous spots. Une première différence majoritaire est repérée au niveau des parties aériennes de l'espèce. En effet, les deux acides phénoliques *Rf*0,50 et *Rf*0,90 sont abondants dans les zones de Veigy-Foncenex et dans l'extrait de feuilles mais ils sont absents ou de très faibles intensités dans les zones de Perrignier. La seconde différence concerne les rhizomes. Les intensités des différents spots d'acides phénoliques sont bien plus fortes dans les zones de Veigy-Foncenex que celles de Perrignier. D'autre part, l'extrait de feuilles est davantage proche des parties aériennes de Veigy-Foncenex et l'extrait de rhizomes d'Yvoire des rhizomes de Perrignier. L'éloignement de l'extrait de feuilles (ou de rhizomes) déposé plaque n°1 avec celui déposé plaque n°2 peut s'expliquer par la différence de couleurs/teintes des spots due à la révélation.

Dans les deux autres ACPs (*Figure 106, B* et *C*), les groupes sont établis par organe. La séparation des organes sur une seule et même plaque contribue à une meilleure séparation de ces derniers (en comparaison avec l'ACP *Figure 106, A*). L'ensemble des observations faites visuellement sont confirmées et vérifiées : à Perrignier les surfaces de prélèvement présentent plus disparités intra-localisation qu'à Veigy-Foncenex. Dans cette dernière zone, les profils polyphénoliques associés à la z3 sont les plus éloignés du reste des échantillons. La partie aérienne z3 n'est même pas incluse dans le groupe des parties aériennes.

En conclusion, ces résultats suggèrent que les parties aériennes de *S. canadensis* d'une part et ses rhizomes d'autre part, provenant de localisations différentes du territoire Savoie Mont Blanc pourraient être rassemblées dans le cadre d'une valorisation chimique, au stade de développement étudié.

2. IMPACTS DE L'ORGANE ET DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE SUR LES RENDEMENTS D'EXTRACTION

Les impacts de l'organe et de la localisation géographique sur les rendements globaux d'extraction ont été également étudiés chez *S. canadensis*. La *Figure 107, A* présente pour ses différents organes (feuilles, fleurs, tiges, rhizomes) les rendements d'extraction moyens obtenus par localisation géographique. La *Figure 107, B* quant elle montre les rendements d'extraction moyens obtenus par organe et par zone de prélèvement des deux parcelles Perrignier et Veigy-Foncenex.



Organe extrait	Localisation	Rendement (%)
F	Yvoire	3,31 ± 0,75
Fl		7,00 ± 1,20
T		8,80 ± 1,47
R		4,31 ± 0,79
F	Les Houches	3,72 ± 1,20
Fl		5,75 ± 1,22
T		9,08 ± 0,99
R		3,75 ± 1,02
F	La Motte-Servolex, Barbizet	4,01 ± 1,40
Fl		5,30 ± 1,06
T		7,77± 1,75
R		3,18 ± 1,47

Organe extrait	Localisation	Rendement (%)
F	Villard-sur-Doron	4,13 ± 1,33
Fl		4,98 ± 2,04
T		6,38 ± 1,44
R		3,24 ± 1,41
F	Saint-Alban-d'Hurtières, Le Réame	3,86 ± 1,11
Fl		6,50 ± 1,09
T		6,80 ± 1,40
R		3,81 ± 1,33

Figure 107. Présentation des rendements d'extraction moyens en % (n = 6) obtenus : A) des organes de S. canadensis dans chaque localisation géographique ; B) par zones pour les deux organes de S. canadensis. Z = zone. Les moyennes ♦ correspondent aux moyennes de l'ensemble des zones par organe. Partie aérienne composée de feuilles, tiges et fleurs. Partie racinaire correspond aux rhizomes.

Les résultats de la *Figure 107, A* montrent des rendements d'extraction moyens par organe considéré semblables d'une localisation géographique à l'autre. Les fleurs et les tiges sont les organes qui présentent les plus forts rendements d'extraction moyens de l'ensemble des organes (respectivement 6 et 8%) Les feuilles et les rhizomes quant à eux ont des rendements moyens très proches dans chacune des localisations géographiques (4%). Les rendements moyens des organes aériens séparés sont plus élevés (fleurs et tiges) que ceux observés des parties aériennes de la plante (*Figure 107, B*) ou comparables (feuilles)

Les résultats *Figure 107, B* montrent que dans les deux parcelles étudiées (Perrignier et Veigy-Foncenex), les rendements moyens de l'ensemble des surfaces des parties aériennes décrites sont proches. Ils sont tous compris entre 2,4% et 4,5%. Les valeurs des rendements moyennés des 10 surfaces témoignent aussi de cette similarité entre les localisations (Perrignier : 3,59 ± 0,63% et Veigy-Foncenex : 3,10 ± 0,43%). Concernant les rhizomes des deux localisations géographiques, les rendements moyennés des 10 surfaces sont assez similaires (chevauchement des écarts types) avec pour Perrignier 3,80 ± 0,72% et Veigy-Foncenex 4,90 ± 1,21%. Exceptés trois surfaces intra Veigy-Foncenex (z2, z3 et z10), le reste des vingt surfaces varient entre 3,1% et 5,2%. Le plus fort rendement moyen pour cet organe est celui de la z3 de Veigy-Foncenex avec 7,01 ± 0,68%.

Ces résultats suggèrent que i) selon l'activité biologique visée, les organes aériens peuvent être rassemblées entre eux et ii) les parties aériennes de *S. canadensis* d'une part et ses rhizomes d'autre part, provenant de localisations différentes du territoire Savoie Mont Blanc pourraient être rassemblées dans le cadre d'une valorisation chimique, au stade de développement étudié.

E CONCLUSION

Avoir une meilleure connaissance sur les contenus moléculaires des trois EVEE dans une perspective de valorisation chimique était nécessaire. Ainsi pour cela, plusieurs paramètres pouvant influer sur leurs compositions polyphénoliques globales (organes, localisations géographiques, stades de croissance) ont été explorés. Leurs impacts sur les rendements d'extraction ont aussi été évalués. L'étude comparative visuelle menée sur les divers organes de chaque espèce végétale provenant de différentes localisations géographiques de Savoie Mont Blanc a permis d'évaluer la répartition des composés polyphénoliques au sein des organes et d'établir des similitudes et différences entre les empreintes chromatographiques. En comparaison avec les sections précédentes dans lesquelles des études qualitatives TLC avaient également été menées (voir dans la première partie de travaux *I. F. 3*.), les profils polyphénoliques étaient somme toute analogues entre eux témoignant d'une certaine homogénéité d'une année à l'autre et entre des provenances diverses à première vue. Les extraits de même type de localisations géographiques différentes avaient des profils polyphénoliques proches entre eux avec cependant des différences observables en terme de teneurs en composés polyphénoliques. Le stade de développement étudié pour *A. artemisiifolia*, a surligné des profils similaires pour les deux stades végétatifs tandis que celui du stade de levée pouvait différer. Les extraits réalisés au stade de levée étaient en effet moins riches en polyphénols et de ce fait comporteraient moins d'actifs à valoriser.

Pour croiser les résultats obtenus avec les interprétations visuelles et aller plus loin, des analyses non-ciblées, grâce au logiciel statistiques rTLC, des échantillons ont été effectuées. Cette étude a permis de mettre en évidence les facteurs pouvant faire varier la composition polyphénolique des organes des espèces et ainsi les variations possibles en actifs. D'autres facteurs étaient non impactants. Chez *F. japonica*, les organes de même typologie ont été divisés en deux groupes parfaitement séparés. Pour les rhizomes qui n'ont pu être comparés entre eux que dans une seule et même parcelle, seule une zone se distinguait très légèrement témoignant d'une

grande proximité intra-localisation. Une disparité plus importante a été observée pour ses organes aériens. De multiples différences d'intensité de spots peuvent expliquer ce phénomène ainsi que le nombre d'échantillons plus élevés. Chez *A. artemisiifolia*, les empreintes polyphénoliques des deux typologies d'organes intra-parcelles étaient particulièrement proches entre elles, ne permettant qu'une distinction minime des deux parties de plante en deux groupements d'échantillons. Sur la parcelle de Cruet où plusieurs stades de développement de l'espèce ont pu être collectés, il a été montré que les extraits de stades distincts avaient une composition polyphénolique variable. Effectivement, les compositions polyphénoliques des extraits de parties aériennes du stade levée étaient moins proches de celles du reste du regroupement (stades végétatifs 2 et 3). Elles s'assimilaient préférentiellement au groupe des racines. L'extrait de feuilles avaient une composition polyphénolique se rapprochant de celles des stades végétatifs plus avancés des extraits de parties aériennes. Enfin, les échantillons inter-parcelles n'ont pas pu être séparés entre eux du fait de la forte ressemblance de leurs compositions polyphénoliques. Chez *S. canadensis*, les organes étaient distingués et séparés entre eux en deux groupes de façon intra-localisation mais également inter-localisation. Toutefois, à Perrignier les surfaces de prélèvement présentent plus de disparités intra-localisation qu'à Veigy-Foncenex. Quand les échantillons des deux localisations géographiques étaient rassemblés pour le traitement statistique, les ellipses étaient diffuses indiquant d'une certaine disparité au niveau des profils polyphénoliques (spots d'intensité variables), notamment des parties aériennes.

Globalement avec l'étude des rendements d'extraction, de meilleurs rendements moyens ont été obtenus à partir des rhizomes de *F. japonica* que de ses parties aériennes ; ce qui était attendu (teneurs en actifs bien plus haute dans les rhizomes ; voir la seconde partie des travaux *II. B. 6.*). Les rendements moyens des parties aériennes inter-localisation étaient relativement proches entre eux (Praz sur Arly 6,59 ± 3,30% et Voglans 5,00 ± 2,44%). Chez *A. artemisiifolia*, les rendements les plus hauts étaient pour ses parties aériennes peu importe le stade de croissance et la localisation géographique considérés. Et plus la plante grandissait, plus ces derniers étaient élevés. La quantité de métabolites extraits de ses racines était quant à elle la plus forte au stade de levée. Chez *S. canadensis*, les rendements moyens inter-localisation pour chaque organe étaient semblables ; ce qui pourrait justifier le rassemblement des organes de même type d'une localisation à l'autre. Ses rhizomes avaient de plus fortes quantités d'extractibles que les parties aériennes. Avec *F. japonica* et *S. canadensis*, le système racinaire donne accès à une grande quantité de matières extraites et à de plus fortes teneurs d'actifs. Cette accumulation préférentielle des métabolites constitutifs dans cet organe pourrait être en lien avec leurs stratégies d'invasion respectives (présence de composés allélochimiques, compétition avec les espèces locales, réserves, prévoyance de la dormance) [332,411,412].

L'ensemble des informations acquises conduisent à proposer, dans le cadre d'une valorisation chimique, de séparer la partie aérienne et les rhizomes pour *F. japonica* et pour *S. canadensis* de compositions moléculaires distinctes. Dans le cas d'*A. artemisiifolia*, ses organes aériens et racinaires de compostions phytochimiques très proches pourraient être rassemblés. Il serait de plus intéressant de collecter l'espèce à un stade de développement le plus avancé possible avant floraison pour récupérer des teneurs maximales en actifs recherchés. Enfin, le

rassemblement des organes de même type d'une localisation à l'autre est justifié pour les trois espèces. En effet, bien que ces derniers travaux ont montré des hétérogénéités de rendements d'extraction intra-parcelle, les rendements moyennés de toutes les surfaces intra-parcelle étaient comparables d'une localisation géographique à une autre. Avec cette première étude sur la variabilité, il est ainsi possible d'envisager le rassemblement de collectes de provenances diverses de Savoie Mont Blanc, la localisation géographie n'ayant à première vue pas d'impact significatif sur les rendements obtenus.

CONCLUSION GENERALE: VERS LA MISE EN PLACE D'UNE FILIERE DURABLE DE VALORISATION CHIMIQUE?

L'implantation d'espèces exogènes est devenue en quelques décennies l'une des principales causes d'érosion de la biodiversité à l'échelle mondiale [1]. Associées aux divers changements globaux, ces invasions biologiques sont de plus en plus préoccupantes [4], ayant souvent des conséquences négatives multiples et interdépendantes. En réponse à l'urgence écologique mais également l'enjeu sociétal, préserver et restaurer la biodiversité est primordial. Le territoire Savoie Mont Blanc se trouve impacté par les invasions biologiques et notamment par les espèces végétales exotiques envahissantes (EVEE) [15,16]. Leur gestion au sein des Savoies engendre non seulement des dépenses considérables mais également d'importantes quantités de rémanents. Ces derniers représentent une contrainte systématique pour les différents acteurs et gestionnaires territoriaux, responsables de leur traitement et devenir. Le plus souvent, ces rémanents sont destruits sans qu'aucune voie de valorisation ne soit envisagée [17]. L'absence d'alternatives de traitement de ce type de plantes suite aux pratiques de gestion actuelles, a conduit à une réflexion sur les différentes voies de valorisation possibles des EVEE.

Le but principal de ces travaux était de valoriser chimiquement des EVEE préoccupantes sur le territoire Savoie Mont Blanc. Trois espèces au comportement envahissant avéré [16] (*Fallopia japonica* ou *F. japonica*, *Ambrosia artemisiifolia* ou *A. artemisiifolia* et *Solidago canadensis* ou *S. canadensis*) ont été sélectionnées. Le domaine cosmétique et santé étant particulièrement demandeur de produits naturels innovants à l'efficacité démontrée, des valorisations dermo-cosmétiques et nutraceutiques ont été envisagées pour ces plantes.

Le premier objectif de ces travaux était de cribler et évaluer les activités biologiques des trois EVEE afin de mettre en évidence les organes ou parties des espèces les plus prometteurs selon l'activité biologique considérée. L'éthanol a été choisi comme solvant d'extraction car il est considéré comme non toxique, de qualité alimentaire, peu coûteux et respectueux de l'environnement. Si les activités antioxydantes des trois espèces ou encore l'activité anti-tyrosinase chez *F. japonica* ont souvent été étudiées auparavant, c'est la première fois où ces plantes ont été examinées pour leurs potentiels sur les cibles dermo-cosmétiques visées (hyaluronidase, élastase, collagénase et tyrosinase). Plusieurs dosages de l'activité antioxydante (CUPRAC, chélation au fer, xanthine oxydase) sont également venus compléter la littérature existante notamment chez *A. artemisiifolia* où très peu de données étaient disponibles. Les trois EVEE présentent un intérêt d'application dans les secteurs d'activité visés. Toutes sont de bons candidats antioxydants. Les activités antioxydantes observées sur les divers

organes peuvent être liées à leurs teneurs en flavonoïdes et composés polyphénoliques totaux. Sur l'ensemble des cibles enzymatiques, *F. japonica* dans son entièreté est celle qui a montré le plus fort potentiel inhibiteur, dépassant quelques fois même ceux des témoins positifs. Elle a une très forte activité anti-collagénase et des activités anti-hyaluronidase et anti-élastase modérées. Les propriétés anti-hyaluronidase, anti-élastase et anti-collagénase sont chez *A. artemisiifolia* respectivement modérée, faible et modérée tandis que chez *S. canadensis* elles sont faible, faible et modérée. Ces deux plantes par ailleurs ont montré des effets surprenants activateurs sur les cibles élastase et collagénase. Toutes les espèces enfin avaient de faibles capacités anti-tyrosinase. A la vue des potentiels faibles à modérés anti-hyaluronidase des extraits éthanoliques bruts d'*A. artemisiifolia* et de *S. canadensis* et des observations faites sur la hyaluronidase en particulier, il a été question de tester leurs potentiels sur la lipase, cible enzymatique dite complémentaire à la hyaluronidase [101,441,442]. L'ensemble des organes des deux plantes ont montré, et ce pour la première fois sur la lipase pancréatique, des propriétés anti-lipases très intéressantes. Ils avaient néanmoins des comportements différents sur cette enzyme. Si les activités pouvaient être comparables ou légèrement supérieures à celle du puissant médicament synthétique commercialisé *Orlistat* dans le cas d'*A. artemisiifolia*, la partie aérienne et les rhizomes de *S. canadensis* ont présentés d'impressionnants et prometteurs pouvoirs inhibiteurs. Les rhizomes de *S. canadensis* étaient de loin les plus actifs (à 100 µg/mL, inhibitions de 82,3% et pour *Orlistat* de 11,2%). Ainsi de nouvelles voies de valorisation de ces espèces problématiques en Savoie Mont Blanc sont proposées. La plupart de ces extraits pourraient être valorisés entant qu'ingrédients actifs dermo-cosmétiques et/ou nutraceutiques. Des études futures *in vitro* et *in vivo* devraient être envisagées afin d'évaluer les toxicités de ces différents extraits.

Le second objectif de ces travaux consistait à identifier les principales molécules pouvant être responsables des activités biologiques observées. Les principaux antioxydants chez *F. japonica* étaient l'acide chlorogénique, la quercitrine, la catéchine gallate, la polydatine, l'émodine et ses dérivés, le resvératrol et la torachrysone glucoside. Chez *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*, plusieurs antioxydants (acides phénoliques dont les 5-*O*-caffeoylquinique ou 5-*O*-CQA et 3,5-dicaffeoylquinique ou 3,5-DCQA ou encore dérivés de quercétine et lutéoline) ont également été caractérisés. Par ailleurs, le traitement statistique des échantillons des organes à trois stades de croissance différents d'*A. artemisiifolia* a notamment montré, et ce pour la première fois, que le passage du stade levée à végétatif était caractéristique et induisait une différence d'activité antioxydante positive significative pour la partie aérienne de cette EVEE. Il était plus difficile de conclure quant à la répartition de l'activité antioxydante au sein de ses racines au cours de leur développement. L'ensemble des organes récoltés intra-localisation savoyarde d'*A. artemisiifolia* pourraient de ce fait être rassemblés. Les 2ème et 3ème stades de développement seraient à privilégier lors de la récolte pour ce type de valorisation (activité antioxydante). Pour la première fois pour les trois EVEE, l'approche HPTLC-Bioautographie/MS a permis d'identifier les principaux inhibiteurs de la tyrosinase. Chez *F. japonica*, ils étaient identiques à ceux antioxydants. Chez *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*, ont pu être identifiés comme inhibiteurs de la tyrosinase les acides 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA, la lutéoline, acide citrique ou quinique ; plusieurs flavonoïdes dont l'afzéline et la quercitrine ainsi que la solidagénone. Ce dernier composé a été identifié pour la première fois comme actif anti-tyrosinase.

Afin de dresser des relations 'structure-activité dermo-cosmétique', des standards représentatifs sélectionnées ont été criblés et évalués de façon identiques à ce qui avait été réalisé sur les extraits bruts. Chez *F. japonica*, le meilleur inhibiteur de la hyaluronidase, de l'élastase et de la collagénase était l'émodine, tandis que le resvératrol avait le pouvoir le plus fort anti-tyrosinase. Le resvératrol inhibait par ailleurs un peu plus que la polydatine, sa forme glucosylée, sur les quatre cibles. L'activité la plus intéressante pour l'ensemble des molécules testées était sur la collagénase, comme avec les divers extraits examinés de *F. japonica*. De plus, il a été montré dans ces travaux que des teneurs maximales en ces trois composés (émodine, resvératrol et polydatine) pouvaient être obtenues avec l'extrait de rhizomes de l'espèce (60/40 ; *v/v* ; EtOH/H_2O). Des études futures *in vitro*, *in vivo* et *in silico* devraient être envisagées afin d'évaluer les activités dermo-cosmétiques de tels actifs et leurs toxicités. La composition phytochimique de l'extrait enrichi en actifs devrait faire l'object d'une nouvelle évaluation approfondie ; fonction des nouvelles activités biologiques observées.

Chez *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*, ceux sont les deux acides 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA communs et majoritaires dans tous les extraits des deux EVEE, ainsi que leur mélange en proportions égales qui ont été examinés sur les cibles. Sur la hyaluronidase, les comportements des extraits bruts observés ne pouvaient pas être directement liés à l'abondance des deux acides. Néanmoins, l'acide 3,5-DCQA serait un meilleur inhibiteur de cette cible que le 5-*O*-CQA. Sur l'élastase, les activités résiduelles des divers extraits bruts ont pu être corrélées avec les efficacités observées avec les deux composés. Sur la collagénase, les deux acides ont eu un comportement très différent. L'acide 5-*O*-CQA était le plus efficace contre la cible. Les efficacités observées des extraits bruts quant à elles, n'ont pas pu être corrélées uniquement avec l'abondance des deux acides phénoliques. Enfin, sur la tyrosinase, une synergie entre les deux composés permettrait d'avoir une inhibition augmentée sur cette cible.

Dans le secteur nutraceutique, les 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA ont montré un potentiel similaire à celui de l'*Orlistat*. Il apparaissait que les divers dérivés de l'acide caféoylquinique présents dans les rhizomes de *S. canadensis* contribuaient activement à son activité anti-lipase robuste. De plus, une synergie potentielle entre les acides phénoliques et le flavonol quercitrine, majoritairement trouvé dans la partie aérienne de *S. canadensis*, pourrait se produire et expliquer l'intrigant et prometteur pouvoir inhibiteur de cet extrait également. Il serait important de vérifier avec des essais supplémentaires les effets anti-lipase de ces composés, évaluer leurs effets synergiques potentiels ainsi que leurs toxicités éventuelles. Des investigations complémentaires englobant des tests *in vitro*, *in vivo*, et même des essais *in silico*, devraient être menées en suivant de ces travaux pour déterminer les effets biologiques de ces extraits de plantes et composés d'intérêt (dérivés d'acide caffeoylquinique et quercitrine) sur d'autres cibles digestives enzymatiques (α- et β-glucosidase, α-amylase). En particulier, il faudrait explorer les effets des deux organes d'*A. artemisiifolia* car ces parties de plantes restent très peu étudiées. Il est d'autre part important de noter que même s'il s'agit de produits naturels, l'ingestion de plantes peut présenter des risques et mettre en danger la vie des consommateurs s'ils n'ont pas été approuvés par des organismes reconnus comme médicaments/suppléments.

Des hypothèses ont pu être émises pouvant favoriser les efficacités observées des extraits éthanoliques (obtenus par MAE) chez *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*, en relation avec la présence des acides phénoliques prédominants (5-*O*-CQA et 3,5-DCQA) et leur abondance relative. Afin d'enrichir les extraits de partie aérienne d'*A. artemisiifolia* et de rhizomes de *S. canadensis*, deux plans d'expériences pour surfaces de réponse ont été réalisés. Plusieurs paramètres d'extraction par MAE pouvant influencer les quantités d'extractibles (rendement d'extraction) des deux EVEE et plus particulièrement les teneurs des deux actifs principaux, pouvant impacter les activités biologiques visées, ont ainsi été étudiés pour la première fois. L'organe en lui-même a eu peu d'influence sur le rendement d'extraction. Une proportion en eau dans le ratio H_2O/EtOH élevée, une température élevée, une puissance élevée étaient autant de paramètres qui facilitaient significativement cette réponse. Chez *A. artemisiifolia*, un temps court d'extraction a amélioré le rendement tandis que chez *S. canadensis*, plus le temps d'extraction était important, meilleur était le rendement d'extraction. Pour les deux EVEE, concernant la teneur en 5-*O*-CQA, la proportion en eau ajoutée à l'EtOH ne devait pas dépasser les 30% pour extraire le maximum de ce composé. Concernant la teneur en 3,5-DCQA cette fois-ci, la proportion en eau ajoutée à l'EtOH (ratio H_2O/EtOH) devait être égale à zéro (%) pour extraire le maximum de ce second composé. Pour les deux acides pris indépendemment, le temps d'extraction et le volume de solvant nécessaires étaient relativement faibles pour leurs extractions, ce qui est intéressant en terme d'économies d'énergie et de consommation de solvants. Par ailleurs, plus la température était élevée, meilleure était leurs extractions. Cependant il est important de prendre en compte que la température joue sur la stabilité des acides caféoylquiniques. Le 3,5-DCQA s'isomérise facilement tandis que le 5-*O*-CQA est plus résistant à la chaleur [513]. Dans nos travaux toutefois, il s'est avéré que les acides 3,4-DCQA et 4,5-DCQA présents dans l'extrait de rhizomes de *S. canadensis* pouvaient aider aux activités anti-hyaluronidases, anti-collagénases ou encore anti-lipases globales de l'extrait éthanolique brut. Ce phénomène de dégradation thermique pourrait être bénéfique dans ces cas précis et cet aspect devrait être exploré par la suite. Enfin, plusieurs extraits issus des plans d'expérience ont satisfait aux conditions des hypothèses émises. Si l'une d'entre elle a pu être en partie vérifiée expérimentalement, des tests d'activités biologiques *in vitro* supplémentaires devraient être réalisés afin de déterminer les efficacités des extraits produits ici et vérifier/infirmer l'ensemble des hypothèses énoncées. Des études complémentaires devraient être menées afin de caractériser les différents extraits hydro-alcooliques d'intérêt et d'identifier les molécules qui n'étaient pas présentes initialement. Des tests *in silico* pourraient permettre d'identifier plus aisément les molécules responsables des activités observées et leurs toxicités. En suivant, des tests de toxicité cutanée et oculaire pourraient être envisagés. Les extraits enrichis en CQAs pourraient constituer des ingrédients à forte valeur ajoutée dans les secteurs d'activité visés.

Le troisième et dernier objectif était de renforcer les connaissances quant aux paramètres pouvant influer sur la composition chimique globale des EVEE pour les types de valorisations envisagés. Avec *F. japonica* et *S. canadensis*, le système racinaire (rhizomes) donne accès à une plus grande quantité de matières extraites et ainsi à de plus fortes teneurs en actifs potentiels que leurs parties aériennes respectives. Cette accumulation particulière des métabolites constitutifs dans cet organe pourrait être en lien avec leurs stratégies d'invasion respectives [332,411,412]. Chez ces deux EVEE, les rendements d'extraction moyens inter-localisation pour

chaque organe étaient comparables entre eux ; témoignant une certaine homogénéité dans les prévélèvements effectués. Chez *A. artemisiifolia*, les rendements d'extraction les plus hauts étaient pour ses parties aériennes peu importe le stade de croissance et la localisation géographique considérés. Plus la plante avait un stade de développement avancé, plus les rendements d'extraction étaient élevés. La quantité de métabolites extraits de ses racines était quant à elle la plus forte au stade de levée.

L'examen comparatif visuel et les analyses statistiques réalisées par TLC sur les divers organes de chaque EVEE de provenances plurielles de Savoie Mont Blanc ont permis de mettre en évidence la répartition des composés polyphénoliques au sein des organes et les variations de compositions (et donc des actifs potentiels) entre les échantillons d'une même espèce. Chez *F. japonica*, les organes de même typologie ont été divisés en deux groupes parfaitement séparés. Pour les rhizomes qui n'ont pu être comparés entre eux que dans une seule et même parcelle, seule une zone se distinguait très légèrement témoignant d'une grande proximité moléculaire intra-localisation. Une disparité plus importante a été observée pour ses organes aériens, traduisant notamment des différences de teneurs en composés. Chez *A. artemisiifolia*, les empreintes polyphénoliques des organes intra-parcelles étaient particulièrement proches entre elles, ne permettant qu'une distinction minime des deux parties de plante entre elles. Sur la parcelle de Cruet, il a été montré que les extraits de stades distincts avaient une composition polyphénolique variable. Effectivement, les compositions polyphénoliques des extraits de parties aériennes du stade levée étaient moins proches de celles du reste du regroupement (stades végétatifs 2 et 3). Elles s'assimilaient par ailleurs préférentiellement au groupe des racines. Les extraits réalisés au premier stade étaient moins riches en polyphénols et de ce fait comporteraient moins d'actifs à valoriser. Enfin, les échantillons inter-parcelles n'ont pas pu être séparés entre eux du fait de la forte ressemblance de leurs compositions moléculaires. Chez *S. canadensis*, les organes étaient distingués et séparés entre eux en deux groupes de façon intra-localisation mais également inter-localisation. Toutefois, à Perrignier les surfaces de prélèvement présentent plus de disparités intra-localisation qu'à Veigy-Foncenex. Quand les échantillons des deux localisations géographiques étaient rassemblés pour le traitement statistique, les ellipses étaient diffuses indiquant une certaine disparité au niveau des profils polyphénoliques (teneurs en composés variables), en particulier avec les parties aériennes.

Les résultats acquis avec ce travail sur la variabilité phytochimique conduisent à proposer, de séparer la partie aérienne (organes aériens non séparés) et les rhizomes pour *F. japonica* et pour *S. canadensis* qui se distinguent nettement en termes de composition. Dans le cas d'*A. artemisiifolia*, ses organes aériens et racinaires, collectés à un stade de développement le plus avancé possible avant floraison, de compositions phytochimiques très proches pourraient être utilisés conjointement comme actifs dermo-cosmétiques ou nutraceutiques. Enfin, le rassemblement des organes de même type d'une localisation à l'autre est justifié pour les trois espèces. Avec cette première étude sur la variabilité, il est ainsi possible d'envisager le rassemblement de collectes de provenances diverses de Savoie Mont Blanc. Cela pourrait permettre de fournir suffisamment de matière première, de guider les opérations de gestions, et ainsi faciliter la mise en place d'une filière de valorisation chimique des trois EVEE étudiées. Les informations recueillies sur chaque plante considérée peuvent contribuer à

une bonne régularité de l'approvisionnement et une bonne traçabilité, bien qu'il s'agisse d'espèces non cultivées. Des contrôles qualités réguliers des matières collectées (et d'activités biologiques) devraient être faits ; d'autant que lors des opérations de gestion, il est probable que les espèces proches *Fallopia* spp. se retrouvent mélangées. Bien que les *Fallopia* spp. aient des compositions phytochimiques relativement proches entre elles [115], il serait important de mener des essais complémentaires en multipliant le nombre de prelèvements de localisations géographiques et de types de terrains pluriels afin de vérifier les tendances observées.

Les travaux générés dans le cadre de cette thèse ont permis deux contributions scientifiques à comité de lecture internationale, l'une sur *F. japonica* et ses activités dermo-cosmétiques et la seconde sur les activités anti-lipases d'*A. artemisiifolia* et *S. canadensis*. L'utilisation des EVEE entant que nouvelles sources naturelles d'ingrédients fonctionnels, pourrait ainsi constituer une nouvelle alternative de traitement à l'issue des opérations de gestion. Ces travaux de valorisation constituent néanmoins des premières étapes dans le développement d'actifs dermo-cosmétique ou nutraceutique (*Figure 108*) [390].

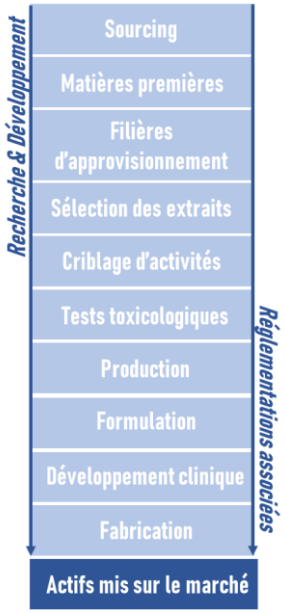


Figure 108. Grandes étapes du développement d'un actif (dermo-)cosmétique ou nutraceutique, adaptée de [390].

En effet, certains points importants restent à évaluer avant d'envisager la mise en place d'une filière de valorisation tels que les volumes disponibles sur l'ensemble du territoire à la suite des opérations de gestion, la cytotoxicité des actifs, la formulabilité des ingrédients (solubilité, décoloration sur charbon par exemple, désodorisation), la mise sur support (liquide, solide, encapsulation), la stabilité ou encore la toxicité (cutané et oculaire, effets toxiques sur la santé des consommateurs, dose autorisée/jour) [531]. Si les travaux antérieurs sur *F. japonica* et *S. canadensis* [133,324,337] ne montraient pas de toxicité particulière pour la santé humaine, une attention particulière devrait être portée sur *A. artemisiifolia*, qui avait présenté *in vivo* des effets toxiques sur les reins et le cerveau de souris [227]. Cette étape de tests toxicologiques pourrait constituer un verrous pour cette espèce dont la valorisation chimique est envisagée ici dans le secteur nutraceutique, pouvant par exemple entrer dans la composition de compléments alimentaires anti-lipases. Par la suite également, devront être pris en compte l'estimation de revient des ingrédients, l'objectivation et la formulation de l'ingrédient dans un produit fini. Enfin, les valorisations visées des trois EVEE résiduelles présupposent que les opérations de gestion générant ces rémanents se maintiennent avec le temps à l'échelle du terrioire. En fonction des demandes des consommateurs, une exploitation des zones envahies à plus grande échelle serait probablement nécessaire, appauvrissant ainsi les ressources en ces trois EVEE. Il est par ailleurs possible que la dynamique évolutive fasse apparaître un herbivore ou un pathogène des espèces ciblées comme cela est actuellement le cas en Italie par exemple pour *A. artemisiifolia* [32,43,532] ; ne permettant pas la poursuite de la filière de valorisation pour ces espèces. Ouvrir la démarche entreprise aux nombreuses autres espèces problématiques des territoires Savoie Mont Blanc et national, pourrait permettre une filière plus viable et une gestion généralisée de EVEE.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATIERES PREMIERES VEGETALES DU TERRITOIRE SAVOIE MONT BLANC

La collecte des trois matières (*F. japonica*, *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*) à l'état sauvage, a été réalisée grâce aux partenariats établis en début de thèse (voir *Figure 5*). Différentes parcelles expérimentales ont ainsi été mises à disposition pour l'étude. Sur chacune d'elles, les différents acteurs de conservation de la biodiversité ont identifié botaniquement les espèces à collecter. Pour prévenir tout risque de propagation, le soin de ne laisser aucun fragment ou résidu de plantes en particulier sur les surfaces non contaminées a été pris. Les superficies des terrains pouvaient varier de plusieurs dizaines de m^2 à un hectare.

Au cours des deux années universitaires 2020-2021 et 2021-2022, au total une vingtaine de collectes a été effectuée, soit 9 pour *F. japonica*, 6 pour *A. artemisiifolia* et 7 pour *S. canadensis* (*Figure 109*). Une collecte de *F. japonica* et 4 de *S. canadensis* ont été faites en Haute-Savoie (*Figure 109, a et A-D* ; respectivement). Tout le reste des échantillons a été prélevé en Savoie (*Figure 109, E-G, I-VI et b-i*). Les prélèvements i et G (*Figure 109*) ont été récupérés sur la commune de Saint-Alban d'Hurtières lors d'un chantier de restauration écologique de l'entreprise Equo Vivo-Vinci Construction. Les collectes ont été réalisées en été, à savoir de juin à août pour *F. japonica* et *S. canadensis* et entre juin-juillet pour la grande majorité des prélèvements d'*A. artemisiifolia*. En effet, sur la parcelle de Cruet où les différents stades de développement d'*A. artemisiifolia* ont été étudiés, des collectes ont également eu lieu en mai (voir *Figure 110*). *F. japonica* et *S. canadensis* avaient respectivement des hauteurs comprises entre 1,2 – 3,0 m et 1,0 – 1,6 m et *A. artemisiifolia* entre 0,2 – 1,1 m.

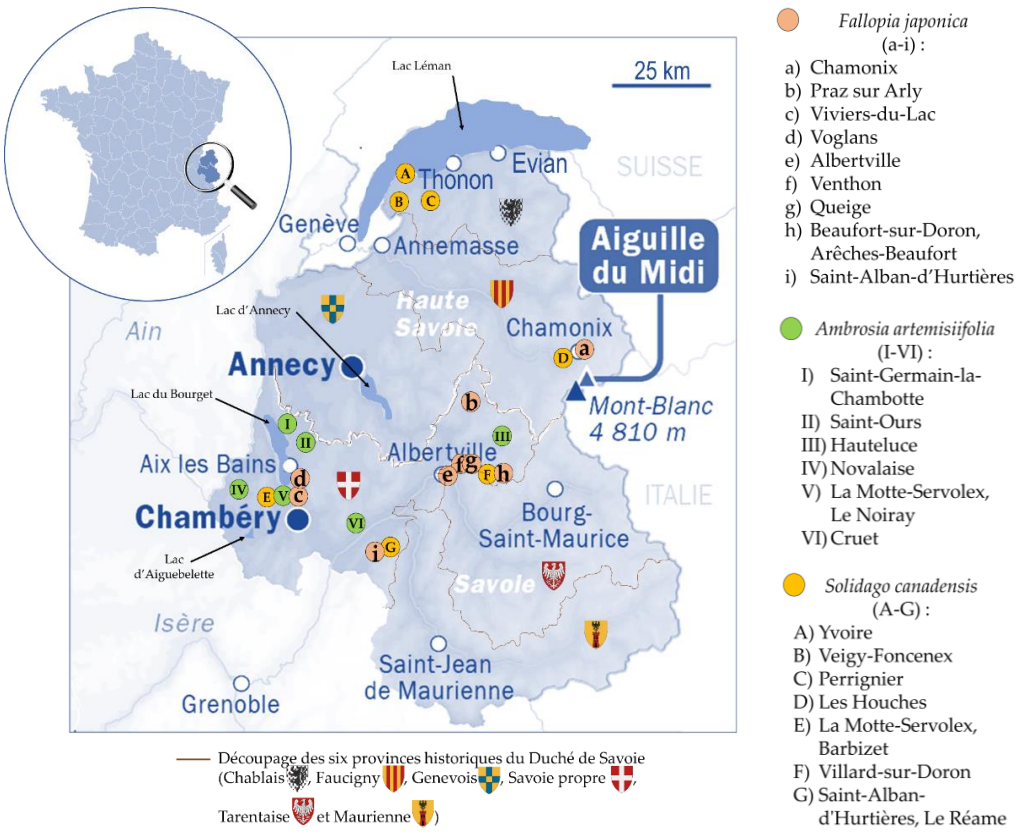


Figure 109. Carte des localisations des collectes des matières premières végétales F. japonica, A. artemisiifolia et S. canadensis sur le territoire Savoie Mont Blanc, adaptée de [402,403].

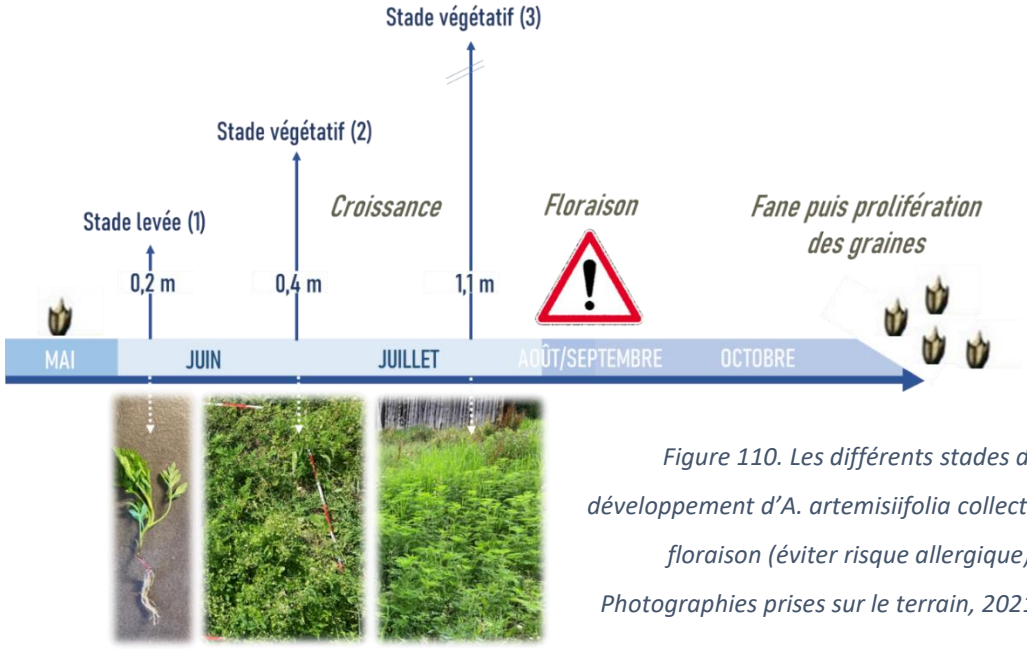


Figure 110. Les différents stades de développement d'A. artemisiifolia collectés avant floraison (éviter risque allergique). Photographies prises sur le terrain, 2021-2022.

Sur le terrain, deux stratégies de collectes des organes impliquant des découpages différents des parcelles envahies ont pu être mises en place (*Figure 111, A et B*), afin de répondre aux objectifs de la thèse. Une première stratégie de collecte (2020-2021) consistait à récupérer par arrachage manuel la matière uniquement sur la surface la plus impactée de la parcelle, arbitrairement 9 m^2 (*Figure 111, A*). Cela correspondait à environ 60-150 pieds pour les deux astéracées et une vingtaine *pour F. japonica*. Les organes frais (racines, tiges, feuilles, fleurs) ont été séparés puis nettoyés à l'eau claire. Le mode de conservation de référence était le séchage naturel (air libre, température ambiante) sur des claies en bois, situées dans un local fermé aéré à l'abri de la lumière directe du soleil. Une fois secs, les organes ont été stockés dans des sachets en papier. L'objectif était d'avoir une information moyennée par organe afin d'évaluer notamment la singularité de leurs signatures moléculaires et leurs activités biologiques respectives ainsi que de programmer/optimiser les collectes suivantes.

Une seconde stratégie (2021-2022) consistait à échantillonner la matière par arrachage manuel sur la totalité de la parcelle contaminée (*Figure 111, B*) pour être le plus représentatif possible du terrain. Ainsi dix à quinze surfaces de prélèvement réparties sur chaque parcelle, d'arbitrairement 4 m^2 pour les deux astéracées et 2 m^2 pour *F. japonica*, ont été évaluées. Le même nombre de pieds a été récupéré dans chaque surface, c'est-à-dire 50 pour *A. artemisiifolia*, 20 pour *S. canadensis* et 6 cannes avec feuilles du même massif de *F. japonica* avec les rhizomes correspondants (300-500 g frais).

Par ailleurs et uniquement sur la parcelle de Cruet, les dix surfaces de prélèvement de 4 m^2 ont été redécoupées en 4 surfaces d'1 m^2 afin de répartir au mieux les échantillonnages des 3 stades de *A. artemisiifolia*. Le même nombre de pieds a été récupéré à chaque stade, c'est-à-dire 40 au stade levée (*Figure 110, stade 1*) et 20 aux stades végétatifs (*Figure 110, stades 2 et 3*).

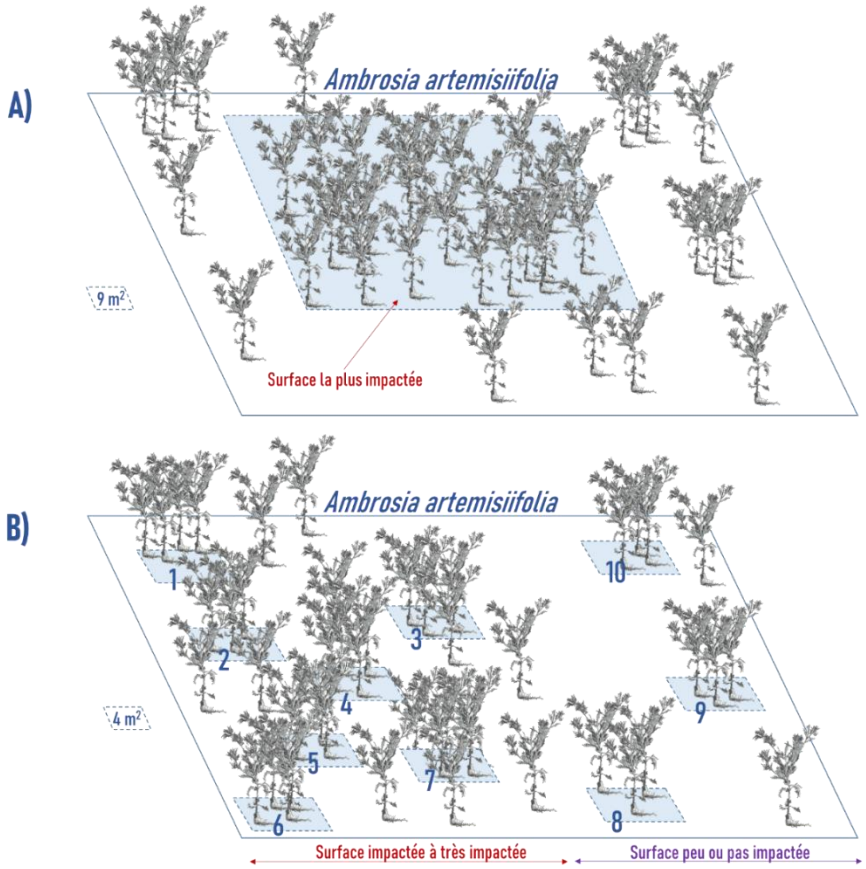


Figure 111. Exemples schématiques des découpages terrain réalisés avec A. artemisiifolia.

A) Récupération de la matière végétale sur la surface la plus impactée de la parcelle.

B) Découpage terrain en dix surfaces réparties sur la totalité de la parcelle.

Deux parcelles expérimentales par espèce végétale à deux altitudes différentes (basse altitude environ 250-400 m et haute altitude 850-1150 m) ont été explorées afin d'étudier la variabilité polyphénolique et ainsi la conservation des actifs en fonction de la localisation géographique (altitude, type de terrain, surface délimitée de prélèvement) en fonction de l'organe et du mode de conservation choisi. Les activités biologiques des organes ont également pu être comparées. Les parcelles expérimentales étaient les suivantes : Voglans (Savoie, 250 m), Praz sur Arly (Haute-Savoie, 1000 m) pour *F. japonica*, Cruet (Savoie, 360 m), Hauteluce (Savoie, 1150 m) pour *A. artemisiifolia* et Veigy-Foncenex (Haute-Savoie, 400 m), Perrignier (Haute-Savoie, 850 m) pour *S. canadensis*.

Les matières premières ont d'autre part été transportées jusqu'au laboratoire dans des *big bag* fermés hermétiquement. Les organes ont été séparées puis nettoyées à l'eau claire. Ceux de *F. japonica* et *S. canadensis* ont été ensuite séchés pendant 48 h dans le four Salvis TSW-120-ED à 50 °C. Ceux d'*A. artemisiifolia*, quant à eux, ont été séchés pendant 48 h à l'aide d'un lyophilisateur Buchi Lyovapor L-200 (*Thermo Fisher Scientific, France*). Après séchage, les matières premières ont en quasi-totalité été broyées et tamisées à 0,5 mm à l'aide d'un broyeur à couteaux universel PULVERISETTE 19 (*FRITSCH, France*). Des échantillons de l'ensemble des collectes sont ainsi conservés au laboratoire EDYTEM : soit sous forme de poudre fine soit une partie de la matière fraiche directement après collecte a été lavée puis congelée. Aucun dépôt de spécimens n'a été réalisé dans un herbier référencé.

II. REACTIFS ET SOLVANTS

Les différents produits chimiques, solvants, filtres, et kits de dosages enzymatiques ont été achetés chez Thermo Fisher Scientific (*Illkirch-Graffenstaden et Artenay, France*), Fisher Scientific (*Loughborough, UK*), VWR (*Fontenay-sous-Bois, France*), Merck (*Molsheim, France*), MedChemExpress (*Nanterre, France*), Agilent Technologies (*Waldbronn, Germany*) et Sigma-Aldrich (*Saint-Quentin Fallavier, France*). L'eau ultra pure a été produite avec un système PureLabFlex de Veolia (*Wissous, France*). Les plaques (HP)TLC, recouvertes d'une couche de gel de silice 60 F_{254} (épaisseur : 100-200 µm ; verre 10 cm x 20 cm ou aluminium 20 cm x 20 cm, coupées en deux pour les expérimentations), ainsi que les plaques de microtitration 96 puits (MTP) ont été achetées chez Merck. Pour les analyses biologiques et chromatographiques, les solvants étaient de grade HPLC usités tels quels. Les réactifs étaient tous commerciaux, aucune purification complémentaire n'a été réalisée sur ces derniers.

III. APPAREILLAGE

A EXTRACTIONS

1. MACERATION CONVENTIONNELLE

Une plaque d'agitation a été utilisée pour la mise en œuvre de la macération conventionnelle dans une fiole erlenmeyer de 25 mL couverte (24 h à 560 rpm).

2. MACERATION ASSISTEE PAR ULTRASONS

L'extraction assistée par ultrasons a été réalisée à l'aide d'un bain à ultrasons Sonorex Super RK 510H basse fréquence 35 kHz (*BANDELIN, Allemagne).* Trois types de réacteurs à savoir tube en verre 12 mL, erlenmeyer de 25 mL et tube en plastique de 15 mL ont été utilisés. Un tapis flottant à la surface de l'eau du bain (25 positions de réacteurs) a également été employés.

3. MACERATION ASSISTEE PAR MICRO-ONDES

L'extraction assistée par micro-ondes a été réalisée à l'aide d'un four à micro-ondes Milestone MicroSYNTH de 50 Hz (*Sorisole, Italie*) équipé d'un carrousel de 12 positions contenant chacune un réacteur en téflon de 100 mL ($V_{minimal\ requis}$ = 10 mL). La température a été enregistrée à l'intérieur du réacteur à l'aide d'une fibre optique insérée directement dans le réacteur. Un réacteur en quartz de 12 mL ($V_{minimal\ requis}$ = 2 mL), à placer seul au centre du four sur un support adapté, a été quelques rares fois employé.

B. DOSAGES CHIMIQUES ET ENZYMATIQUES *IN VITRO*

Les activités antioxydantes, anti-élastase, anti-collagénase et anti-tyrosinase ont été évaluées par dosages colorimétriques ou fluorimétriques en MTP. L'agitation et la lecture des absorbances ou fluorescences ont été effectuées à l'aide du lecteur de microplaques CLARIOstar Plus (*BMG Labtech*). La détermination des teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes totaux a également été faite en MTP et à l'aide du même lecteur.

C. ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

Les activités anti-hyaluronidase et anti-lipase ont été déterminées par électrophorèse capillaire (EC). L'analyse des solutions de réaction enzymatique ainsi que des extraits bruts ont été réalisées à l'aide d'un appareil PA800 Plus, équipé d'un détecteur à réseau de photodiodes et du logiciel Beckman 32 Karat (*Sciex, Redwood City, CA, USA*). Des capillaires en silice fondue dénudé (*Polymicro Technologies, Phoenix, Arizona, USA*) ont été utilisés avec une longueur totale de 0,57 m (longueur efficace de 0,47 m) et un diamètre intérieur de 50 µm. Le pH des solutions a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre portable MeterLab PHM201 (*Radiometer Analytical, Villeurbanne, France*).

D. HPTLC

Pour les analyses, des plaques TLC ou HPTLC en verre ou aluminium en gel de silice 60 F_{254} ont été employées entant que phases stationnaires. Le parc analytique TLC CAMAG (*Muttenz, Suisse*) a été usité. Il comprenait les modules suivants : Automatic TLC sampler 4 (ATS4 ; dépôts), Automatic Developing Chamber *2* (ADC2 ; élution sans contrôle d'humidité), Derivatizer (révélations chimiques et biologiques) et TLC Visualizer (photographies). Le logiciel *VisionCATS* 2.4 a été utilisé pour contrôler l'ensemble des modules. Les plaques (HP)TLC, lavées au MeOH pour éliminer les impuretés, ont été séchées pendant 2 h à 110 ° C avec la plaque chauffante numérique (DC).

E. COUPLAGE DE L'(HP)TLC A L'(HR)MS

Les zones ciblées de la plaque (HP)TLC ont été analysées *via* l'interface TLC/MS 2 non automatisée à tête d'élution ovale (4 mm x 2 mm). Cette dernière a pu être reliée directement par le biais de capillaires à l'ESI-TQ-MS (*Thermo Scientific Tsq Endura*) ou l'ESI-QqTOF-HRMS (*maXis UHR-Qq-TOF, Bruker, Brême, Allemagne*). L'élution en ligne et transport des analytes ont été réalisées avec un mélange ACN:H_2O (65:35) (*v:v*) à un débit de 200 µL/min, assurée par un système Ultimate 3 000 RSLC. Un filtre a été monté entre l'interface TLC/MS et la source d'ions. Les échantillons ont été ionisés en mode d'ionisation négatif.

- Dans le cas de l'utilisation de l'ESI-TQ-MS :

Les paramètres de la source *electrospray* étaient un « *sheath gas* » à 27, un « *auxiliary gas* » à 9, une température de la ligne de transfert à 350 °C et de vaporisation à 210 °C et une tension de l'électrode de capillaire à -2,5 kV. L'acquisition s'est fait en mode d'acquisition balayage « *Full Scan* » dans une gamme *m/z* 100–1 000 sur le premier quadripôle. Les logiciels de pilotages utilisés étaient *Xcalibur* et *Chromeleon* (*Thermo Fisher Scientific*).

- Dans le cas de l'utilisation de l'ESI-QqTOF-HRMS :

La pression du gaz de nébulisation a été réglée à 0,6 bar, le débit et la température du gaz sec ont été réglés à 7,0 L/min et 200 °C, respectivement. La tension capillaire a été fixée à 4 kV. La sélection des ions a été obtenue en mode d'acquisition balayage « *Full Scan* » dans une gamme *m/z* 50–1 650, acquis à 1 Hz. Le logiciel *DataAnalysis* 4.4 (*Bruker*) a été utilisé pour évaluer les données collectées.

F. UHPLC-UV/MS

- Dans le cas de UHPLC-UV/ESI-QqTOF-HRMS/MS :

Les analyses chromatographiques ont été effectuées à l'aide d'un système Ultimate 3000 RSLC équipé d'un échantillonneur automatique, d'une pompe binaire, d'un compartiment à colonne thermostatique et d'un détecteur à réseau de diodes (DAD), 195-800 nm (*Dionex, Germering, Allemagne*). La colonne était une Luna Omega C18 (150 mm × 2,1 mm ; 1,6 µm) (*Phenomenex, Le Pecq, France*). L'ACN et l'H_2O de grade HPLC ont été acidifiés par 0,1% d'acide formique. Les analyses des masses exactes ont été réalisées avec un spectromètre de masse maXis UHR-Qq-TOF avec une source ESI. Les échantillons ont été ionisés en mode d'ionisation négatif. La pression du gaz de nébulisation a été réglée à 2 bars, le débit et la température du gaz sec ont été réglés à 9,0 L/min et 200 °C, respectivement. La tension capillaire a été fixée à 4 kV. Les spectres de masse ont été enregistrés à 2 Hz dans la plage de 50 à 1 650 *m/z*. Toutes les données MS ont été traitées à l'aide du logiciel *DataAnalysis* 4.4.

- Dans le cas de UHPLC-UV/ESI-TQ-MS :

Le système UHPLC, la colonne ainsi que les solvants utilisés sont les mêmes que ceux du paragraphe précédent. Les analyses MS ont été réalisées avec un spectromètre de masse TQ (*Thermo Scientific Tsq Endura*) avec une source ESI. Les échantillons ont été ionisés en mode d'ionisation négatif. Les paramètres de la source *electrospray* étaient un « *sheath gas* » à 50, un « *auxiliary gas* » à 20, un « *sweep gas* » à 1, une température de la ligne de transfert à 325 °C et de vaporisation à 450 °C et une tension de l'électrode de capillaire à -3,2 kV. L'acquisition s'est fait en mode d'acquisition balayage « *Full Scan* » dans une gamme *m/z* 200–1 000 sur le premier quadripôle. Les logiciels de pilotages utilisés étaient *Xcalibur* et *Chromeleon*.

IV. CONDITIONS OPERATOIRES DES TRAVAUX REALISES

A CRIBLAGE ET EVALUATION DES ACTIVITES DERMO-COSMETIQUES DES EXTRAITS BRUTS

1. EVALUATION DE PARAMETRES INFLUENÇANT LE RENDEMENT D'EXTRACTION A PARTIR DE FEUILLES DE *FALLOPIA JAPONCA*

La matrice végétale employée pour chaque expérimentation était les feuilles de *F. japonica* provenant du Viviers-du-Lac séchées et broyées. 0,5 g de cette dernière ont été mis en contact avec des volumes différents d'EtOH afin d'obtenir des ratios de 0,5/5 ou 0,5/10. Le temps de sonication a varié entre 30 min et 90 min. 3 types de réacteurs ont été utilisés : tube en verre 12 mL, fiole erlenmeyer de 25 mL et tube en plastique de 15 mL. De plus, chaque échantillon a été réalisé en *triplicata*. Néanmoins, leur positionnement au sein du bac a varié comme décrit ci-après :

- 1ère expérimentation : échantillon placé au centre du bac sans aucun voisin ;
- 2ème expérimentation : échantillon positionné aléatoirement au sein du bac sans voisin ; et enfin
- 3ème expérimentation : échantillon disposé aléatoirement au sein du bac avec 24 voisins.

Les extraits ont ensuite été filtrés à travers un filtre PTFE de 0,45 µm D.25 mm. Ils ont été évaporés à sec sous azote pour calculer leurs rendements d'extraction (en %). Ces derniers ont été déterminés par le rapport entre la quantité de matière obtenue après extraction et la quantité de matière utilisée au départ.

Les paramètres les plus favorables selon cette étude étaient : tube en verre de 12 mL (positionnement aléatoire sur le tapis avec et sans voisins) ; ratio 0,5/5 ; 1 h de sonication. La moyenne des trois températures maximales relevées en solution correspond au bout de 60 min à 60 °C.

2. COMPARAISON DE PROFILS POLYPHENOLIQUES D'EXTRAITS DIVERS DE *FALLOPIA JAPONCA*

- Préparations des différents extraits :

Les extraits (exceptés celui réalisé par macération conventionnelle) ont été préparés selon les paramètres les plus favorables déterminés dans la section précédente et mentionnés au-dessus. La nature du solvant a été variée : EtOH, H_2O, mélange EtOH/ H_2O (80/20), mélange EtOH/ H_2O (70/30), MeOH, AcOEt et Heptane. Les extraits ont ensuite été filtrés à travers un filtre PTFE de 0,45 µm D.25 mm. Ils ont été évaporés à sec sous azote et ont été repris avec le même solvant d'extraction pour obtenir des solutions à 1 mg/mL. Les rendements (en %) ont été calculés comme précédemment.

- Analyse par TLC des composés polyphénoliques :

Les solutions ont ensuite été déposées sur une plaque TLC en verre afin d'obtenir la signature polyphénolique de chaque solution. Les conditions étaient : dépôt de 6 mm de large, espace de 4 mm entre 2 pistes, volume de 5 µL et vitesse de 50 nL/sec. La phase éluante étaient composée d'acétate d'éthyle (AcOEt), d'acide formique (AF), d'acide acétique (AcOH) et d'eau (H_2O) dans les proportions 100/11/11/27 (*v:v:v:v*), décrite précédemment [530]. L'élution a été réalisée sur une distance de 7 cm. Les plaques développées ont été séchées à température ambiante. L'étape de révélation chimique NEU-PEG a été réalisée avec le Derivatizer avec 2 mL de solution NEU puis 2 mL de solution de PEG. La détection a été faite à 366 nm.

3. TESTS DES ACTIVITES DERMO-COSMETIQUES

a) DOSAGES DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

(1) DOSAGES CHIMIQUES *IN VITRO*

L'activité antioxydante *in vitro* a été déterminée à l'aide de cinq tests colorimétriques DPPH•, ABTS•+, CUPRAC, FRAP et de chélation du fer [533] en MTP, décrits plus en détails dans les sections suivantes. Les MTP remplies ont été incubées pendant 30 min à température ambiante dans l'obscurité puis agitées (mode orbital, 30 s). Pour tous les dosages, l'étalon de référence (trolox) a été utilisé comme contrôle positif et l'EtOH comme contrôle négatif. Une solution de trolox a été préparée dans EtOH à 10 000 µg/mL puis diluée en cascade pour obtenir des solutions à 100 ; 500 ; 1 000 et 5 000 µg/mL. Les réactifs utilisés ont tous été conservés à l'abri de la lumière. Les expériences ont été réalisées en *triplicata*. Les pourcentages d'activité antioxydante ont été calculés à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = \left(\frac{\text{Abs CB} - \text{Abs Echantillon}}{\text{Abs CB}}\right) * 100$$

Où Abs CB (Contrôle Blanc) est l'absorbance d'EtOH et du réactif ; Abs Echantillon est l'absorbance de l'extrait de plante testé et du réactif ou du trolox.

i) TEST DPPH

Les tests DPPH• ont été effectués sur la base d'un protocole expérimental décrit précédemment [432]. Ainsi dans chaque puit, 10 µL d'extrait de plante à des concentrations diverses (1000, 100, 500, 1000, 5000 et 10 000 µg/mL) ou trolox ont été mélangés à 190 µL de réactif DPPH préparé à 2 000 µM dans l'EtOH. La lecture de l'absorbance a été effectuée à λ = 516 nm.

ii) TEST ABTS

Les tests ABTS•+ ont été effectués sur la base d'un protocole expérimental décrit précédemment [534]. Ainsi un mélange, composé d'une solution d'ABTS à 7 000 µM et d'une solution de persulfate à 2 450 µM, a été préparé dans la mixture EtOH:H_2O (25:75 ; *v:v*) dans la proportion suivante (1:12,5 ; *v:v*). Dans chaque puit, 10 µL d'extrait de plante à des concentrations diverses (1000, 100, 500, 1000, 5000 et 10 000 µg/mL) ou trolox ont été mélangés à 190 µL du dernier mélange ci-dessus. La lecture de l'absorbance a été effectuée à λ = 734 nm.

iii) TEST CUPRAC

Les tests CUPRAC ont été effectués sur la base d'un protocole expérimental décrit précédemment [535]. Ainsi un mélange (1:1:1; *v:v:v*), composé d'une solution de cuivre (II) à 10 000 µM préparée dans un tampon NH_4OAc à 1 M (pH 7,0), d'une solution de néocuproine à 7 500 µM préparée dans l'EtOH. et un tampon NH_4OAc à 1 M (pH 7,0), a été utilisé. Dans chaque puit, 10 µL d'extrait de plante à des concentrations diverses (1000, 100, 500, 1000, 5000 et 10 000 µg/mL) ou trolox ont été mélangés à 190 µL du dernier mélange ci-dessus. La lecture de l'absorbance a été effectuée à λ = 450 nm.

iv) TEST FRAP

Les tests FRAP ont été effectués sur la base d'un protocole expérimental décrit précédemment [536]. Ainsi un mélange (1:1:10 ; *v:v:v*), composé d'une solution TPTZ (tripyridyltriazine) à 10 000 µM préparée dans l'HCl à 40 000 µM, d'une solution $FeCl_3$ à 20 000 µM préparée dans un tampon NaOAc (300 000 µM, pH 3.6) puis dilué 10 fois dans l'eau et du tampon NaOAc (300 000 µM, pH 3,6), a été utilisé. Dans chaque puit, 10 µL d'extrait de plante à des concentrations diverses (1000, 100, 500, 1000, 5000 et 10 000 µg/mL) ou trolox ont été mélangés à 190 µL du dernier mélange ci-dessus. La lecture de l'absorbance a été effectuée à λ = 590 nm.

v) TEST DE CHELATION AU FER

Les tests de chelation au fer ont été effectués sur la base d'un protocole expérimental décrit précédemment [537]. Ainsi un mélange (1:1; *v:v*), composé d'une solution de $FeCl_3$ à 1 000 µM et d'une solution de ferrozine à 300 µM, a été préparé dans l'eau. Dans chaque puit, 10 µL d'extrait de plante à des concentrations diverses (1000, 100, 500, 1000, 5000 et 10 000 µg/mL) ou trolox ont été mélangés à 190 µL du dernier mélange ci-dessus. La lecture de l'absorbance a été effectuée à λ = 562 nm.

(2) DOSAGE INDIRECT DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE *IN VITRO*

La détermination de l'activité de la SOD est réalisée par dosage indirect de la XOD et d'un réactif coloré, à l'aide d'un kit commercial de chez Merck. Le test était basé sur la capacité de la XOD à inhiber le radical libre anion superoxyde de O_2•- généré par le système xanthine-XOD. Le kit contient une solution tampon et sa dilution, un sel de tétrazolium hautement soluble dans l'eau de Dojindo, une solution de substrat de travail (WST-1 ; 2-(4-Iodophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4 -disulfophényl)-2H-tétrazolium sel monosodique) qui produit un colorant formazan soluble dans l'eau lors de la réduction avec un anion superoxyde dilué dans une solution tampon et une solution XOD préparée dans un tampon de dilution. Le tampon de réaction et l'EtOH ont été utilisés comme contrôle négatif. Dans chaque puit de la MTP, 20 µL d'extrait (préparé à 1000 et 250 µg/mL) ou de contrôle négatif ont été mélangés à 20 µL de solution XOD et 200 µL de WST-1. La MTP remplie a été incubée pendant 20 min à température ambiante dans l'obscurité puis agitée (mode orbital, 30 s). La lecture des absorbances a été faite à λ = 450 nm. Les expériences ont été réalisées en *triplicata*. Le pourcentage d'activité SOD équivalente a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = \left(\frac{(\text{Abs Ext} - \text{Abs ExtB})}{(\text{Abs CP} - \text{Abs CB})}\right) * 100$$

Où Abs CP (Contrôle Positif) est l'absorbance du tampon avec 5% d'EtOH, XOD et WST-1 ; Abs CB (Contrôle Blanc) est l'absorbance du tampon avec 5% d'EtOH et WST-1 ; Abs Ext (Extrait) est l'absorbance de l'extrait de plante testé dans le tampon, XOD et WST-1 et Abs ExtB (Extrait Blanc) est l'absorbance de l'extrait de plante testé dans le tampon et WST-1.

b) DOSAGES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

(1) ACTIVITE ANTI-HYALURONIDASE ET CONDITIONS DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

L'activité anti-hyaluronidase a été déterminée par EC permettant une mesure directe de l'effet de la hyaluronidase qui catalyse simultanément la dégradation et l'allongement de son substrat [538]. Les effets des extraits de plantes et de standards ont été évalués sur l'activité catalytique de la hyaluronidase à l'aide d'un test hors ligne basé sur l'EC optimisé dans une étude précédente [539]. Les tests ont néanmoins été effectués avec quelques ajustements compte tenu de la présence d'EtOH dans les extraits et standards. Leur concentration a alors été limitée à 5% du volume final. Ainsi, 37,5 µL de tampon d'incubation (IB) ont été pré-incubés avec 5 µL d'acide hyaluronique (AH ; 4 000 µg/mL) et 2,5 µL d'extraits à 37 °C pendant 10 min. Ensuite, 5 µL d'enzyme (à 2 000 µg/mL) ont été ajoutés au mélange. Les réactions ont été incubées pendant 180 min à 37° C, puis arrêtées en augmentant la température à 90 °C pendant 10 min en utilisant un bain d'eau chaude. Les expériences ont été réalisées en *triplicata*.

Plusieurs tampons et solutions mères pour le test de la hyaluronidase par CE ont dû pour cela être réalisés. L'IB était de l'acétate de sodium à 2 000 µM dans de l'eau désionisée (équivalent à 164 µg/mL) à pH 4,3 (ajusté avec de l'acide acétique glacial 1 M). L'électrolyte de fond (BGE) était constitué de 50 000 µM d'acétate d'ammonium dans de l'eau désionisée (équivalent à 3 854 µg/mL) à pH 8,9 (ajusté avec de l'hydroxyde d'ammonium 1 M). Tous les tampons ont été préparés quotidiennement et filtrés à l'aide de filtres seringues en PVDF hydrophiles avant utilisation. Des solutions mères de AH, enzyme (hyaluronidase testiculaire bovine) et tétrasaccharides ont été préparées à 10 000 µg/mL dans l'IB, puis diluées aux concentrations appropriées. Des aliquotes de 2 000 µg/mL ont été conservées à −20 °C. L'EGCG a été préparé dans l'EtOH à 1 000 µg/mL. Des solutions mères d'extrait et standard ont été préparées à différentes concentrations (10 000 ; 2000 ; 1000 et 200 µg/mL), également dans l'EtOH. Les tampons, les solutions mères d'extrait et les solutions étalons ont toutes été conservées à 4 °C.

La longueur d'onde de détection a été réglée à 200 nm. Le capillaire a été rincé avec NaOH 1 M (pendant 5 min), de l'eau (pendant 0,5 min) et du BGE (pendant 3 min) pour assurer un bon nettoyage de la surface interne du capillaire entre les analyses. Tous les cycles de rinçage ont été effectués à 50 psi et les injections (14 nL) ont été faites en utilisant des injections hydrodynamiques du côté anodique du capillaire à 1,5 psi pendant 5 s. La séparation des produits de dégradation de l'AH a été assurée en mode polarité positive à +15 kV (à 25 °C). La surface du pic corrigé (CPA), déterminée par le rapport surface/temps de migration, constituait une moyenne fiable pour la quantification du tétrasaccharide (produit final de l'hydrolyse de l'AH) après sa séparation sous le champ électrique à l'intérieur du capillaire. Elle a été suivie pour évaluer l'activité de l'enzyme en présence d'extraits de plantes et comparée à des réactions réalisées en l'absence d'extraits ou de standards. Le pourcentage d'activité anti-hyaluronidase a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Activité anti} - \text{hyaluronidase } (\%) = \left(\frac{A_x}{A_0}\right) * 100$$

Où A_x and A_0 sont les CPAs du tétrasaccharide formés respectivement en présence et en l'absence d'un inhibiteur potentiel (extrait de plante ou standard).

(2) ACTIVITE ANTI-ELASTASE *IN VITRO*

Le kit « *EnzChek Elastase Assay Kit, E-12056* » de chez Thermo Fischer Scientific a été utilisé pour déterminer l'activité anti-élastase. Ce dernier contient : une élastine DQ soluble provenant du ligament du cou bovin, un conjugué BODIPY FL, 1 mg de substrat enzymatique lyophilisé à partir de 1 ml de solution saline tamponnée au phosphate à pH 7,2 (PBS) ; un tampon de réaction 10X de Tris-HCl 1 M, pH 8,0 avec 2 000 µM d'azoture de sodium ; de l'élastase de pancréas de porc 50 unités, où une unité est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour solubiliser 1 mg d'élastine en 20 min (pH 8,8, 37 °C) et enfin un inhibiteur de l'élastase nommé N-méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro -Val-chlorométhylcétone. Cet inhibiteur sélectif de l'élastase a été dilué dans du tampon de réaction 1X préparé à partir du tampon 10X pour obtenir deux solutions à 2,51 et 25,15 µg/mL. Le tampon de réaction 1X et l'EtOH ont été utilisés comme contrôle négatif. Dans chaque puit, 10 µL d'extrait, d'inhibiteur ou de standards ou contrôle négatif ont été mélangés avec 40 µL de tampon 1X et 100 µL d'élastase

(à 0,5 U/mL). La plaque a été incubée pendant 5 minutes à température ambiante puis agitée (orbital, 30 s). Ensuite, 50 µL de substrat enzymatique à 100 µg/mL ont été ajoutés. La plaque a été incubée pendant 2 heures à température ambiante dans l'obscurité. Enfin, la fluorescence (Fluo, *λexcitation* 477 nm – *λémission* 525 nm) a été mesurée. Les expériences ont été réalisées en *triplicata*. Les solutions mères d'extrait et standards utilisées ont été préparées à différentes concentrations (10 000 ; 2000 ; 1000 et 200 µg/mL), également dans l'EtOH. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec l'inhibiteur de l'élastase N-méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chlorométhylcétone référencé. Le pourcentage d'activité anti-élastase a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Activité anti} - \text{élastase } (\%) = \left(\frac{(\text{Fluo Ext} - \text{Fluo ExtB})}{(\text{Fluo CP} - \text{Fluo CB})}\right) * 100$$

Où Fluo PC (Contrôle Positif) est la fluorescence du tampon PBS avec 5% d'EtOH, d'élastase et de substrat enzymatique ; Fluo CB (Contrôle Blanc) est la fluorescence d'un tampon PBS avec 5% d'EtOH et un substrat enzymatique ; Fluo Ext (Extrait) est la fluorescence de l'extrait de plante testé dans le tampon PBS, l'élastase, le substrat enzymatique et Fluo ExtB (Extrait Blanc) est la fluorescence de l'extrait de plante testé dans le tampon PBS et le substrat enzymatique.

(3) ACTIVITE ANTI-COLLAGENASE *IN VITRO*

Le kit « *EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay Kit, E-12055* » de chez Thermo Fischer Scientific a été utilisé pour déterminer l'activité anti-collagénase. Ce dernier contient : une gélatine DQ soluble de peau de porc, un conjugué de fluorescéine, 1 mg de substrat enzymatique lyophilisé à partir de 1 ml de solution saline tamponnée au phosphate à pH 7,2 (PBS) ; un tampon de réaction 10X de Tris-HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M, $CaCl_2$ 50 000 µM (équivalent à 5 549 µg/mL), pH 7,6 avec 2 000 µM d'azoture de sodium ; de la collagénase, type IV de *Clostridium histolyticum* 500 unités, où une unité est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 µmole d'équivalent L-Leucine à partir du collagène en 5 h (pH 7,5, 37 °C) et un inhibiteur de la collagénase nommé 1 ,10-phénanthroline, monohydratée. Cet inhibiteur général de métalloprotéinase de la collagénase a été dilué dans un tampon de réaction 1X préparé à partir de tampon 10X pour obtenir deux solutions à 3,60 et 36,04 µg/mL. Le tampon de réaction 1X et l'EtOH ont été utilisés comme contrôle négatif. Dans chaque puit, 10 µL d'extrait, d'inhibiteur ou de standards ou contrôle négatif ont été mélangés avec 70 µL de tampon 1X et 100 µL de collagénase (à 0,4 U/mL). La plaque a été incubée pendant 5 minutes à température ambiante. Ensuite, 20 µL de substrat enzymatique à 125 µg/mL ont été ajoutés. La plaque a été incubée pendant 2 h à température ambiante dans l'obscurité puis agitée (orbital, 30 s). Enfin, la lecture de fluorescence (Fluo, *λexcitation* = 483 nm – *λémission* = 530 nm) a été réalisée. Les expériences ont été réalisées en *triplicata*. Les solutions mères d'extrait et standards utilisées ont été préparées à différentes concentrations (10 000 ; 2000 ; 1000 et 200 µg/mL), également dans l'EtOH. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec l'inhibiteur de collagénase 1 ,10-phénanthroline, monohydratée référencé. Le pourcentage d'activité anti-collagénase a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Activité anti} - \text{collagénase } (\%) = \left(\frac{(\text{Fluo Ext} - \text{Fluo ExtB})}{(\text{Fluo CP} - \text{Fluo CB})}\right) * 100$$

Où Fluo CP (Contrôle Positif) est la fluorescence du tampon PBS avec 5% d'EtOH, de la collagénase et un substrat enzymatique ; Fluo CB (Contrôle Blanc) est la fluorescence d'un tampon PBS avec 5% d'EtOH et un substrat enzymatique ; Fluo Ext (Extrait) est la fluorescence de l'extrait de plante testé dans le tampon PBS, la collagénase, le substrat enzymatique et Fluo ExtB (Extrait Blanc) est la fluorescence de l'extrait de plante testé dans le tampon PBS et le substrat enzymatique.

(4) ACTIVITE BLANCHISSANTE *IN VITRO*

L'activité inhibitrice de la tyrosinase a été déterminée à l'aide d'un protocole expérimental décrit précédemment [540], auquel ont été apportées quelques modifications. La solution tampon phosphate (PBS à 10 000 µM, pH = 6,8) a été préparée en mélangeant 2 M de NaOH, 1 M de H_3PO4 et de l'eau ultra-pure dans les proportions (1 : 1,45 : 250 ; *v:v:v*). La glabridine a été préparée dans du DMSO à 10 000 µM (équivalent à 3 243 µg/mL), puis diluée dans l'EtOH pour obtenir des solutions à 16,22 ; 32.44 ; 162,19 et 324,38 µg/mL et a été utilisée comme contrôle positif. Du PBS et de l'EtOH ont été utilisés comme contrôle négatif. Dans chaque puit, 10 µL d'extrait, d'inhibiteur ou de standards ou contrôle négatif ont été mélangés à 30 µL de PBS et 40 µL de solution de tyrosinase (à 125 U/mL). La plaque a été incubée pendant 5 minutes à température ambiante. Ensuite, 120 µL de solution de substrat *L*-Dopa à 8 300 µM (équivalent à 1 636 µg/mL) ont été ajoutés au mélange et la plaque a été incubée 30 min à température ambiante dans l'obscurité, puis agitée. La lecture de l'absorbance a été faite à λ = 490 nm. Les expériences ont été réalisées en *triplicata*. Les solutions mères d'extrait et standards utilisées ont été préparées à différentes concentrations (10 000 ; 2000 ; 1000 et 200 µg/mL), également dans l'EtOH. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec la glabridine, un inhibiteur de la tyrosinase référencé. Le pourcentage d'activité anti-tyrosinase a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Activité anti} - \text{tyrosinase } (\%) = \left(\frac{(\text{Abs Ext} - \text{Abs ExtB})}{(\text{Abs CP} - \text{Abs CB})}\right) * 100$$

Où Abs CP (Contrôle Positif) est l'absorbance du PBS avec 5% d'EtOH, de tyrosinase et de substrat *L*-Dopa ; Abs CB (Contrôle Blanc) est l'absorbance du PBS avec 5% de substrat EtOH et *L*-Dopa ; Abs Ext (Extrait) est l'absorbance de l'extrait de plante testé dans le tampon PBS, la tyrosinase, le substrat *L*-Dopa et Abs ExtB (Extrait Blanc) est l'absorbance de l'extrait de plante testé dans le tampon PBS et le substrat *L*-Dopa.

c) ANALYSES STATISTIQUES

Les logiciels Excel 2016 (*Microsoft, Redmond, WA, USA*) et XLSTAT 2022 d'*Addinsoft* ont été utilisés pour toutes les analyses. Les moyennes sont représentées sous la forme moyenne ± écart type (ET) (n = 3) pour tous les tests. Une analyse de variance (ANOVA à un facteur) suivie d'une comparaison multiple des moyennes, utilisant le test *t* de Student, le test de Dunnett et le test *F* de Fisher (LSD), a été mise en œuvre afin de comparer

statistiquement les données obtenues. Les échantillons (extraits, standards) ont été comparés au contrôle positif et/ou entre eux. Deux échantillons ont été considérés comme significativement différents à p <0,05.

4. DETERMINATION DES TENEURS EN COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX ET EN FLAVONOÏDES TOTAUX

La détermination des teneurs en composés phénoliques totaux (TPC) et en flavonoïdes totaux (TFC) est effectué *in vitro* en MTP. Le traitement des résultats a été réalisé comme en *section IV. A. 3. c)*.

- Dans le cas du dosage TPC :

L'extrait végétal a été utilisé à la concentration de 1 mg/mL. Une solution A de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 20% dans l'eau ultra-pure est préparée ainsi qu'une solution d'acide gallique préparée dans l'EtOH à 0,6 mg/mL. Dans chaque puit, 20 µL d'échantillon sont placés avec 10 µL de réactif Folin-Ciocalteu pendant 8 min à température ambiante. Puis, 30 µl de solution A sont ajoutés, suivis de 140 µL d'eau ultra-pure. La plaque est agitée (orbital, 30 s) et incubée 2 h à température ambiante. La lecture des absorbances a été faite à 760 nm. A partir des résultats d'absorbance obtenus, les teneurs peuvent être exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique (EAG) par g d'extrait sec (ES) soit en mg EGA/g ES. La gamme étalon d'acide gallique (standard de référence préparé dans l'EtOH) réalisée pour ce test en partant d'une solution mère à 0,6 mg/mL est présentée *Annexe 10*. Six dilutions ont été réalisées couvrant ainsi des concentrations entre 0 et 0,6 mg/mL.

- Dans le cas du dosage TFC :

L'extrait végétal est utilisé à la concentration de 10 mg/mL. Une solution B de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 1% dans l'eau ultra-pure est préparée ainsi qu'une solution de rutine préparée dans l'EtOH à 0,6 mg/mL. Dans chaque puit, 10 µL d'échantillon sont placés avec 7 µL de solution B. Ensuite, 183 µL d'eau ultra-pure sont ajoutés. La plaque est agitée (orbital, 30 s) et incubée 5 min à température ambiante. La lecture des absorbances a été faite à 435 nm. Des solutions filles préparées à partir d'une solution mère à 0,6 mg/mL ont permis de tracer la droite d'étalonnage comprenant des valeurs de concentrations entre 0 et 0,6 mg/mL présentée *Annexe 11*. Les teneurs sont exprimées en mg d'équivalent de rutine (ER) ou quercétine 3-*O*-rutinoside (standard de référence préparé dans l'EtOH) par g d'extrait sec (ES) soit en mg ER/g ES.

5. CARACTERISATION DES PRINCIPALES FAMILLES MOLECULAIRES ANALYSEES PAR HPTLC

Ont été étudiées les feuilles, les tiges, l'association de ces deux derniers organes (formant la partie aérienne) et les racines chez *A. artemisiifolia* ou rhizomes chez *F. japonica* et *S. canadensis*. Les fleurs l'ont été uniquement chez *F. japonica* et *S. canadensis*. Des stades de croissances divers ou localisations géographiques différents ont pu quelques fois être étudiés.

À l'aide de l'ATS 4 (dépôts), 5 µL d'extraits éthanoliques bruts à une concentration de 10 000 µg/mL ou d'étalons à 1 000 µg/mL ont été chargés (vitesse de 50 nL/sec) dans des bandes de 6 mm de longueur, avec une distance de 4 ou 9 mm entre chaque bande en laissant 10 mm à partir du bas de la plaque et 20 mm à partir des bords. L'élution horizontale, avec une phase mobile appropriée à la famille moléculaire ciblée, sur 70 mm a été réalisée avec l'ADC2 à température ambiante sans contrôle d'humidité. Les phases mobiles utilisées ont été positionnées afin d'atteindre une saturation de 20 min. Aucun traitement de visualisation n'était nécessaire pour les composés colorés, visibles à la lumière blanche. Pour ceux qui ne l'étaient pas, mais peuvent absorber sous irradiation UV, ils ont été détectés par le biais des lampes UV (254 ou 366 nm). L'indicateur de fluorescence F_{254} incorporé a servi à intensifier cette détection sous UV. Pour les molécules faiblement détectables ou les composés qui n'absorbent pas dans le visible ni sous UV, une étape de révélation chimique a été menée (Derivatizer), avec 2 mL de réactif.

a) CARACTERISATION DES SUCRES

Les glucides n'absorbent pas dans le domaine de l'UV et s'observent à la lumière blanche. Afin de révéler la présence d'éventuels glucides dans les extraits éthanoliques bruts, ont été usités un mélange AcOEt/MeOH/AF dans les proportions en volume 7/3/0,5 comme phase mobile et le réactif de Molisch entant que révélateur [446,447], choisi préférentiellement à d'autres réactifs pour des raisons de disponibilités au laboratoire. Les hydrates de carbone sont dévoilés comme molécules sucrantes de types oses et di- ou triholosides dans des couleurs allant du rouge au violet. Une première solution composée d'α-naphtol puis une deuxième solution d'H_2SO_4 ont été vaporisées manuellement le plus homogènement possible.

b) CARACTERISATION DES LIPIDES ET DES TERPENES

L'analyse des lipides et des terpènes peut être réalisée sur une seule et même plaque. Le mélange $CHCl_3$/Heptane/MeOH dans les proportions en volume 2/2/0,5 a été employé pour l'élution. La primuline permet la détection à 366 nm des molécules lipidiques possédant une ou plusieurs insaturations [447,451]. Etant un agent de dérivation non destructif, il est possible d'appliquer successivement l'anisaldéhyde pour la révélation des terpénoïdes avec des lectures dans le domaine du visible et à 366 nm. Ce second agent dérivant révèle les fonctions de types alcools allyliques, phénoliques, amines, aldéhydes, cétones, glucides ou encore esters [447,451]. De plus, il rend possible la distinction de trois catégories de terpénoïdes en fonction de la coloration observée. La présence de monoterpènes se traduit par une coloration bleutée, celle des triterpènes se manifeste par une couleur violacée et les phytostérols ou stéroïdes auront une coloration grise. Des spots de couleur noire peuvent correspondre à d'éventuels molécules glucosylées [447,451].

c) CARACTERISATION DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES

L'analyse par TLC des composés polyphénoliques a été effectuée comme décrit précédemment en *section IV. A. 2*. Une deuxième phase éluante a pu être utilisée AcOEt/MeOH/AF (90/10/0,5) (*v:v:v*).

6. VARIABILITE POLYPHENOLIQUE : INFLUENCE DE L'ORGANE

- Préparation des extraits à analyser :

Les extraits (macération assistée par ultrasons) ont été préparés en suivant le protocole énoncé en *section IV. A. 1*. Les extraits filtrés et évaporés, ont été repris avec de l'EtOH pour obtenir des solutions à 10 mg/mL.

- Préparation de la plaque TLC pour les traitements statistiques : influence de l'organe

Chaque organe extrait a été déposé une seule fois. Pour *S. canadensis* des organes de deux localisations géographiques différentes ont été déposés (feuilles, tiges, racines pour la localité 1 ou Perrignier et feuilles, tiges, fleurs pour la localité 2 ou Yvoire). La totalité des échantillons analysés ont été déposés sur une seule plaque TLC. La photographie de cette dernière a été faite à 366 nm. Le système d'élution et de révélation était celui décrit précédemment pour les composés polyphénoliques (*section IV. A. 2*).

- Analyses statistiques :

Les analyses statistiques non ciblées des extraits produits ont été réalisées avec l'application web *open-source* rTLC [431]. Avec la photographie de la plaque directement, des analyses multivariées des chromatogrammes planaires, basées sur le modèle mathématique de l'ACP ont été effectuées. Trois ACPs ont ensuite été faites : l'une sans correction, l'une avec correction ligne de base et une dernière avec correction centrage moyen. Les ACPs ont été appliquées sur l'ensemble de données pour les canaux RVB (rouge, vert, bleu) ainsi que sur l'image en niveaux de gris.

B. VALORISATION DANS LE SECTEUR DERMO-COSMETIQUE

1. VALORISATION DANS LE SECTEUR DERMO-COSMETIQUE DE *FALLOPIA JAPONICA*

a) COMPARAISON DES FLEURS ET DES FEUILLES

- Préparation des extraits à analyser :

Les extraits (macération assistée par ultrasons) ont été préparés en suivant le protocole énoncé en *section IV. A. 1*. Les extraits filtrés et évaporés, ont été repris avec de l'EtOH pour obtenir des solutions à 10 mg/mL.

- Conditions de l'analyse UHPLC-UV/ESI-QqTOF-HRMS/MS :

La lecture UV a été réalisée à 285 nm. H_2O (A)et ACN (B) acidifiés ont été employés. L'élution a été réalisée à un débit de 500 µL/min et avec le programme de gradient binaire suivant : en commençant avec 3% de solvant B pendant 0,1 min, 3 à 95% de 0,1 à 21 min, 95% de 21 à 24 min, 95 –3% de 24 à 24,5 min. Ensuite, la colonne a été rééquilibrée avec 3% de solvant B pendant 3 min. La température de la colonne a été réglée à 40 °C et 0,35 µL des extraits éthanoliques bruts ont été injectés. Les analyses ont été réalisées dans les conditions décrites *en section III. F*. Des analyses Auto MS/MS ont été effectuées pour obtenir des informations structurelles afin de proposer une identification des molécules en utilisant à la fois l'algorithme *SmartFormula* et la base de données *PubChem*.

- Analyse différentielle :

Afin de comparer chimiquement les deux organes entre eux, a été utilisé le logiciel *MetaboliteDetect* (*Bruker*). Les temps de rétention ont été corrélés d'un BPC à l'autre avec *DataAnalysis* 4.4. *MetaboliteDetect* a permis de soustraire les profils BPCs entre eux (*m/z* discriminant). Ainsi il a été possible d'observer tous les composés différenciants d'un organe à l'autre. Dans le cas « Fleurs – Feuilles », ont été mis en évidence les composés présents dans les fleurs et absents dans les feuilles ainsi que les composés communs entre les deux organes mais prédominants dans les fleurs. De la même façon pour « Feuilles – Fleurs », ont été mis en évidence les composés présents dans les feuilles et absents dans les fleurs ainsi que les composés communs entre les deux organes mais prédominants dans les feuilles. Les spectres de masses ont permis de proposer des hypothèses d'identifications pour ces molécules et de comparer les données avec celles de la soustraction. Pour les composés visibles à l'UV, il a été possible d'identifier ceux faisant partis des composés majoritaires ou de ceux minoritaires.

b) CARACTERISATION DES ANTIOXYDANTS

La caractérisation des antioxydants présents dans les divers extraits de plantes a pu être réalisée *via* les approches (HP)TLC-Bioautographie et HPTLC couplée à l'ESI-QqTOF-HRMS ainsi qu'en utilisant le principe de déréplication. C'est la convolution de l'ensemble des données récoltées qui a permis de proposer des identifications des antioxydants principaux.

- Préparation des extraits et solutions standards à analyser :

Les extraits des organes ou parties de plante (macération assistée par ultrasons) ont été préparés en suivant le protocole énoncé en *section IV. A. 1*. Les extraits filtrés et évaporés, ont été repris avec de l'EtOH pour obtenir des solutions à 10 mg/mL. Les solutions de standards ont été préparées dans l'EtOH à 0,5 mg/mL.

- Préparation des plaques (HP)TLC :
  - Plaque TLC (A) Organes de *F. japonica* :

Les solutions en *duplicata* ainsi que les standards ont été déposées sur une plaque TLC en verre. Le système d'élution et de révélation était celui décrit précédemment pour les composés polyphénoliques (*section IV. A. 2*). Les *duplicatas* de dépôts ont permis de réaliser deux révélations distinctes : NEU-PEG mais également DPPH. Pour

l'activité antioxydante des extraits (HPTLC-DPPH), 2 mL d'une solution de DPPH à 0,05% préparée dans le MeOH ont été pulvérisés. La détection a été faite dans le visible.

- Plaque HPTLC (B) Parties aérienne et racinaire de *F. japonica* :

Chaque extrait a été déposées 6 fois : d'une part pour évaluer son activité antioxydante (5 dépôts de volumes décroissants 5, 4, 3, 2 et 1 µL révélés au DPPH comme décrit au-dessus) et d'autre part, pour être caractérisés par MS (1 dépôt de 5 µL non révélé).

- Coupage plaque HPTLC (B) avec l'ESI-QqTOF-HRMS :

Seuls les spots non révélés ont été analysés *via* l'interface TLC/MS 2 (durée d'analyse 2 min par spot) selon le protocole décrit en *section III. E*.

c) CARACTERISATION DES INHIBITEURS DE LA TYROSINASE

La caractérisation des inhibiteurs de la tyrosinase présents dans les divers extraits de plantes a pu être réalisée *via* l'approche HPTLC-Bioautographie couplée à la MS.

- Préparation des extraits et solutions standards à analyser :

Les extraits de plante (macération assistée par ultrasons) ont été préparés en suivant le protocole énoncé en *section IV. A. 1*. Les extraits filtrés et évaporés, ont été repris avec de l'EtOH pour obtenir des solutions à 10 mg/mL. La solution d'acide kojique a été préparée dans l'EtOH à 1 mg/mL.

- Analyses HPTLC-Bioautographie/HRMS :
  - Préparation des trois plaques (a-c) HPTLC :

Les standards ont été déposés (3 µL) sur une plaque HPTLC en aluminium (a). Les extraits en *duplicata* ont été déposés (5µL) sur deux plaques HPTLC en aluminium (b-c). Le système d'élution et de révélation était celui décrit précédemment pour les composés polyphénoliques (*section IV. A. 2*). Les *duplicatas* de dépôts ont permis de réaliser deux révélations distinctes : NEU-PEG (b) mais également activité anti-tyrosinase (c). Pour cette dernière (c) ainsi que pour la plaque des standards (a), la solution de substrat *L*-Dopa à 4 500 µg/mL, contenant également du PEG 10 000 à 7 500 µg/mL et du CAPS à 2 500 µg/mL, a été préparée dans une solution tampon phosphate 20 000 µM, pH 6,8 selon Chandana et Morlock [541]. Une pulvérisation piézoélectrique avec le Derivatizer (buse bleue, niveau 6) de 1,5 ml a été réalisée et la plaque a été séchée pendant 2 min avec un jet froid de ventilateur. Ensuite, 1,5 mL de solution enzymatique de tyrosinase (à 400 U/mL) ont été pulvérisés. L'incubation a ensuite été réalisée pendant 15 min à température ambiante dans un récipient humide. Ensuite, la plaque a été séchée pendant 15 min à l'air libre et à l'abri de la lumière. La plaque HPTLC-Bioautographie a été visualisée en lumière blanche.

  - Couplage HPTLC-Bioautographie avec l'ESI-QqTOF-HRMS :

Seuls les spots actifs anti-tyrosinase ont été analysés *via* l'interface TLC/MS 2 (durée d'analyse 2 min par spot) selon le protocole décrit en *section III. E*.

- Analyses HPTLC-Bioautographie/MS :
  - Préparation de la plaque HPTLC :

Les extraits des organes et l'acide kojique ont été déposées sur une plaque HPTLC en aluminium. Les conditions de dépôts été identiques à la section *section IV. A. 2*. Deux phases éluantes successives (A puis B) ont été réalisées : éther de pétrole/AcOnBu/MeOH/AcOH avec A (4/1/0,7/0,02 ; *v:v:v:v*) puis B (4/2/2/0,1 ; *v:v:v:v*). Les élutions ont été réalisées sur une distance de 7 cm (visualisée à 366 nm). La plaque développée a été séchée à température ambiante. Ensuite, la révélation bioautographique de l'activité anti-tyrosinase a été effectuée comme mentionné au-dessus.

  - Couplage HPTLC-Bioautographie avec l'ESI-TQ-MS :

Seuls les spots actifs anti-tyrosinase ont été analysés *via* l'interface TLC/MS 2 (durée d'analyse 2 min par spot) selon le protocole décrit en *section III. E*.

d) CRIBLAGE DERMO-COSMETIQUES DE STANDARDS SELECTIONNES

Les six standards (resvératrol, polydatine, émodine, physcion, chrysophanol et 5-*O*-CQA) ont été préparées dans l'EtOH à différentes concentrations (10 000 ; 2000 ; 1000 et 200 µg/mL). Les protocoles utilisés étaient les mêmes que pour le criblage des extraits végétaux (*sections IV. A. 3. B. (1) à (4)*).

e) CARACTERISATION DES ORGANES PAR UHPLC-UV/HRMS/MS

Les extraits (macération assistée par ultrasons) ont été préparés en suivant le protocole énoncé en *section IV. A. 1*. Les extraits filtrés et évaporés, ont été repris avec de l'EtOH pour obtenir des solutions à 10 mg/mL. Les conditions opératoires de l'analyse UHPLC-UV/ESI-QqTOF-HRMS/MS sont identiques à ce qui a été décrit en section *IV. B. 1. a)*.

e) INFLUENCE DE LA QUANTITE D'EAU LORS DE L'EXTRACTION SUR LES TENEURS EN ACTIFS PRINCIPAUX

- Préparation des extraits et solutions standards à analyser :

Un ratio matière végétale/solvant (H_2O/EtOH) de 1/10 a été utilisé. Le mélange a été soumis à 1 h de sonication. Différents mélanges de solvant (H_2O/EtOH) ont été testés allant de 100/0 à 10/90 (*v/v*) de ratios. Des *triplicata* d'extraction ont été réalisés ($n = 3$). Les extraits ($R1_{n=3}$ à $R20_{n=3}$) ont ensuite été filtrés et directement analysés. Les solutions des trois standards (polydatine, resvératrol et émodine) ont été préparées dans un mélange (H_2O/EtOH ; 50/50) à 1 mg/mL. 5 dilutions en cascade de ces dernières ont permis de couvrir des concentrations de 33,3 à 1 000 ppm.

- Analyse par HPTLC des composés polyphénoliques :

Les dix extraits bruts de rhizomes de *F. japonica* (R11 à R20 ; *n* =1) ainsi que les standards à 1 mg/mL ont été déposées (8 mm de large) sur une plaque HPTLC en verre. Le système de dépôt (exceptée la largeur de dépôt), d'élution et de révélation était celui décrit précédemment pour les composés polyphénoliques (*section IV. A. 2*).

- Conditions de l'analyse UHPLC-UV

La lecture UV a été réalisée à 285 nm. H_2O (A)et ACN (B) acidifiés ont été employés. L'élution a été réalisée à un débit de 500 µL/min et avec le programme de gradient binaire suivant : en commençant avec 10% de solvant B pendant 0,1 min, 10 à 50% de 0,1 à 14 min, 50 à 95% de 14 à 14,5 min, 95% de 14,5 à 15 min, 95 –10% de 15 à 15,25 min. Ensuite, la colonne a été rééquilibrée avec 10% de solvant B pendant 1,25 min. La température de la colonne a été réglée à 40 °C et 0,5 µL des extraits hydroalcooliques ou solutions standards ont été injectés. Les analyses ont été réalisées dans les conditions décrites *en section III. F*.

- Réalisation des courbes d'étalonnages et dosages des extraits :

Les gammes d'étalonnage à l'UV (285 nm) couvrant des concentrations de 33,3 à 1 000 ppm sont présentées *Annexe 12*. L'ensemble des solutions standards réalisées ont été injectées en UHPLC-UV/ESI-TQ-MS selon le protocole décrit au-dessus. Les droites ainsi construites ont permis de quantifier la polydatine, le resvératrol et l'émodine présents dans les extraits hydroalcooliques produits en *triplicata* ($R11_{n=3}$ à $R20_{n=3}$). Les coefficients de variation (CV %) par type d'extrait pour chaque composé ont été calculés : (écart type des *n*=3 teneurs/moyenne des *n*=3 teneurs) *100.

2. VALORISATION DANS LE SECTEUR DERMO-COSMETIQUE D'*AMBROSIA ARTEMSIIFOLIA* ET DE *SOLIDAGO CANADENSIS*

a) CARACTERISATIONS DES ANTIOXYDANTS ET DES INHIBITEURS DE LA TYROSINASE

Les protocoles décrits pour *F. japonica* dans les *sections IV. B. 1. b)* et *IV. B. 1. c)* relatives respectivement à la caractérisation des antioxydants et à celle des inhibiteurs de la tyrosinase sont ceux également appliqués à *A. artemisiifolia* et *S. canadensis*.

b) INFLUENCE DU STADE DE DEVELOPPEMENT D'*A. ARTEMSIIFOLIA* SUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES

- Préparation des extraits à analyser :

Les extraits (macération assistée par ultrasons) ont été préparés en suivant le protocole énoncé en *section IV. A. 1*. Les extraits filtrés et évaporés, ont été repris avec de l'EtOH pour obtenir des solutions à 10 mg/mL.

- Préparation de la plaque TLC pour les traitements statistiques :

Les surfaces de prélèvement ont été choisies aléatoirement. 8 dépôts de parties aériennes (ou *PA = feuilles+tiges*) et 7 dépôts des parties racinaires correspondantes (*PR = racines*) ainsi qu'un extrait de feuilles (*F*) de la parcelle de Cruet y ont été effectués. Trois stades de croissance différents pour les organes y ont été déposés (*S1* à *S3*). La totalité des échantillons analysés ont été déposés une seule fois sur une seule plaque TLC révélée au DPPH et selon le système d'élution des composés polyphénoliques décrit en *section IV. A. 2*. La photographie de cette dernière a été faite dans le visible.

- Analyses statistiques :

Les analyses statistiques non ciblées des extraits produits ont été réalisées selon le protocole décrit en *section IV. A. 6*. Une ACP a été réalisée avec correction de ligne de base.

a) CRIBLAGE DERMO-COSMETIQUE DE STANDARDS SELECTIONNES

Les deux standards (acide 5-*O*-CQA et acide 3,5-DCQA) ont été préparées dans l'EtOH à différentes concentrations (10 000 ; 2000 ; 1000 et 200 µg/mL). Les protocoles utilisés étaient les mêmes que pour le criblage des extraits végétaux (*sections IV. A. 3. B. (1) à (4)*).

C. VALORISATION DANS LE SECTEUR NUTRACEUTIQUE D'*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* ET DE *SOLIDAGO CANADENSIS*

1. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les parties aériennes d'*A. artemisiifolia* et *S. canadensis*, composées de feuilles, tiges ont été utilisées. La racine a été utilisée chez *A. artemisiifolia* tandis que les rhizomes ont été utilisés chez *S. canadensis*. Les poudres de plantes (1,0 g) ont été extraites avec 10 ml d'EtOH. Les solutions ont été soumises à 3 cycles d'extraction de 30 s chacun et à une puissance d'irradiation de 700 W, en se basant sur des méthodes antérieures [496,542]. Entre chaque cycle, une étape de refroidissement de 5 min a été réalisée. La température maximale mesurée était de 60 °C. Chaque échantillon a été réalisé en *triplicata*. Les extraits ont été filtrés à travers un filtre PTFE de 0,45 µm D.25 mm. Ils ont été soit évaporés à sec sous azote (débit : 0,5 mL/min) pour calculer le rendement d'extraction, soit réunis et évaporés à sec sous azote pour former un échantillon unique repris dans le solvant d'extraction à 10 000 µg/mL. Le rendement (en %) a été calculé selon le rapport entre la quantité de matière obtenue après extraction et la quantité de matière utilisée au départ.

2. TEST DE L'ACTIVITE ANTI-LIPASE ET CONDITIONS DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

Les effets des extraits d'*A. artemisiifolia* et de *S. canadensis* et standards analytiques ont été évalués sur l'activité catalytique de la lipase pancréatique à l'aide d'un test hors ligne basé sur l'EC optimisé dans une étude précédente [101,441,442]. Tris / MOPS (force ionique = 10 mM, pH 6,6) a été utilisé comme électrolyte de fond (BGE) et tampon d'incubation (IB) pour les réactions enzymatiques. Ainsi, 6 µL de lipase pancréatique (1 200 µg/mL) ont été pré-incubés pendant 5 min avec 10 µL des extraits de plantes étudiés (de 10 à 500 µg mL) dans 29 µL de Tris/MOPS IB à 37 °C. L'ajout de 5 µL de 4-NPB (100 µg/mL) a initié la réaction enzymatique. Après 5 minutes de réaction enzymatique, cette dernière a été arrêtée en augmentant la température à 90 °C pendant 10 minutes dans un bain d'eau chaude à 90 °C avant d'être stockée à -20 °C.

La longueur d'onde de détection a été réglée à 400 nm. Les capillaires ont été conditionnés avec 5 mM de LiOH, H_2O et BGE pendant au moins 15 min chacun, suivis de l'application de +30 kV pendant 15 min. Entre les analyses, le capillaire a été rincé avec du LiOH 5 mM (5 min), de l'H_2O (1 min), du HCl 5 mM (3 min), de nouveau de l'H_2O (1 min) et enfin du BGE (5 min). À la fin de chaque journée de travail, le capillaire a été rincé avec du LiOH et de l'eau 5 mM pendant au moins 15 minutes chacun. Tous les cycles de rinçage ont été effectués à 50 psi. Les séparations électrophorétiques ont été réalisées sous +20 kV à 37 °C.

Les solutions mères de lipase pancréatique ont été préparées en mettant en suspension la poudre d'enzyme lyophilisée dans l'IB à 10 000 µg/mL, suivie d'une agitation de 15 minutes avant de la conserver à 0 °C. Le 4-NPB a été choisi comme substrat de la lipase pancréatique en raison de la possibilité de suivre ses produits d'hydrolyse à λ = 400 nm. La solution de 4-NPB a été préparée dans de l'ACN à une concentration de 1 000 µg/mL. La solution mère d'*Orlistat* (inhibiteur référencé de la cible) a été préparée dans du DMSO à 70% à 3 000 µg/mL et a ensuite été diluée à 1 500 µg/mL dans de l'eau pour préparer la solution de travail. Sauf indication contraire, toutes les solutions ont été préparées dans de l'eau ultra pure et filtrées à travers des filtres de seringue en PVDF d'une taille de pores de 0,2 µm.

Toutes les réactions ont été réalisées en *triplicata* (n = 3) à 37 °C. Les CPA des produits de réaction représentaient les surfaces de pics corrigées pour le temps de migration. Les réactions témoins ont été réalisées en l'absence d'extraits. Des réactions de blancs ont également été réalisées en l'absence de l'enzyme, qui a été remplacée par l'IB, pour estimer l'hydrolyse spontanée non enzymatique du substrat 4-NPB. Les molécules modulatrices dans les réactions témoins ont été remplacées par leur pourcentage respectif d'EtOH. La modulation de l'activité de la lipase pancréatique a ensuite été calculée par rapport à l'activité de l'enzyme observée dans les réactions témoins. La modulation de l'activité enzymatique (activation et inhibition) a été calculée comme suit :

$$\%\ \text{Modulation} = \left|(1 - ((A_M - A_B)/(A_C - A_B))) \times 100\right|$$

Où A_M et A_C sont les CPAs des produits d'hydrolyse en présence et en absence des molécules modulatrices. A_B est le CPA des produits d'hydrolyse dans les essais de blancs. Le traitement des résultats a été réalisé comme en *section IV. A. 3. c)*.

3. CARACTERISATION DES ORGANES PAR U-PLC-UV/ESI-QqTOF-HRMS/MS

Les conditions opératoires des analyses UHPLC-UV/ESI-QqTOF-HRMS/MS des extraits d'*A. artemisiifolia* et de *S. canadensis* sont identiques à ce qui a été décrit en *section IV. B. 1. a)*.

D. OPTIMISATIONS DE LA MACERATION ASSISTEE PAR MICRO-ONDES : INFLUENCE DES PARAMETRES SUR LES TENEURS EN ACTIFS PRINCIPAUX

1. MATIERES PREMIERES UTILISEES

Deux plans d'expériences ont été effectués utilisant des matières premières végétales. Une partie de plante ou organe par plan d'expériences a alors été étudié(e). L'organe choisi pour le premier plan correspondait aux parties aériennes (feuilles et tiges) d'*A. artemisiifolia* et plus précisément aux rassemblements des parties aériennes séchées et broyées des surfaces de prélèvement 1 à 10 d'Hauteluce (voir *section I*). L'organe choisi pour le second plan correspondait aux rhizomes de *S. canadensis* et plus précisément aux rassemblements des rhizomes séchés et broyés des surfaces de prélèvement 1 à 10 de Veigy-Foncenex (voir *section I*).

2. CONSTRUCTION ET MODELISATION DES PLANS D'EXPERIENCES

La construction et modélisation des plans d'expériences à surface de réponse composite centré ont été réalisées *via* l'utilisation du logiciel statistique *Ellistat* version 6.9.5. Les matrices expérimentales des deux plans d'expériences sont présentées ci-après dans les *Tableaux 14* et *15, section IV. E. 3*. Les régressions polynomiales obtenues à l'issue des deux plans d'expériences étaient sous la forme :

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{j=1}^{k} \beta_j x_{ij} + \sum_{j=1}^{k} \beta_{jj} x_{ij}^2 + \sum_{j=1}^{k} \sum_{l=j+1}^{k} \beta_{jl} x_{ij} x_{il}$$

Avec Y_i la grandeur d'intérêt mesurée, la constante $\boldsymbol{\beta}_0$ correspondant à la valeur de Y au centre du domaine d'étude ($Y_0 = \boldsymbol{\beta}_0$), k le nombre de facteurs soit $k = 4$ dans les cas à l'étude, $\boldsymbol{\beta}_j$ et $\boldsymbol{\beta}_{jj}$ respectivement les coefficients linéaire et quadratique du facteur j, x_{ij} le niveau du facteur j, $\boldsymbol{\beta}_{jl}$ le coefficient rapporté à l'interaction entre les facteurs j et l, et enfin x_{il} le niveau du facteur l. Les modélisations ont été validées d'après les valeurs de leurs coefficients de corrélation ajustés, $R^{2ajustés} > 0,74$.

3. REALISATION DES ESSAIS

Chaque essai a été réalisé avec 1 g de matière broyée à 0,5 mm et selon les conditions indiquées dans *Tableaux* suivants *14* et *15. 3.* Des *triplicatas* ont été réalisés de manière indépendante. L'appareillage usité est décrit en *section III. A. 3*. Après chaque extraction, l'extrait obtenu a été filtré (PTFE 0,22 µm) puis analysé en UHPLC-UV (selon le protocole décrit en *section IV. B. 1. e).*). Les solutions des deux standards (5-*O*-CQA et du 3,5-DCQA) ont été préparées dans un mélange ($EtOH/H_2O$; 50/50) à 1 mg/mL. Des dilutions en cascade de ces dernières ont été injectées en UHPLC-UV également afin de réaliser les gammes d'étalonnage à l'UV (320 nm), présentées en *Annexe 8*. Les droites ainsi construites ont permis la quantification des acides 5-*O*-CQA et 3,5-DCQA. L'ensemble des réponses mesurées sont données en *Annexe 9*.

Tableau 14. Plan d'expériences élaboré pour A. artemisiifolia (premier plan).

	Puissance (W)	Nb de cycle(s)	V (mL)	Proportion eau dans EtOH
Niveau (-α)	200	1	5	0
Niveau (-1)	400	2	10	25
Niveau (-0)	600	3	15	50
Niveau (+1)	800	4	20	75
Niveau (+α)	1000	5	25	100

α = 2

Ordre Standard	Ordre Essais	Type de Point	Bloc	Puissance (W)	Nb de cycle(s)	V (mL)	Proportion eau dans EtOH
2	1	1	1	800	2	10	25
12	2	1	1	800	4	10	75
3	3	1	1	400	4	10	25
25	4	0	1	600	3	15	50
27	5	0	1	600	3	15	50
4	6	1	1	800	4	10	25
17	7	-1	1	200	3	15	50
26	8	0	1	600	3	15	50
30	9	0	1	600	3	15	50
13	10	1	1	400	2	20	75
7	11	1	1	400	4	20	25
28	12	0	1	600	3	15	50
31	13	0	1	600	3	15	50
9	14	1	1	400	2	10	75
20	15	-1	1	600	5	15	50
15	16	1	1	400	4	20	75
23	17	-1	1	600	3	15	0
16	18	1	1	800	4	20	75
11	19	1	1	400	4	10	75
21	20	-1	1	600	3	5	50
8	21	1	1	800	4	20	25
6	22	1	1	800	2	20	25
1	23	1	1	400	2	10	25
10	24	1	1	800	2	10	75
5	25	1	1	400	2	20	25
18	26	-1	1	1000	3	15	50
14	27	1	1	800	2	20	75

29	28	0	1	600	3	15	50
22	29	-1	1	600	3	25	50
19	30	-1	1	600	1	15	50
24	31	-1	1	600	3	15	100

Tableau 15. Plan d'expériences élaboré pour S. canadensis (second plan).

	Température* (°C)	Nb de cycle(s)	V (mL)	Proportion eau dans EtOH
Niveau (-α)	40	1	5	0
Niveau (-1)	45	2	10	25
Niveau (-0)	50	3	15	50
Niveau (+1)	55	4	20	75
Niveau (+α)	60	5	25	100

***α* = 2**

Ordre Standard	Ordre Essais	Type de Point	Bloc	Température (°C)	Nb de cycle(s)	V (mL)	Proportion eau dans EtOH
2	1	1	1	55	2	10	25
12	2	1	1	55	4	10	75
3	3	1	1	45	4	10	25
25	4	0	1	50	3	15	50
27	5	0	1	50	3	15	50
4	6	1	1	55	4	10	25
17	7	-1	1	40	3	15	50
26	8	0	1	50	3	15	50
30	9	0	1	50	3	15	50
13	10	1	1	45	2	20	75
7	11	1	1	45	4	20	25
28	12	0	1	50	3	15	50
31	13	0	1	50	3	15	50
9	14	1	1	45	2	10	75
20	15	-1	1	50	5	15	50
15	16	1	1	45	4	20	75
23	17	-1	1	50	3	15	0
16	18	1	1	55	4	20	75
11	19	1	1	45	4	10	75
21	20	-1	1	50	3	5	50
8	21	1	1	55	4	20	25
6	22	1	1	55	2	20	25
1	23	1	1	45	2	10	25
10	24	1	1	55	2	10	75
5	25	1	1	45	2	20	25
18	26	-1	1	60	3	15	50
14	27	1	1	55	2	20	75
29	28	0	1	50	3	15	50
22	29	-1	1	50	3	25	50
19	30	-1	1	50	1	15	50
24	31	-1	1	50	3	15	100

4. VERS L'ENRICHSSEMENT DES EXTRAITS EN ACTIFS ?

Les extraits d'*A. artemisiifolia* N°31 (100% H_2O), N°23 (75/25 EtOH/H_2O *v/v*) et N°11 (25/75 EtOH/H_2O *v/v*) (voir *Annexe 9*) et les extraits de *S. canadensis* N°31 (100% H_2O) et N°23 (75/25 EtOH/H_2O *v/v*) (voir *Annexe 9*) ont été évalués pour leurs propriétés anti-collagénase. Le dosage de l'activité anti-collagénase a été effectué selon la *section IV. A. 3. b). (3)*. Le traitement des résultats a été fait selon la *section IV. A. 3. c)*.

E ETUDE DE LA VARIABILITE PHYTOCHIMIQUE DES ESPECES VEGETALES EXOTIQUES ENVAHSSANTES

1. PREPARATION DES EXTRAITS

Les extraits (macération assistée par ultrasons) ont été préparés en suivant le protocole énoncé en *section IV. A. 1*. (conditions opératoires les plus favorables). Les extraits filtrés et évaporés, ont été repris avec de l'EtOH pour obtenir des solutions à 10 mg/mL. *n*= 6 échantillons indépendants par surface de prélèvement ont été réalisés. Le rendement d'extraction en % est déterminé par le rapport entre la quantité de matière obtenue après extraction et la quantité de matière utilisé au départ. Ce paramètre a permis d'étudier les impacts (organes, localisations géographiques, stades de développement) sur la composition phytochimique globale des extraits.

2. VARIABILITE POLYPHENOLIQUE : INFLUENCE DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE

a) CHEZ *FALLOPIA JAPONICA*

- Préparation des 2 plaques HPTLC pour les traitements statistiques :

Les deux parcelles étudiées étaient celles de Praz sur Arly et Voglans. Les feuilles (F) et les tiges (T) quant à elles provenaient de Saint-Alban-d'Hurtières. Les surfaces de prélèvement ont été choisies aléatoirement. Ont été déposés sur la plaque n°1, l'extrait de F, 8 extraits de partie aérienne (*PA = feuilles+tiges+fleurs*) correspondant à 8 des 15 surfaces de prélèvement de la parcelle de Praz sur Arly et 8 extraits de PA correspondant à 8 des 10 surfaces de prélèvement de la parcelle de Voglans. Sur la plaque n°2, les extraits de F et de T ont été déposés ainsi qu'un *duplicata* des 8 extraits de PA de Voglans et les 8 parties racinaires correspondantes de la même localisation (*PR = rhizomes*). Le système d'élution et révélation des composés polyphénoliques était celui décrit en *section IV. A. 2*.

- Analyses statistiques :

Les plaques (n°1 et n°2) ont été soumises au logiciel rTLC. Leurs photographies étaient réalisées à 366 nm. Les analyses statistiques non ciblées des extraits produits ont été réalisées selon le protocole décrit en *section IV. A.*

6. Deux ACPs avec correction ligne de base ont été réalisées : la première à partir des plaques n°1 et n°2 et la seconde à partir de la plaque n°2, uniquement.

b) CHEZ *AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA*

- Préparation des 2 plaques HPTLC pour les traitements statistiques :

Les deux parcelles étudiées étaient celles de Hauteluce et Cruet. Les feuilles (F) provenaient également de Cruet. Les surfaces de prélèvement ont été choisies aléatoirement. La plaque n°1 comportait deux standards déposés séparément (acide 5-*O*-caféoylquinique (1) et acide 3,5-dicaféoylquinique (2), 7 parties aériennes (7/10 zones) (*PA = feuilles+tiges*) et les 7 parties racinaires relatives (*PR = racines*) de la parcelle de Hauteluce. La plaque n°2 avait pour dépôts, l'extrait de F, 7 extraits de PA et 7 extraits de PR associées de stades de développement différents ; z3, z7 et z10 de la parcelle de Cruet (*S1 à S3*). La totalité des échantillons analysés ont été déposés une seule fois. Le système d'élution et révélation des composés polyphénoliques était celui décrit en *section IV. A. 2*.

- Analyses statistiques :

Les plaques (n°1 et n°2) ont été soumises au logiciel rTLC. Leurs photographies étaient réalisées à 366 nm. La luminosité des photographies a pu être modifiée *via* le logiciel *VisionCATS*. Les analyses statistiques non ciblées des extraits produits ont été réalisées selon le protocole décrit en *section IV. A. 6*. Quatre ACPs avec correction de ligne de base ont été réalisées : les deux premières à partir de la plaque n°1, la troisième à partir de la plaque n°2 et la dernière à partir des plaques n°1 et n°2.

c) CHEZ *SOLIDAGO CANADENSIS*

- Préparation des 2 plaques HPTLC pour les traitements statistiques :

Les deux parcelles étudiées étaient celles de Perrignier et Veigy-Foncenex. Les feuilles (F) et les rhizomes (R) quant à eux provenaient d'Yvoire. Les surfaces de prélèvement ont été choisies aléatoirement. La plaque n°1 correspondait à la localité de Perrignier et la plaque n°2 à celle de Veigy-Foncenex). Les dépôts étaient organisés selon le schéma : extraits de F et de R, 8 parties aériennes (8/10 zones) (*PA = feuilles+tiges+fleurs*) et les 8 parties racinaires associées (*PR = rhizomes*). La totalité des échantillons analysés ont été déposés une seule fois. Le système d'élution et révélation des composés polyphénoliques était celui décrit en *section IV. A. 2*.

- Analyses statistiques :

Les plaques (n°1 et n°2) ont été soumises au logiciel rTLC. Leurs photographies étaient réalisées à 366 nm. La luminosité des photographies a pu être modifiée *via* le logiciel *VisionCATS*. Les analyses statistiques non ciblées des extraits produits ont été réalisées selon le protocole décrit en *section IV. A. 6*. Trois ACPs ont été réalisées : la première sans correction à partir des plaques n°1 et n°2 (A), la seconde avec correction ligne de base à partir de la plaque n°1 (B) et la dernière avec correction ligne de base à partir de la plaque n°2 (C).

LISTES DES FIGURES

FIGURE 1. LES DIFFERENTS STADES DE L'INVASION BIOLOGIQUE. IMAGE ADAPTEE DE L'ARTICLE DE DAVID M. RICHARDSON ET COLLABORATEURS SUR LES CONCEPTS ET DEFINITIONS RELATIVES A LA NATURALISATION ET L'INVASION DES PLANTES EXOTIQUES [3]. 1
FIGURE 2. CATEGORISATION DES DECHETS DE PLANTES EXOTIQUES ENVAHISSANTES, ADAPTEE DU GUIDE POUR ACCOMPAGNER LE TRAITEMENT DES DECHETS DE PLANTES EXOTIQUES ENVAHISSANTES ISSUS D'INTERVENTION DE GESTION [17]. 4
FIGURE 3. INTERETS ET RISQUES EXISTANTS LIES A LA VALORISATION SOCIO-ECONOMIQUE DES EEE, D'APRES L'OUVRAGE PUBLIE PAR LE COMITE FRANÇAIS DE L'UNION INTERNATIONALE POUR LA CONSERVATION DE LA NATURE [18]. 5
FIGURE 4. LOGO DU PROJET INVAVAL, CREE ET DEMARRE EN 2019, AU SEIN DE L'UNIVERSITE SAVOIE MONT BLANC. 5
FIGURE 5. PRINCIPAUX GESTIONNAIRES ET ACTEURS DU TERRITOIRE SAVOIE MONT BLANC AYANT PARTICIPER AU PROJET INVAVAL. 6
FIGURE 6. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRATEGIE DE VALORISATION CHIMIQUE DES TROIS ESPECES VEGETALES EXOTIQUES ENVAHISSANTES (OU EVEE) DES SAVOIES, MISE EN PLACE DANS LE CADRE DU PROJET INVAVAL. 7
FIGURE 7. EXEMPLES DE DECLINS DE LA NATURE A L'ECHELLE MONDIALE RESULTANT DE FACTEURS DE CHANGEMENT DIRECTS ET INDIRECTS. IMAGE EXTRAITE DU RAPPORT DE L'EVALUATION MONDIALE DE LA BIODIVERSITE ET DES SERVICES ECOSYSTEMIQUES [13]. 10
FIGURE 8. METHODES ALTERNATIVES DE TRAITEMENT DES ESPECES VEGETALES EXOTIQUES ENVAHISSANTES ET EXEMPLES D'APPLICATIONS EXISTANTES. IMAGE ADAPTEE DU GUIDE POUR ACCOMPAGNER LE TRAITEMENT DES DECHETS DE PLANTES EXOTIQUES ENVAHISSANTES ISSUS D'INTERVENTION DE GESTION [17]. 13
FIGURE 9. COUPE TRANSVERSALE HISTOLOGIQUE DE LA PEAU DU CORPS HUMAIN, EXTRAITE DE [52]. 14
FIGURE 10. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU VIEILLISSEMENT CUTANE, ADAPTEE DE [58]. 16
FIGURE 11. VOIES METABOLIQUES DES LIPIDES DANS LE CORPS HUMAIN ET IMPORTANCE DES STRUCTURES DANS LA DIGESTION ET L'ABSORPTION DES LIPIDES, ADAPTEE DE [59,60]. 18
FIGURE 12. MECANISME D'ACTION ANTI-RADICALAIRE DU KAEMPFEROL POUR LE PIEGEAGE D'ANION SUPEROXIDE, ADAPTEE DE [73]. 20
FIGURE 13. MECANISMES REACTIONNELS MIS EN JEUX LORS DES TESTS CHIMIQUES (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP ET CHELATION AU FER) EN PRESENCE DE COMPOSES ANTIOXYDANTS. 21
FIGURE 14. MECANISMES REACTIONNELS MIS EN JEUX LORS DU TEST ENZYMATIQUE AVEC LA XANTHINE OXYDASE. 22
FIGURE 15. SCHEMA DE LA REACTION HYALURONIDASE-ACIDE HYALURONIQUE, ADAPTEE DE [58]. LA DOUBLE FLECHE REPRESENTE LE CLIVAGE DE LA LIAISON B-1,4 PAR L'ENZYME. 23
FIGURE 16. REACTION D'HYDROLYSE D'UN PEPTIDE PAR L'ELASTASE, ADAPTEE DE [58]. LA DOUBLE FLECHE REPRESENTE LE CLIVAGE PREFERENTIEL DES ACIDES AMINES PAR L'ENZYME. 24
FIGURE 17. MISE EN EVIDENCE DES GROUPES CHIMIQUES DE FLAVONOÏDES POTENTIELLEMENT RESPONSABLES D'UN EFFET INHIBITEUR SUR L'ELASTASE, ADAPTEE DE [89]. 25
FIGURE 18. HYDROLYSE DU COLLAGENE PAR LA COLLAGENASE, ADAPTEE DE [58]. LA DOUBLE FLECHE REPRESENTE LE CLIVAGE DE LA LIAISON PEPTIDIQUE PAR L'ENZYME. 25
FIGURE 19. BIOSYNTHESE DE MELANINES. LES FLECHES REPRESENTENT LES EVENTUELS SITES DE POLYMERISATION, ADAPTEE DE [23,94] TRP1 ET TRP2 : DOPACHROME TAUTOMERASES OU RESPECTIVEMENT PROTEINE-1 LIEE A LA TYROSINE ET PROTEINE-2 LIEE A LA TYROSINE. 27
FIGURE 20. STRUCTURE GENERALE DE L'EPIDERME A GAUCHE ET ZOOM SUR LES MELANOSOMES SECRETANT LA MELANINE, EXTRAITE DE [23]. 27
FIGURE 21. SCHEMA DE LA REACTION D'HYDROLYSE D'UN TRIGLYCERIDE CATALYSEE PAR LA LIPASE, ADAPTEE DE [101]. 28
FIGURE 22. A) SCHEMA DU PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE : LES LIGNES CONTINUES SONT ASSOCIEES AUX CONDITIONS DE SEPARATION ET LES LIGNES DISCONTINUES AUX CONDITIONS D'INJECTION ELECTROCINETIQUE. B) PRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA MOBILITE DES ANALYTES A L'INTERIEUR DU CAPILLAIRE ET EQUATIONS S'Y RAPPORTANT. ADAPTES DE [105]. 30
FIGURE 23. POSITIONS SYSTEMATIQUES DES TROIS ESPECES VEGETALES EXOTIQUES ENVAHISSANTES. LEURS SOUS-ESPECES NE SONT PAS PRECISEES. ADAPTEE DE LA DERNIERE VERSION DE LA CLASSIFICATION DU GROUPE DE PHYLOGENIE DES ANGIOSPERMES DATANT DE 2016 [111]. 33
FIGURE 24. DESSIN D'UNE JEUNE POUSSE DE FALLOPIA JAPONICA, REALISE PAR LETICHE PIERRE-ALEXIS. 35
FIGURE 25. FALLOPIA JAPONICA. PRESENTE DANS LES SAVOIES EN BORDS DE ROUTE DANS LES COMMUNES DE LA MOTTE-SERVOLEX (A) ET DE SAINT-ALBAN-D'HURTIERES (B) ; ET EN BORDURE DU SIERROZ (C) ET DU LAC DU BOURGET (D). 36
FIGURE 26. PRINCIPAUX STILBENES IDENTIFIES OU ISOLES DE F. JAPONICA, ADAPTEE DE [133]. GLC = GLUCOSE. 43
FIGURE 27. PRINCIPALES QUINONES IDENTIFIEES OU ISOLEES DE F. JAPONICA, ADAPTEE DE [115,133]. GLC = GLUCOSE. 44
FIGURE 28. PRINCIPAUX FLAVONOÏDES IDENTIFIES OU ISOLES DE F. JAPONICA, ADAPTEE DE [133]. 45
FIGURE 29. IMAGE MEB DE POLLEN EXTRAITE DE L'ARTICLE DE M. TURKALJ ET COLLABORATEURS RELATIF A LA RHINITE ALLERGIQUE [542]. 46
FIGURE 30. DESSIN D'A. ARTEMISIIFOLIA EN FLORAISON DE HAUTE-SAVOIE REALISE PAR LETICHE PIERRE-ALEXIS. 46
FIGURE 31. A. ARTEMISIIFOLIA PRESENTE DANS LES DEUX SAVOIES EN BORD DE ROUTE DANS LA COMMUNE D'HAUTELUCE (A) ; ET DANS DES TERRAINS AGRICOLES DES COMMUNES DE CRUET ET DE LA MOTTE-SERVOLEX (RESPECTIVEMENT B ET C). 47
FIGURE 32. PRINCIPAUX ACIDES PHENOLIQUES IDENTIFIES OU ISOLES DE A. ARTEMISIIFOLIA [260]. 53
FIGURE 33. PRINCIPAUX FLAVONOÏDES IDENTIFIES OU ISOLES CHEZ A. ARTEMISIIFOLIA [217]. 54
FIGURE 34. PRINCIPALES SESQUITERPENES LACTONES IDENTIFIEES OU ISOLEES CHEZ A. ARTEMISIIFOLIA [227]. 55
FIGURE 35. DESSINS DES ORGANES DECOUPES DU S. CANADENSIS SAVOYARD REALISES PAR LETICHE PIERRE-ALEXIS. 56
FIGURE 36. S. CANADENSIS PRESENT DANS LES SAVOIES SUR UN CHANTIER DE RESTAURATION DU RUISSEAU DES GLAIRES DANS LA COMMUNE DE SAINT GEORGES D'HURTIERES (A) ; ET EN BORDS DE ROUTE DANS LES COMMUNES DE LA MOTTE-SERVOLEX ET DE VEIGY-FONCENEX (RESPECTIVEMENT B ET C) 57
FIGURE 37. ACIDES PHENOLIQUES PRESENTS CHEZ S. CANADENSIS [316]. 63
FIGURE 38. PRINCIPAUX FLAVONOÏDES IDENTIFIES CHEZ S. CANADENSIS [316,371]. 64

FIGURE 39. DITERPENES DE TYPE LABDANE (A) ET DE TYPE CLERODANE (B) PRESENTS CHEZ S. CANADENSIS [313,343,378]. 65
FIGURE 40. PRESENTATION DES DOUZE PRINCIPES DEVELOPPES SELON LE CONCEPT DE CHIMIE VERTE, ADAPTEE DE [384]. 66
FIGURE 41. PRESENTATION DES SIX PRINCIPES ASSOCIES A L'ECO-EXTRACTION DES VEGETAUX, ADAPTEE DE [385]. 67
FIGURE 42.MACERATION ASSISTEE PAR ULTRASONS REPOSANT SUR LE PHENOMENE DE CAVITATION, ADAPTEE DE [390]. 68
FIGURE 43. DOMAINE DES MICRO-ONDES DANS LE SPECTRE ELECTROMAGNETIQUE, ADAPTEE DE [395,400]. 70
FIGURE 44. MECANISMES DE L'EXTRACTION ASSISTEE PAR MICRO-ONDES DU VEGETAL, ADAPTEE DE [390,400]. 71
FIGURE 45. EXEMPLE D'UN PLAN COMPOSITE A DEUX FACTEURS, ADAPTEE DE [404]. 75
FIGURE 46. EXEMPLES DE SURFACES DE REPONSES POUR DEUX FACTEURS MIS EN JEU, ADAPTEE DE [406]. 76
FIGURE 47. INTERPRETATION DES COEFFICIENTS EN REGRESSION QUADRATIQUE, ADAPTEE DE [406]. 76
FIGURE 48. FONCTIONNEMENT D'UN SYSTEME HPLC, PERMETTANT L'OBTENTION DE PICS CHROMATOGRAPHIQUES [407,408]. 77
FIGURE 49. INTERET DE REDUIRE LA TAILLE DES MICROPARTICULES SPHERIQUES DE LA PHASE STATIONNAIRE, CONTENUE DANS LA COLONNE ANALYTIQUE, ADAPTEE DE [411,412]. 78
FIGURE 50. INTERFACE TLC CAMAG DU COUPLAGE TLC/ESI-TQ-MS ET DESCRIPTIF DE SON SYSTEME D'ELUTION AVEC BUSE, CAMAG. 79
FIGURE 51. EVOLUTION DU RENDEMENT D'EXTRACTION EN FONCTION DE LA DUREE DE SONICATION ET DU TYPE DE REACTEUR. N = 3 EXPERIMENTATIONS INDEPENDANTES AVEC POSITIONNEMENTS DANS LE BAC A ULTRASONS DIFFERENTS (± ECART TYPE). 83
FIGURE 52. EXTRACTIONS DIVERSES DES FEUILLES DE F. JAPONICA OBTENUES PAR MACERATION CLASSIQUE OU ASSISTEE AVEC DES ULTRASONS. LES RENDEMENTS BRUTES ($R_{N°}$) SONT DONNES EN %. N = 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES (± ECART TYPE). 84
FIGURE 53. EVALUATION DES CAPACITES ANTIOXYDANTES DPPH DE FEUILLES, DE FLEURS, DE LA PARTIE AERIENNE ET DE RHIZOMES DE F. JAPONICA. N = 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES POUR CHAQUE CONCENTRATION TESTEES (µG/ML). LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT ± ECART TYPE. 86
FIGURE 54. DETERMINATION DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES (DPPH, ABTS) DES EXTRAITS D'A. ARTEMISIIFOLIA ET S. CANADENSIS. *SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENT P < 0,05 ET ** SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENT DE L'AUTRE MAIS PAS SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENT ENTRE EUX. N = 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES POUR CHAQUE CONCENTRATION (µG/ML). LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT ± ECART TYPE. 87
FIGURE 55. DETERMINATION DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES (CUPRAC, FRAP ET CHELATION AU FER) DES EXTRAITS D'A. ARTEMISIIFOLIA ET S. CANADENSIS. N = 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES POUR CHAQUE CONCENTRATION (µG/ML). LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT ± ECART TYPE. *SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENT P < 0,05 ET ** SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENT DE L'AUTRE MAIS PAS SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENT ENTRE EUX. 89
FIGURE 56. EQUIVALENT ACTIVITE SUPEROXIDE DISMUTASE DES EXTRAITS ETHANOLIQUES BRUTS DE F. JAPONICA, A. ARTEMISIIFOLIA ET S. CANADENSIS DE SAVOIE MONT BLANC. N = 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES POUR CHAQUE CONCENTRATION TESTEES (µG/ML). LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT ± ECART TYPE. 90
FIGURE 57. EXEMPLES D'ELECTROPHEROGRAMMES (I-III) MONTRANT L'EFFET INHIBITEUR SUR LA HYALURONIDASE D'UN EXTRAIT ETHANOLIQUE BRUT DE PARTIE AERIENNE DE F. JAPONICA. (I) EXTRAIT A 10 µG/ML ; (II) DOSAGE ENZYMATIQUE EN L'ABSENCE DE L'EXTRAIT ET (III) DOSAGE ENZYMATIQUE EN PRESENCE DE L'EXTRAIT A 10 µG/ML. HYAL : HYALURONIDASE ET AH : ACIDE HYALURONIQUE. 91
FIGURE 58. EVALUATION DE L'ACTIVITE RESIDUELLE HYALURONIDASE DES EXTRAITS DE F. JAPONICA, A. ARTEMISIIFOLIA ET S. CANADENSIS. CP = CONTROLE POSITIF ET (EGCG) = GALLATE D'EPIGALLOCATECHINE. N = 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES POUR CHAQUE CONCENTRATION (µG/ML). LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT ± ECART TYPE. 92
FIGURE 59. EVALUATION DES ACTIVITES RESIDUELLES ELASTASE DES EXTRAITS BRUTS DE F. JAPONICA, A. ARTEMISIIFOLIA ET S. CANADENSIS. CP = CONTROLE POSITIF ; (A) = N-METHOXYSUCCINYL-ALA-ALA-PRO-VAL-CHLOROMETHYL CETONE. N = 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES POUR CHAQUE CONCENTRATION (µG/ML). LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT ± ECART TYPE. 94
FIGURE 60. EVALUATION DES ACTIVITES RESIDUELLES COLLAGENASE DES EXTRAITS BRUTS DE F. JAPONICA, A. ARTEMISIIFOLIA ET S. CANADENSIS. CP = CONTROLE POSITIF ; (B) = 1,10-PHENANTHROLINE, MONOHYDRATE. N = 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES POUR CHAQUE CONCENTRATION (µG/ML). LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT ± ECART TYPE. 96
FIGURE 61. EVALUATION DE L'ACTIVITE RESIDUELLE TYROSINASE DES EXTRAITS BRUTS DE F. JAPONICA, A. ARTEMISIIFOLIA ET S. CANADENSIS. CP = CONTROLE POSITIF ET (GLA) = GLABRIDINE. N = 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES POUR CHAQUE CONCENTRATION (µG/ML). LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT ± ECART TYPE. 98
FIGURE 62. HISTOGRAMMES ILLUSTRANT LES TENEURS EN COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX (A DROITE) ET EN FLAVONOÏDES TOTAUX (A GAUCHE) DES EXTRAITS BRUTS. FLEURS (FL), FEUILLES (F), TIGES (T), RHIZOMES (R). CES DERNIERES SONT RESPECTIVEMENT EXPRIMEES EN EQUIVALENT ACIDE GALLIQUE (EAG) ET EQUIVALENT RUTINE (ER) PAR G D'EXTRAIT SEC (ES). N=3. A = SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENT DU RESTE DES EXTRAITS TESTES. B = SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENT DES EXTRAITS DE TIGES DES AUTRES PLANTES. C = SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENT DES EXTRAITS DE FEUILLES DES AUTRES PLANTES.* = STATISTIQUEMENT SIGNIFICATIF AU NIVEAU DE CONFIANCE DE 99,9%. 99
FIGURE 63. ANALYSE HPTLC DES SUCRES PRESENTS DANS LES ORGANES DE F. JAPONICA (VOGLANS), A. ARTEMISIIFOLIA (CRUET) ET S. CANADENSIS (PERRIGNIER). FLEURS = FL. FEUILLES = F. TIGES OU CANNES = T. PARTIES AERIENNES = PA. RACINES = R. RHIZOMES = RHIZ. *STADE DE DEVELOPPEMENT DIFFERENT (STADE 2* ≠ STADE 1). ♦ LOCALISATION GEOGRAPHIQUE DIFFERENTE (YVOIRE♦ ≠ PERRIGNIER). DERIVATIONS CHIMIQUES AU REACTIF DE MOLICH. 101
FIGURE 64. ANALYSE HPTLC DES LIPIDES ET TERPENES PRESENTS DANS LES ORGANES DE F. JAPONICA (VOGLANS), A. ARTEMISIIFOLIA (CRUET) ET S. CANADENSIS (PERRIGNIER). FLEURS = FL. FEUILLES = F. TIGES OU CANNES = T. PARTIES AERIENNES = PA. RACINES = R. RHIZOMES = RHIZ. *STADE DE DEVELOPPEMENT DIFFERENT (STADE 2* ≠ STADE 1). ♦ LOCALISATION GEOGRAPHIQUE DIFFERENTE (YVOIRE♦ ≠ PERRIGNIER). DERIVATIONS CHIMIQUES PRIMULINE (LIPIDES) ET/PUIS ANISALDEHYDE (TERPENES). 104
FIGURE 65. ANALYSE HPTLC DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES PRESENTS DANS LES ORGANES DE F. JAPONICA (SAINT-ALBAN-D'HURTIERES OU VOGLANS), A. ARTEMISIIFOLIA (CRUET) ET S. CANADENSIS (HOUCHES). FLEURS = FL. FEUILLES = F. TIGES OU CANNES = T. PARTIES AERIENNES = PA. RACINES = R. RHIZOMES = RHIZ. DERIVATIONS CHIMIQUES NEU PUIS PEG. 106
FIGURE 66. ANALYSE HPTLC DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES PRESENTS DANS LES ORGANES DE F. JAPONICA (SAINT-ALBAN-D'HURTIERES OU VOGLANS), A. ARTEMISIIFOLIA (CRUET) ET S. CANADENSIS (HOUCHES). FLEURS = FL. FEUILLES = F. TIGES OU CANNES = T. PARTIES AERIENNES = PA. RACINES = R. RHIZOMES = RHIZ. DERIVATIONS CHIMIQUES NEU PUIS PEG. 108

FIGURE 67. PLAQUE TLC REALISEE POUR ETUDIER L'INFLUENCE DE L'ORGANE. DE GAUCHE A DROITE LES ORGANES SONT : FEUILLES+TIGES (1), FEUILLES (2), TIGES (3) ET RACINES (4) D'A. ARTEMISIIFOLIA. PUIS FEUILLES (5), TIGES (6) ET FLEURS (7) DE F. JAPONICA. PUIS FEUILLES (8), TIGES (9), RHIZOMES (10) DE S. CANADENSIS LOCALITE 1. PUIS FEUILLES (11), TIGES (12) ET FLEURS (13) DE S. CANADENSIS LOCALITE 2. 109
FIGURE 68. ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES DES DIFFERENTS ORGANES DE FALLOPIA JAPONICA (F), AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA (A) ET SOLIDAGO CANADENSIS (S). FLEURS = FL ; FEUILLES = F ; TIGES = T ET RACINES OU RHIZOMES = R. SANS CORRECTION OU AVEC CORRECTION DE LA LIGNE DE BASE OU CORRECTION CENTRAGE MOYEN. SYSTEMES D'ELUTION ET DE REVELATION ASSOCIES A LA FAMILLE DES COMPOSES PHENOLIQUES. 110
FIGURE 69. RESUME GRAPHIQUE RELATIF A LA SECTION « VALORISATION DANS LE SECTEUR DERMO-COSMETIQUE DE F. JAPONICA ». 113
FIGURE 70. CHROMATOGRAMMES UV DES EXTRAITS ETHANOLIQUES DE FEUILLES (EN HAUT) ET DE FLEURS (EN BAS) DE FALLOPIA JAPONICA OBTENUS PAR UHPLC-UV-Q-TOF-HRMS/MS. AC = ACIDE CHLOROGENIQUE ; P = POLYDATINE ; RESV = RESVERATROL ; PHYS = PHYSCION ET E = EMODINE. LES HYPOTHESES D'IDENTIFICATIONS SONT DONNEES DANS LE TABLEAU 7, LA NUMEROTATION DES PICS EST RESPECTEE. 114
FIGURE 71. A) PRESENTATION DES BPCS (BASE PEAK CHROMATOGRAMS) DES ANALYSES UHPLC-UV-Q-TOF-HRMS EN MODE NEGATIF DES EXTRAITS DE FEUILLES ET DE FLEURS DE FALLOPIA JAPONICA. LE LOGICIEL METABOLITEDETECT A PERMIS DE REALISER LES SOUSTRACTIONS DES BPCS DES ORGANES. *EXEMPLE D'IDENTIFICATION (EN ROSE) DONNE EN B). LES HYPOTHESES D'IDENTIFICATIONS SONT DONNEES DANS LE TABLEAU 7, LA NUMEROTATION DES PICS EST RESPECTEE. 115
FIGURE 72. (A) MISE EN EVIDENCE DU CARACTERE ANTIOXYDANT DES ORGANES AERIENS DE FALLOPIA JAPONICA. (B) CAPACITES ANTIOXYDANTES DES PARTIES AERIENNE ET RACINAIRE DE FALLOPIA JAPONICA ET DETERMINATION DES PRINCIPALES MOLECULES ACTIVES. 119
FIGURE 73. . DETECTION DE TROIS ZONES ACTIVES DANS LA PARTIE AERIENNE (FEUILLES ET CANNES) ET DE TROIS ZONES ACTIVES DANS LES RHIZOMES SUR TYROSINASE (TYR.), ENTOUREES EN NOIR SUR LA PLAQUE. PROPOSITIONS D'IDENTIFICATIONS D'INHIBITEURS DE LA TYROSINASE A L'AIDE DE HPTLC-BIOAUTOGRAPHIE /HRMS EN MODE D'IONISATION NEGATIVE ; ZONES MARQUEES D'UNE LETTRE. 121
FIGURE 74. EVALUATION DES ACTIVITES ANTI-TYROSINASE DES STANDARDS DE STILBENES RESVERATROL (A) ET POLYDATINE (B). 122
FIGURE 75. IDENTIFICATION PUTATIVE D'INHIBITEURS POTENTIELS DE LA TYROSINASE (TYR.) A L'AIDE DE HPTLC-BIOAUTOGRAPHIE/MS EN MODE D'IONISATION NEGATIVE ; ZONES MARQUEES D'UNE LETTRE. M/Z : RAPPORT MASSE SUR CHARGE. 123
FIGURE 76. ELECTROPHEROGRAMMES OBTENUS AVEC CE-UV POUR LES DOSAGES DE LA HYALURONIDASE : DOSAGE CONTROLE EN L'ABSENCE DE STANDARDS INHIBITEURS (I) ET EFFET A 50 µG/ML DE L'ACIDE CHLOROGENIQUE (II) ET DU RESVERATROL (III). HYAL : HYALURONIDASE ET AH : ACIDE HYALURONIQUE. IDENTIFICATION DES PICS : FLUX ELECTROOSMOTIQUE (EOF) A 6 MIN ET PIC (A) : TETRASACCHARIDE MIGRANT A 13 MIN. 125
FIGURE 77. EVALUATION DES ACTIVITES RESIDUELLES HYALURONIDASE (A), ELASTASE (B), COLLAGENASE (C) ET TYROSINASE (D) DE QUELQUES STANDARDS SELECTIONNES. CP = CONTROLE POSITIF ; (EGCG) = GALLATE D'EPIGALLOCATECHINE, (A) = N-METHOXYSUCCINYL-ALA-ALA-PRO-VAL-CHLOROMETHYL CETONE, (B) = 1,10-PHENANTHROLINE, MONOHYDRATE ET (GLA) = GLABRIDINE. 126
FIGURE 78. PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES (UV A 285 NM) DES EXTRAITS DE FALLOPIA JAPONICA OBTENUS PAR UHPLC-UV-Q-TOF-HRMS/MS. IDENTIFICATIONS DE CINQ METABOLITES SPECIALISES D'INTERET SUR LES QUATRE CIBLES ENZYMATIQUES ETUDIEES (HYALURONIDASE, ELASTASE, COLLAGENASE ET TYROSINASE) : ACIDE CHLOROGENIQUE (1), POLYDATINE (2), RESVERATROL (3), PHYSCION (4) ET EMODINE (5). D'AUTRES COMPOSES IDENTIFIES CORRESPONDANT A DIVERS DERIVES CHIMIQUES ONT ETE EGALEMENT RAPPORTES (VOIR TABLEAU 8). 130
FIGURE 79. PROFILS POLYPHENOLIQUES HPTLC DES EXTRAITS HYDRO-ALCOOLIQUES DE PARTIES AERIENNES (R1 A R10) ET DE RHIZOMES (R11 A R20) DE F. JAPONICA. PRESENCES DE RESVERATROL, POLYDATINE ET EMODINE DANS LES DIVERS EXTRAITS REPRESENTES. 133
FIGURE 80. A) REPRESENTATION DES AIRES EN UAU SOUS LES PICS OBTENUES PAR UHPLC-UV A 285 NM DANS DIFFERENTS EXTRAITS (R1 A R20). B) DOSAGES DES TROIS COMPOSES CONSTITUTIFS DANS LES EXTRAITS DE RHIZOMES DE F. JAPONICA. LES COURBES ETALONNAGES ASSOCIEES SONT DONNEES EN ANNEXE 12. N=3 ECHANTILLONS INDEPENDANTS INJECTES UNE FOIS. CV = COEFFICIENT DE VARIATION. 134
FIGURE 81. A) ANALYSE HPTLC DES EXTRAITS BRUTS DE A. ARTEMISIIFOLIA ET S. CANADENSIS. MISE EN EVIDENCE DE DEUX ACIDES PRINCIPAUX PRESENTS DANS LES QUATRE ORGANES (HRF 50 ET 90 ; CERCLES EN NOIR SUR LA PLAQUE). EXEMPLES DE COMPOSES POUVANT CORRESPONDRE AUX COULEURS PRODUITES. B) MISE EN EVIDENCE DES PRINCIPAUX COMPOSES ANTIOXYDANTS CHEZ A. ARTEMISIIFOLIA ET S. CANADENSIS (HPTLC-DPPH). DEPOTS DE DEUX STANDARDS : 3,5-DCQA (HRF 90) ET 5-O-CQA (HRF 50). * L'IDENTIFICATION ETAIT PROVISOIRE. 136
FIGURE 82. PLAQUE HPTLC-DPPH REALISEE POUR ETUDIER L'INFLUENCE DU STADE DE CROISSANCE CHEZ A. ARTEMISIIFOLIA SUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE. F= FEUILLES (RECOLTEE AU S3) ; PA = PARTIE AERIENNE = FEUILLES+TIGES ET PR = PARTIE RACINAIRE = RACINES. Z = ZONES. S1 A S3. 138
FIGURE 83. ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES DES ORGANES D'AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA (FEUILLES OU F ; PARTIE AERIENNE (FEUILLES ET TIGES) OU PA ET PARTIE RACINAIRE OU PR). CORRECTION DE LA LIGNE DE BASE APPLIQUEE. Z = ZONE. S1-S3 CORRESPONDENT AUX STADES DE DEVELOPPEMENT 1 A 3. SYSTEMES D'ELUTION ASSOCIES A LA FAMILLE DES COMPOSES PHENOLIQUES ET REVELATION DPPH (ACTIVITE ANTIOXYDANTE). 139
FIGURE 84. ANALYSE HPTLC-ACTIVITE TYROSINASE/HRMS EN MODE D'IONISATION NEGATIVE : DETECTION DES ZONES ACTIVES ANTI-TYROSINASE DES DIFFERENTS ORGANES D'A. ARTEMISIIFOLIA ET S. CANADENSIS ET PROPOSITIONS D'IDENTIFICATIONS DES ACTIFS. RF = FACTEUR DE RETENTION. PHASE MOBILE DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES. LES SPECTRES DE MASSE DES SPOTS ACTIFS DANS LESQUELLES DES COMPOSES RESTENT ENCORE NON IDENTIFIES A CE JOUR (NI) SONT DONNES EN ANNEXE 6. 141
FIGURE 85. EVALUATION DES ACTIVITES HYALURONIDASE (A), ELASTASE (B), COLLAGENASE (C) ET TYROSINASE (D) RESIDUELLES DU 5-O-CQA ET 3,5-DCQA ET DE LEUR MELANGE. (EGCG) = GALLATE D'EPIGALLOCATECHINE ; (A) = N-METHOXYSUCCINYL-ALA-ALA-PRO-VAL-CHLOROMETHYL CETONE ; (B) = 1,10-PHENANTHROLINE, MONOHYDRATE ET (GLA) = GLABRIDINE. N = 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES POUR CHAQUE CONCENTRATION (µG/ML). LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT ± ECART TYPE. 143
FIGURE 86. RESUME DES ACTIVITES OBTENUES DANS LE CADRE DE LA PREMIERE PARTIE DES TRAVAUX RELATIVE AU CRIBLAGE ET A L'EVALUATION DES EXTRAITS BRUTS. EB = EXTRAIT BRUT. PA = PARTIE AERIENNE. R = RACINES. RHIZ. = RHIZOMES.**VOIR I. D. 2. POUR PLUS DE DETAILS. 144
FIGURE 87. RESUME GRAPHIQUE RELATIF A LA PARTIE DE TRAVAUX « VALORISATION DANS LE SECTEUR NUTRACEUTIQUE D'AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA ET DE SOLIDAGO CANADENSIS ». 150
FIGURE 88. EVALUATION DES ACTIVITES ANTI-LIPASE DES EXTRAITS ETHANOLIQUES D'A. ARTEMISIIFOLIA ET S. CANADENSIS ET DES DEUX ACIDES PHENOLIQUES 5-O-CQA ET 3,5-DCQA PAR CE-UV. N = 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES POUR CHAQUE CONCENTRATION (µG/ML). LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT ± ECART TYPE. *SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENT P < 0,05 ET ** SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENT DE L'AUTRE MAIS PAS SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENT ENTRE EUX. 151

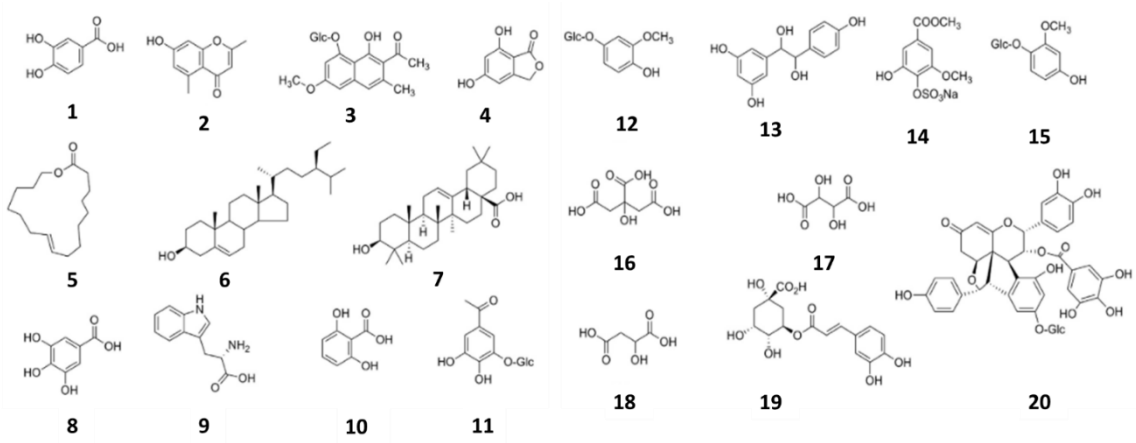
FIGURE 89. ANALYSE UHPLC-UV-Q-TOF-HRMS EN MODE NEGATIF D'IONISATION (UV A 285 NM) DES EXTRAITS BRUTS D'A. ARTEMISIIFOLIA ET S. CANADENSIS. PA = PARTIE AERIENNE (FEUILLES ET TIGES) ; R = RACINES ET RHIZ.= RHIZOMES. ACIDE 5-O-CAFEOYLQUINIQUE (1), ACIDE 3,5-DICAFEOYLQUINIQUE (2), QUERCITRINE (•), ACIDE 3,4-DICAFEOYLQUINIQUE (♦) ET ACIDE 4,5-DICAFEOYLQUINIQUE (✧). LES PROPOSITIONS D'IDENTIFICATIONS DES COMPOSES A-Z ET A'-S' SONT DONNEES TABLEAU 9. 153
FIGURE 90. DIAGRAMMES DE SURFACE DE REPONSES DES RENDEMENTS D'EXTRACTION (EN %) A PARTIR DE DE PARTIE AERIENNE D'AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA EN FONCTION DES NIVEAUX DES PRINCIPAUX PARAMETRES DE MAE. 168
FIGURE 91. DIAGRAMMES DE SURFACE DE REPONSES DES RENDEMENTS D'EXTRACTION (EN %) A PARTIR DE PARTIE RACINAIRE DE SOLIDAGO CANADENSIS EN FONCTION DES NIVEAUX DES PRINCIPAUX PARAMETRES DE MAE. 169
FIGURE 92. DIAGRAMMES DE SURFACE DE REPONSES DES TENEURS EN 5-O-CQA (EN µG/ML ; = CONCENTRATION AC) A PARTIR DE DE PARTIE AERIENNE D'AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA EN FONCTION DES NIVEAUX DES PRINCIPAUX PARAMETRES DE MAE. 171
FIGURE 93. DIAGRAMMES DE SURFACE DE REPONSES DES TENEURS EN 5-O-CQA (EN µG/ML ; = CONCENTRATION AC) A PARTIR DE PARTIE RACINAIRE DE SOLIDAGO CANADENSIS EN FONCTION DES NIVEAUX DES PRINCIPAUX PARAMETRES DE MAE. 172
FIGURE 94. DIAGRAMMES DE SURFACE DE REPONSES DES TENEURS EN 3,5-DCQA (EN µG/ML ; = CONCENTRATION AIC) A PARTIR DE DE PARTIE AERIENNE D'AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA EN FONCTION DES NIVEAUX DES PRINCIPAUX PARAMETRES DE MAE. 174
FIGURE 95. DIAGRAMMES DE SURFACE DE REPONSES DES TENEURS EN 3,5-DCQA (EN µG/ML ; = CONCENTRATION AIC) A PARTIR DE PARTIE RACINAIRE DE SOLIDAGO CANADENSIS EN FONCTION DES NIVEAUX DES PRINCIPAUX PARAMETRES DE MAE. 175
FIGURE 96. DIAGRAMMES DE SURFACE DE REPONSES DE LA SOMME DES AIRES EN 5-O-CQA ET 3,5-DCQA (= SOMME AIRES PICS AC+AIC) A PARTIR DE DE PARTIE AERIENNE D'AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA EN FONCTION DES NIVEAUX DES PRINCIPAUX PARAMETRES DE MAE. 176
FIGURE 97. DIAGRAMMES DE SURFACE DE REPONSES DE LA SOMME DES AIRES EN 5-O-CQA ET 3,5-DCQA (= SOMME AIRES PICS AC+AIC) A PARTIR DE PARTIE RACINAIRE DE SOLIDAGO CANADENSIS EN FONCTION DES NIVEAUX DES PRINCIPAUX PARAMETRES DE MAE. 177
FIGURE 98. EVALUATION DES ACTIVITES RESIDUELLES COLLAGENASE DES EXTRAITS BRUTS ISSUS DES PLANS D'EXPERIENCES. 180
FIGURE 99. PLAQUES HPTLC REALISEES POUR ETUDIER L'INFLUENCE DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE CHEZ F. JAPONICA. A GAUCHE : PLAQUE N°1 ET A DROITE PLAQUE N°2. PA = PARTIE AERIENNE = FEUILLES+TIGES+FLEURS ET PR = PARTIE RACINAIRE = RHIZOMES. Z = ZONES. SYSTEMES D'ELUTION ET DE REVELATION ASSOCIES A LA FAMILLE DES COMPOSES PHENOLIQUES. 185
FIGURE 100. ANALYSES EN COMPOSANTE PRINCIPALE DES DIFFERENTS ORGANES DE F. JAPONICA (FEUILLES OU F ; TIGES OU T ; RHIZOMES OU PR ; PARTIE AERIENNE OU PA (FEUILLES+CANNES). L1 ET L2 = PRAZ SUR ARLY ET VOGLANS, RESPECTIVEMENT. Z = ZONE ET / = LOCALISATION GEOGRAPHIQUE SAINT-ALBAN-D'HURTIERES. 186
FIGURE 101. PRESENTATION DES RENDEMENTS D'EXTRACTION MOYENS EN % (N = 6) OBTENUS : A) DES ORGANES DE F. JAPONICA DANS CHAQUE LOCALISATION GEOGRAPHIQUE ; B) PAR ZONES POUR LES DEUX ORGANES DE F. JAPONICA. Z = ZONE. LES MOYENNES♦ CORRESPONDENT AUX MOYENNES DE L'ENSEMBLE DES ZONES PAR ORGANE. PARTIE AERIENNE COMPOSEE DE FEUILLES ET CANNES ET PARTIE RACINAIRE DES RHIZOMES. 187
FIGURE 102. PLAQUES HPTLC REALISEES POUR ETUDIER L'INFLUENCE DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE CHEZ A. ARTEMISIIFOLIA. A GAUCHE : PLAQUE N°1 ET A DROITE PLAQUE N°2. PA = PARTIE AERIENNE = FEUILLES+TIGES ET PR = PARTIE RACINAIRE = RACINES. Z = ZONES. LUMINOSITE AUGMENTEE SUR LA PLAQUE N°1 VIA LE LOGICIEL VISIONCATS. 1 = ACIDE 5-CAFEOYLQUINIQUE ET 2 = ACIDE 3,5-DICAFEOYLQUINIQUE. S1 A S3 = STADES DE CROISSANCE 1 A 3. SYSTEMES D'ELUTION ET DE REVELATION NEU-PEG ASSOCIES A LA FAMILLE DES COMPOSES PHENOLIQUES. 189
FIGURE 103. ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES DES DIFFERENTS ORGANES D'AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA (FEUILLES OU F ; PARTIE AERIENNE (FEUILLES+TIGES) OU PA ET PARTIE RACINAIRE OU PR). Z = ZONE. S1-S3 CORRESPONDENT AUX STADES DE DEVELOPPEMENT 1 A 3. CORRECTION DE LA LIGNE DE BASE APPLIQUEE. *SIGNIFIE QUE LA LUMINOSITE A ETE AUGMENTEE. 190
FIGURE 104. PRESENTATION DES RENDEMENTS D'EXTRACTION MOYENS EN % (N = 6) OBTENUS : A) DES ORGANES DE A. ARTEMISIIFOLIA DANS CHAQUE LOCALISATION GEOGRAPHIQUE : B) PAR ZONES POUR LES DEUX ORGANES D'A. ARTEMISIIFOLIA. Z = ZONE. LES MOYENNES♦ CORRESPONDENT AUX MOYENNES DE L'ENSEMBLE DES ZONES PAR ORGANE. *DES INTEMPERIES ONT DETRUITS LES PLANTS SE SITUANT DANS LES ZONES 1 A 6. **STADE VEGETATIF ENTRE LE STADE 2 ET 3. PARTIE AERIENNE COMPOSEE DE FEUILLES ET TIGES ET PARTIE RACINAIRE DES RACINES. 192
FIGURE 105. PLAQUES HPTLC REALISEES POUR ETUDIER L'INFLUENCE DE LA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE CHEZ S. CANADENSIS. A GAUCHE : PLAQUE N°1 ET A DROITE PLAQUE N°2. PA = PARTIE AERIENNE = FEUILLES+TIGES+FLEURS ET PR = PARTIE RACINAIRE = RHIZOMES. Z = ZONES. SYSTEMES D'ELUTION ET DE REVELATION NEU-PEG ASSOCIES A LA FAMILLE DES COMPOSES PHENOLIQUES. 193
FIGURE 106. ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES DES DIFFERENTS ORGANES DE SOLIDAGO CANADENSIS (PARTIE RACINAIRE = PR = RHIZOMES ; PARTIE AERIENNE = PA (FEUILLES+TIGES+FLEURS). L1 = PERRIGNIER ET L2 = VEIGY-FONCENEX. Z = ZONE ET / = LOCALISATION GEOGRAPHIQUE YVOIRE. LES FEUILLES (F) ET LES RHIZOMES (R) PROVIENNENT D'YVOIRE. 194
FIGURE 107. PRESENTATION DES RENDEMENTS D'EXTRACTION MOYENS EN % (N = 6) OBTENUS : A) DES ORGANES DE S. CANADENSIS DANS CHAQUE LOCALISATION GEOGRAPHIQUE ; B) PAR ZONES POUR LES DEUX ORGANES DE S. CANADENSIS. Z = ZONE. LES MOYENNES♦ CORRESPONDENT AUX MOYENNES DE L'ENSEMBLE DES ZONES PAR ORGANE. PARTIE AERIENNE COMPOSEE DE FEUILLES, TIGES ET FLEURS. PARTIE RACINAIRE CORRESPOND AUX RHIZOMES. 196
FIGURE 108. GRANDES ETAPES DU DEVELOPPEMENT D'UN ACTIF (DERMO-)COSMETIQUE OU NUTRACEUTIQUE, ADAPTEE DE [390]. 204
FIGURE 109. CARTE DES LOCALISATIONS DES COLLECTES DES MATIERES PREMIERES VEGETALES F. JAPONICA, A. ARTEMISIIFOLIA ET S. CANADENSIS SUR LE TERRITOIRE SAVOIE MONT BLANC, ADAPTEE DE [402,403]. 206
FIGURE 110. LES DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT D'A. ARTEMISIIFOLIA COLLECTES AVANT FLORAISON (EVITER RISQUE ALLERGIQUE). 207
FIGURE 111. EXEMPLES SCHEMATIQUES DES DECOUPAGES TERRAIN REALISES AVEC A. ARTEMISIIFOLIA. 208

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1. Metabolites primaires decrits chez F. japonica. Les organes concernes sont precises entre parentheses. 38
Tableau 2. Travaux anterieurs realises sur F. japonica (3 pages). 40
Tableau 3. Metabolites primaires decrits chez A. artemisiifolia. Les organes concernes sont precises entre parentheses. 49
Tableau 4. Travaux anterieurs realises sur A. artemisiifolia (2 pages). 51
Tableau 5. Metabolites primaires decrits chez S. canadensis. Les organes concernes sont precises entre parentheses. 59
Tableau 6. Travaux anterieurs realises sur S. canadensis (2 pages). 61
Tableau 7. Hypotheses d'identifications relatives aux pics numerotes Figures 70 et 71, la numerotation des pics est respectee. NI = Non identifie. Pics discriminants en gris. Fl = fleurs et F = feuilles. 115
Tableau 8. Hypotheses d'identification des principaux composes presents dans la partie aerienne et les rhizomes de Fallopia japonica par UHPLC/HRMS/MS. 131
Tableau 9. Analyses UHPLC-UV-Q-TOF-HRMS en mode ionisation negative : propositions d'identifications des composes presents chez A. artemisiifolia et S. canadensis. Acide cafeoylquinique : CQA et acide dicafeoylquinique : DCQA. *Identifications des composes 1, 2 et • confirmees par les normes commerciales. Certaines intensites relatives sont donnees pour l'extrait de rhizomes de S. canadensis (% d'intensite relative) dans la colonne Fragments. Les couleurs mettent en avant les composes communs entre les quatre extraits. 154
Tableau 10. Classements resumes des extraits bruts d'Ambrosia artemisiifolia et de Solidago canadensis sur les cibles dermo-cosmetique et nutraceutique evaluees dans la premiere partie des travaux I. D. et la troiseme partie des travaux III. B. Respectivement en vert et gris, le meilleur et le moins bon inhibiteur. Les proportions relatives des standards d'acides phenoliques des extraits sont egalement recapitulees. 161
Tableau 11. Facteurs et domaine d'etude pour les deux plans d'experiences realises. *= 4EME facteur du premier plan et ** = 4EME facteur du second plan. 164
Tableau 12. Coefficients de regression polynomiale obtenus fonction des variables pour la modelisation des reponses Y1 a Y4 a partir de partie aerienne d'A. artemisiifolia. Les termes non-significatifs (p > 0,05) ont ete exclus. Les equations correspondantes sont donnees en bas du tableau. p ≤ 0,001 en gris et p ≤ 0,002 en orange. 165
Tableau 13. Coefficients de regression polynomiale obtenus fonction des variables pour la modelisation des reponses Y1 a Y4 a partir de partie racinaire de S. canadensis. Les termes non-significatifs (p > 0,05) ont ete exclus. Les equations correspondantes sont donnees en bas du tableau. p ≤ 0,001 en gris, p < 0,05 en orange et p ≤ 0,01 en vert. 166
Tableau 14. Plan d'experiences elabore pour A. artemisiifolia (premier plan). 229
Tableau 15. Plan d'experiences elabore pour S. canadensis (second plan). 230

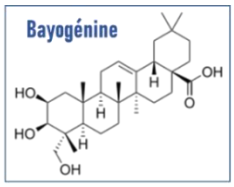
ANNEXES

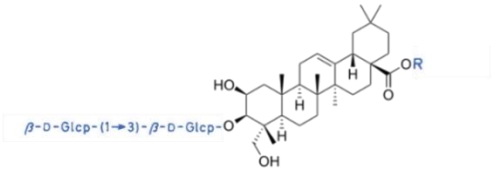
I. STRUCTURES AUTRES COMPOSES IDENTIFIES CHEZ *FALLOPIA JAPONCA*



1 : Acide protocatéchique
2 : 2,5-diméthyl-7-hydroxy chromone
3 : Torachrysone-8-*O*-*d*-glucoside
4 : 5,7-dihydroxy1(3H)-isobenzofuranone
5 : Ambrettolide
6 : *ß*-sitostérol
7 : Acide oléanolique
8 : Acide gallique
9 : Tryptophane
10 : Acide 2,6-dihydroxy-benzoïque
11 : 1-(3-*O*-*ß*-*D*-glucopyranosyl-4,5-dihydroxy-phényl)-éthanone
12 : Tachioside
13 : 1-(3',5'-dihydroxyphényl)-2-(4''-hydroxyphenyl)-éthane1,2-diol
14 : Acide méthyl ester-4- 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoïque sulfate sodium
15 : Isotachioside
16 : Acide citrique
17 : Acide tartarique
18 : Acide hydroxysuccinique
19 : Acide chlorogénique
20 : Polyflavanostilbène A

II. PRINCIPALES SAPONINES IDENTIFIEES CHEZ *SOLIDAGO CANADENSIS*





Canadensissaponine 1

R = α-L-Rhp-(1→3)-β-D-Xylp-(1→4)-α-L-Rhp-(1→2)-β-D-6-DGlcp-(1→ ; β-D-Api-D-f-(1→3) ; β-D-Xylp-(1→3)

Canadensissaponine 2

R = α-L-Rhp-(1→3)-β-D-Xylp-(1→4)-α-L-Rhp-(1→2)-Arap-(1→ ; β-D-Api-D-f-(1→3) ; β-D-Xylp-(1→3)

Canadensissaponine 3

R = α-L-Rhp-(1→3)-β-D-Xylp-(1→4)-α-L-Rhp-(1→2)-β-D-6-DGlcp-(1→ ; α-L-Rhp-(1→3) ; β-D-Xylp-(1→3)

Canadensissaponine 4

R = α-L-Rhp-(1→3)-β-D-Xylp-(1→4)-α-L-Rhp-(1→2)-Arap-(1→ ; α-L-Rhp-(1→3) ; β-D-Xylp-(1→3)

Canadensissaponine 5

R = β-D-Gal-(1→2)-α-L-Rhp-(1→3)-β-D-Xylp-(1→4)-α-L-Rhp-(1→2)-β-D-6-Dglcp-(1→ ; β-D-Api-D-f-(1→3) ; β-D-Xylp-(1→3)

Canadensissaponine 6

R = β-D-Gal-(1→2)-α-L-Rhp-(1→3)-β-D-Xylp-(1→4)-α-L-Rhp-(1→2)-Arap-(1→ ; β-D-Api-D-f-(1→3) ; β-D-Xylp-(1→3)

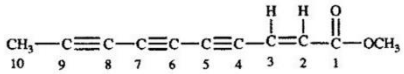
Canadensissaponine 7

R = β-D-Gal-(1→2)-α-L-Rhp-(1→3)-β-D-Xylp-(1→4)-α-L-Rhp-(1→2)-β-D-6-Dglcp-(1→ ; α-L-Rhp-(1→3) ; β-D-Xylp-(1→3)

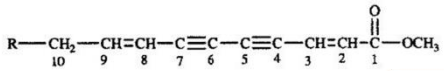
Canadensissaponine 8

R = β-D-Gal-(1→2)-α-L-Rhp-(1→3)-β-D-Xylp-(1→4)-α-L-Rhp-(1→2)-Arap-(1→ ; α-L-Rhp-(1→3) ; β-D-Xylp-(1→3)

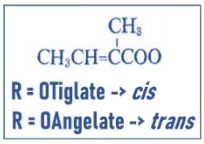
III. PRINCIPAUX POLYACETYLENES IDENTIFIES CHEZ *SOLIDAGO CANADENSIS*

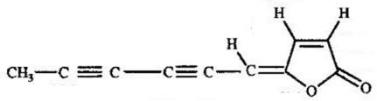


(*E*)-8-dehydromatricaria ester



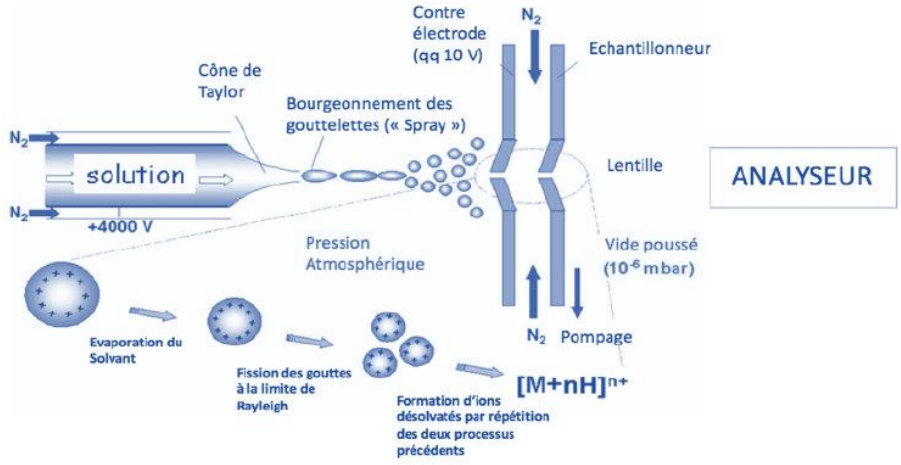
2Z, 8Z, R = OTiglate
2Z, 8Z, R = OAngelate
2E, 8Z, R = OAngelate





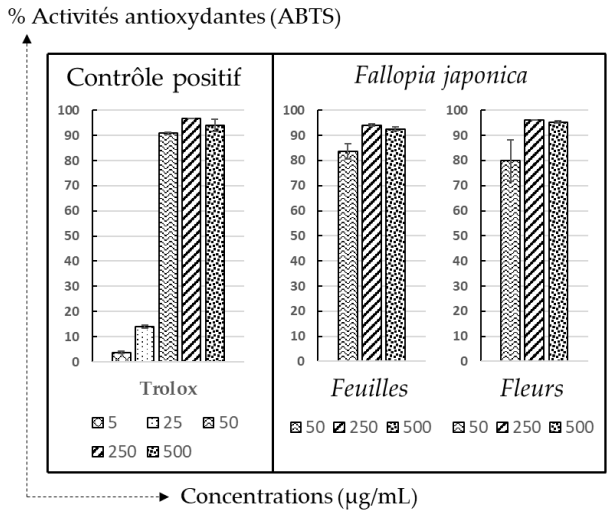
(*E*)-dehydromatricaria lactone

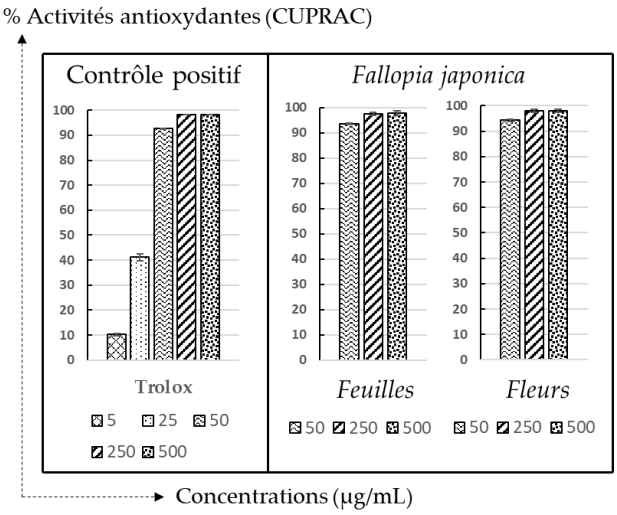
IV. PRINCIPE DE LA SOURCE ELECTROSPRAY (ESI)

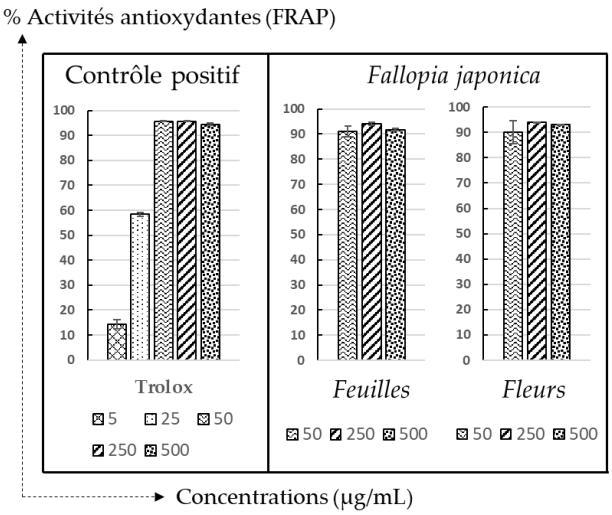


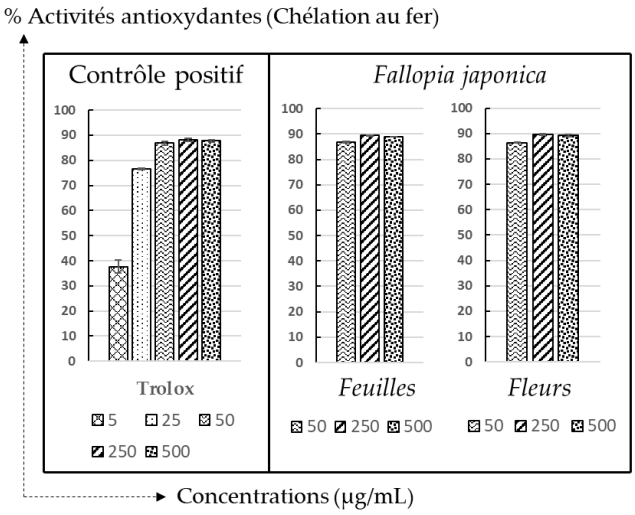
V. DOSAGES ABTS, CUPRAC, FRAP ET DE CHELATION AU FER DE *FALLOPIA JAPONCA*

Evaluation des capacités antioxydantes (ABTS, FRAC, CUPRAC, Chélation du fer) des extraits éthanoliques bruts de feuilles et de fleurs de *F. japonica*. *n* = 3 expériences indépendantes pour chaque concentration testées (µg/mL). Les barres d'erreur représentent ± écart type.



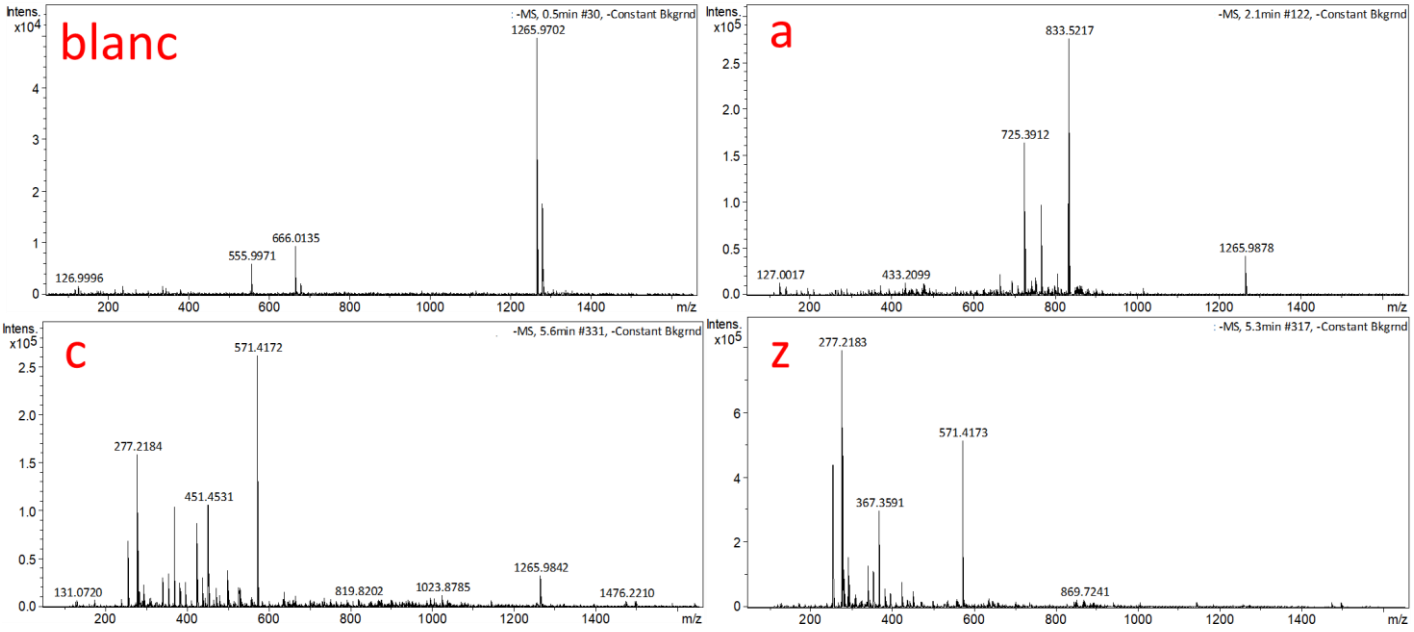




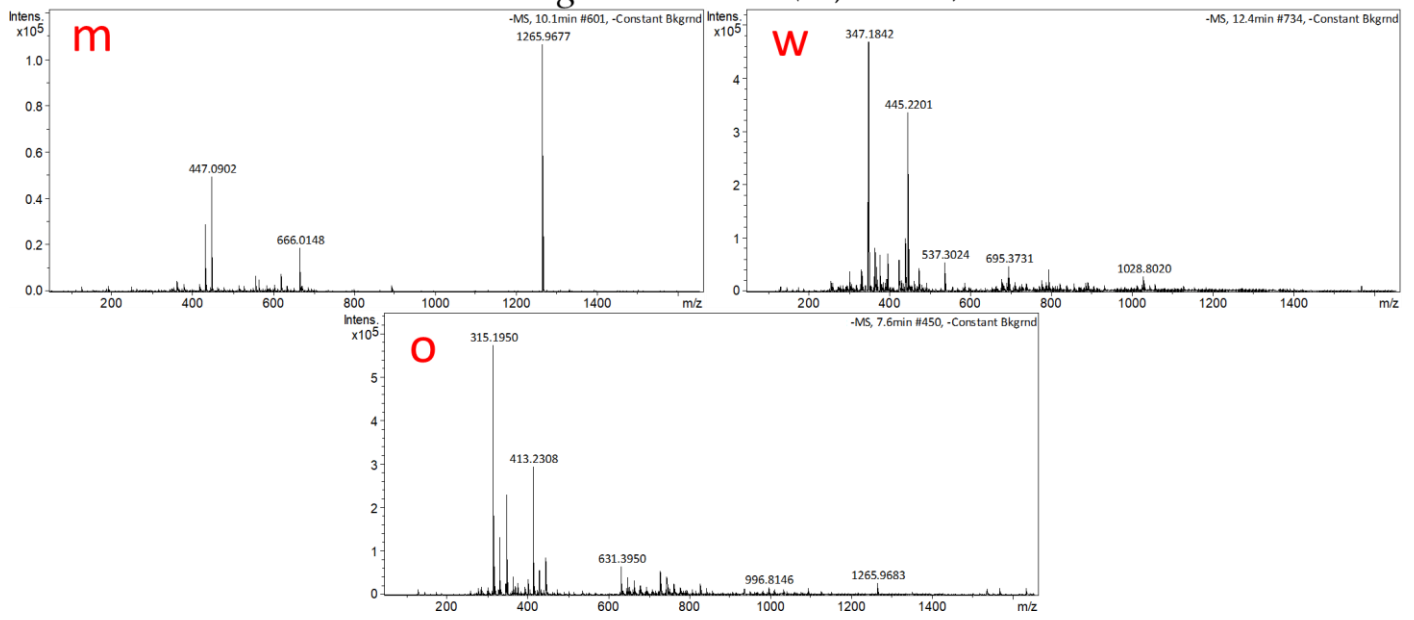


VI. SPECTRES DE MASSES OBTENUS DES COMPOSES NON IDENTIFIES (N)

Ambrosia artemisiifolia (a, c et z)

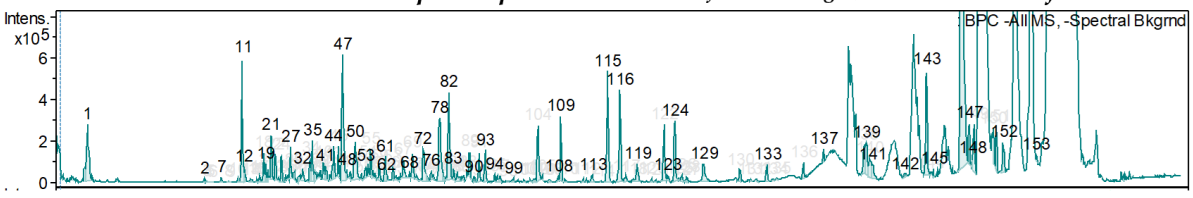


Solidago canadensis (m, w et o)

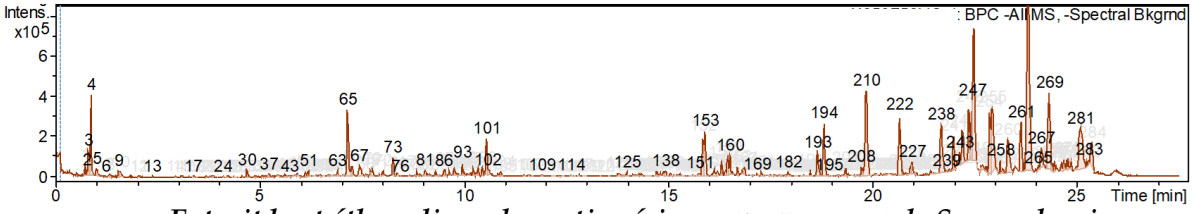


VII. BPCS MODE D'IONISATION NEGATIF DES ORGANES D'*AMBROSIA ARTEMSIIFOLIA* ET *SOLIDAGO CANADENSIS*

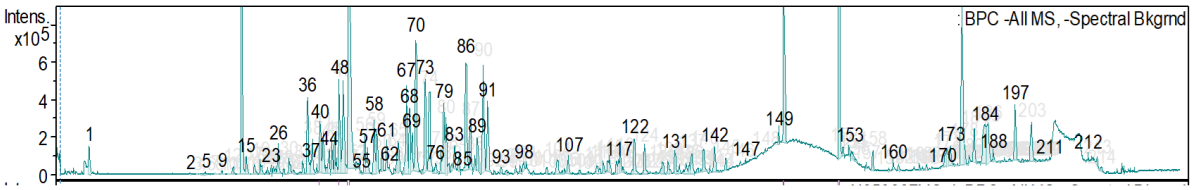
Extrait brut éthanolique de partie aérienne (feuilles et tiges) d'A. artemisiifolia



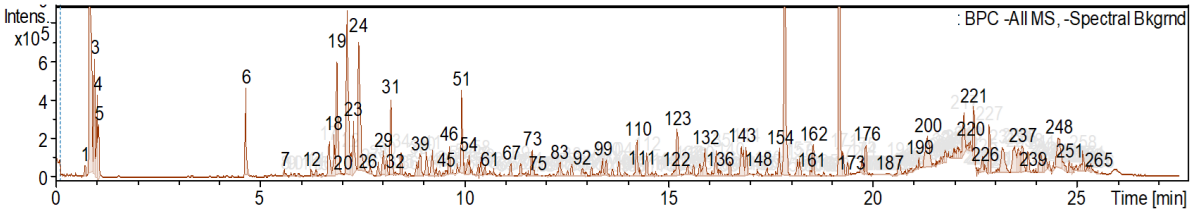
Extrait brut éthanolique de racines d'A. artemisiifolia



Extrait brut éthanolique de partie aérienne (feuilles et tiges) de S. canadensis

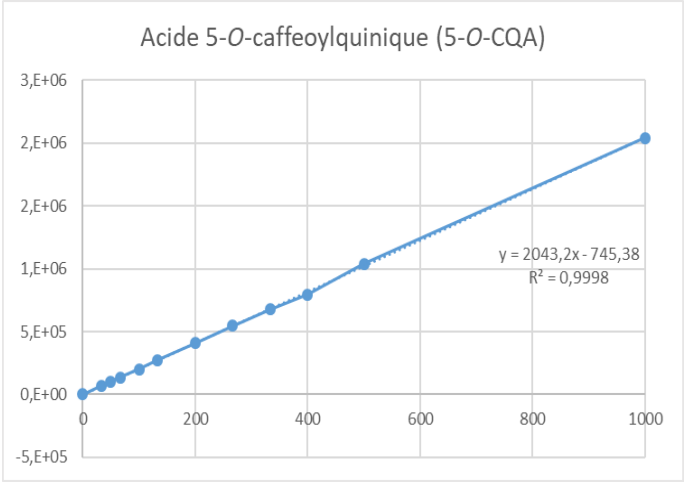


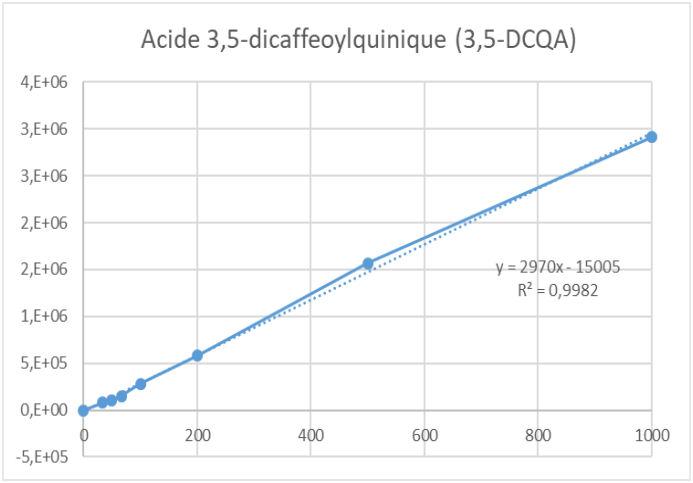
Extrait brut éthanolique de rhizomes de S. canadensis



VIII. COURBES D'ETALONNAGE DU 5-*O*-CQA ET DU 3,5-DCQA

Gammes d'étalonnage à l'UV (320 nm) ayant permis les dosages du 5-*O*-CQA et du 3,5-DCQA présents dans les différents extraits hydro-alcooliques obtenus à partir d'*A. artemisiifolia* ou de S. canadensis. Les courbes correspondent à l'aire du pic en fonction de la concentration (en µg/mL). Surfaces de pics en uAU.





IX REPONSES OBTENUES POUR LES DEUX PLANS D'EXPERIENCES

Réponses obtenues pour *A. artemisiifolia* :

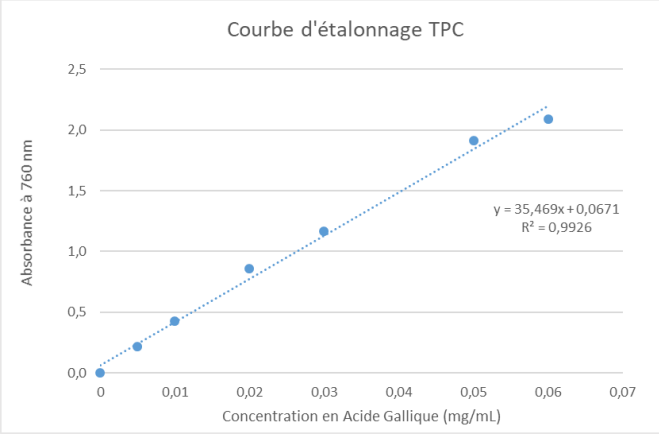
Ordre Essais	Rendement (%)	Aire AC	Aire AIC	SOMME Aires (AC+AIC)	Concentration AC (µg/mL)	Concentration AIC (µg/mL)	Concentration AC (µg/mL)/ Concentration AIC (µg/mL)
1	11,66	646539	278533	925072	317	99	3,2
2	17,69	406773	96708	503481	199	38	5,3
3	9,76	678314	302507	980821	332	107	3,1
4	18,28	662390	248336	910726	325	89	3,7
5	18,66	665642	247423	913065	326	88	3,7
6	11,80	636496	267184	903680	312	95	3,3
7	24,04	524428	192998	717426	257	70	3,7
8	21,03	628543	238209	866752	308	85	3,6
9	19,58	646129	231997	878126	317	83	3,8
10	22,45	282400	54879	337279	139	24	5,9
11	15,78	644769	259207	903976	316	92	3,4
12	18,98	653260	247018	900278	320	88	3,6
13	18,84	640431	233954	874385	314	84	3,7
14	16,09	295251	52560	347811	145	23	6,4
15	21,73	556495	207361	763856	273	75	3,6
16	23,58	199399	40067	239466	98	19	5,3
17	4,46	428317	307204	735521	210	108	**1,9**
18	23,22	356523	85700	442223	175	34	5,2
19	15,96	333594	70843	404437	164	29	5,7
20	9,46	468927	149046	617973	230	55	4,2
21	15,68	675041	277510	952551	331	98	3,4
22	14,48	621979	261129	883108	305	93	3,3
23	11,48	591083	262764	853847	290	94	3,1
24	19,27	387702	89437	477139	190	35	5,4
25	14,68	684610	282351	966961	335	100	3,4
26	25,49	529235	203521	732756	259	74	3,5
27	24,20	232236	46597	278833	114	21	5,5
28	17,75	679369	257362	936731	333	92	3,6
29	21,14	544098	196803	740901	267	71	3,7
30	21,81	636095	247598	883693	312	88	3,5
31	24,82	0	0	0	0	5	**0,0**

Réponses obtenues pour *S. canadensis* :

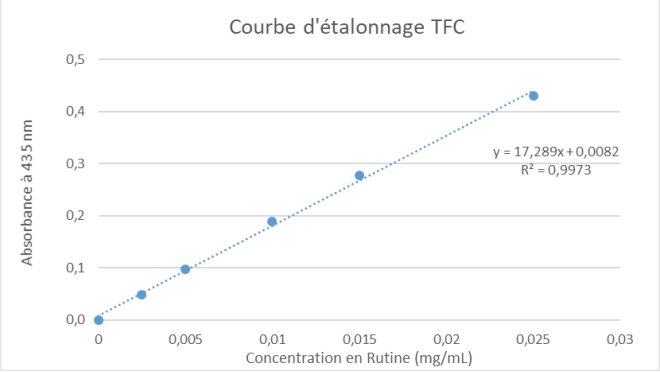
Ordre Essais	Rendement (%)	Aire AC	Aire AIC	SOMME Aires (AC+AIC)	Concentration AIC (µg/mL)	Concentration AC (µg/mL)	Concentration AC (µg/mL)/ Concentration AIC (µg/mL)
1	11,11	138671	194983	333654	71	68	1,0
2	20,33	80926	75703	156629	31	40	1,3
3	11,93	140941	201534	342475	73	69	1,0
4	19,38	108266	134121	242387	50	53	1,1
5	20,17	102091	131568	233659	49	50	1,0
6	12,21	158226	224334	382560	81	78	1,0
7	20,21	70444	91528	161972	36	35	1,0

8	20,99	106786	136603	243389	51	53	1,0
9	19,74	108800	138678	247478	52	54	1,0
10	22,22	54342	32794	87136	16	27	1,7
11	14,06	144801	205636	350437	74	71	1,0
12	20,46	91081	112804	203885	43	45	1,0
13	19,80	92045	120020	212065	45	45	1,0
14	17,63	45536	36348	81884	17	23	1,3
15	24,56	91969	119726	211695	45	45	1,0
16	26,09	32646	22898	55544	13	16	1,3
17	3,79	53423	127156	180579	48	27	**0,6**
18	25,87	63142	63869	127011	27	31	1,2
19	20,81	59376	44187	103563	20	29	1,5
20	11,37	97828	134223	232051	50	48	1,0
21	14,37	119058	164794	283852	61	59	1,0
22	16,00	117346	161493	278839	59	58	1,0
23	12,13	115543	163553	279096	60	57	**0,9**
24	22,71	73512	78253	151765	31	36	1,2
25	15,60	110147	150942	261089	56	54	1,0
26	22,99	96502	127049	223551	48	48	1,0
27	25,80	42633	35291	77924	17	21	1,3
28	20,22	99568	134794	234362	50	49	1,0
29	16,79	97406	120520	217926	46	48	1,1
30	19,49	107115	131534	238649	49	53	1,1
31	22,95	6700	2508	9208	6	4	**0,6**

X. COURBE D'ETALONNAGE TENEURS EN COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX (TPC)

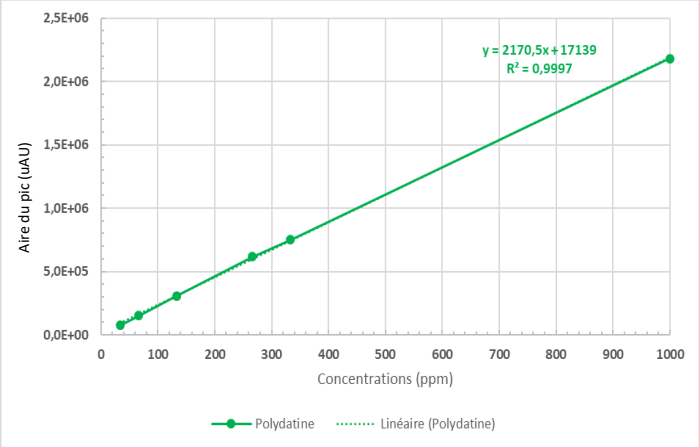


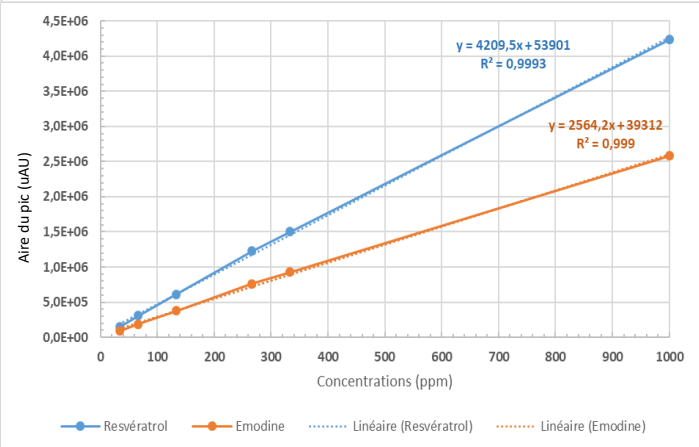
XI. COURBE D'ETALONNAGE TENEURS EN FLAVONOÏDES TOTAUX (TFC)



XII. COURBES D'ETALONNAGE POLYDATINE, RESVERATROL ET EMODINE

Gammes d'étalonnage à l'UV (285 nm) ayant permis les dosages de la polydatine, du resvératrol et de l'émodine présents dans les différents extraits hydroalcooliques obtenus à partir des rhizomes de *F. japonica*.





REFERENCES

1. Lockwood, J.L.; Hoopes, M.F.; Marchetti, M.P. Invasion Ecology. *John Wiley & Sons*. 2013. ISBN 978-1-118-57082-1.

2. Mooney, H.A.; Mack, R.; McNeely, J.A.; McNeely, J.A.; Neville, L.E.; Schei, P.J.; Waage, J.K. Invasive Alien Species: A New Synthesis. *Island Press*. 2005. ISBN 978-1-55963-363-5.

3. Richardson, D.M.; Pysek, P.; Rejmanek, M.; Barbour, M.G.; Panetta, F.D.;West, C.J. Naturalization and Invasion of Alien Plants: Concepts and Definitions. *Divers. Distrib*. 2000, 6, 93–107. doi:10.1046/j.1472-4642.2000.00083.x.

4. Pyšek, P.; Hulme, P.E.; Simberloff, D.; Bacher, S.; Blackburn, T.M.; Carlton, J.T.; Dawson, W.; Essl, F.; Foxcroft, L.C.; Genovesi, P.; *et al*. Scientists' Warning on Invasive Alien Species. *Biol. Rev*. 2020, 95, 1511–1534. doi:10.1111/brv.12627.

5. Conseil de l'Europe, Convention Relative à la Conservation de la Vie Sauvage et du Milieu Naturel de l'Europe. STE 104. Berne, 19.IX,1979.

6. RÈGLEMENT (UE) Nº 1143/2014 Du Parlement Européen et du Conseil Relatif à La Prévention et à La Gestion de l'introduction et de La Propagation Des Espèces Exotiques Envahissantes. *J. Officiel de l'Union Européenne*. 2014.

7. RÈGLEMENT D'EXÉCUTION (UE) 2019/1262 de la Commission, modifiant le règlement d'exécution (UE) 2016/1141 pour mettre à jour la liste des espèces exotiques envahissantes préoccupantes pour l'Union. *J. officiel de l'Union européenne*. 2019, 4.

8. LOI N° 2016-1087 Du 8 Août 2016 Pour La Reconquête de La Biodiversité, de La Nature et Des Paysages. *J. Officiel de la République Française*. 2016.

9. Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de La Mer, Stratégie Nationale Relative Aux Espèces Exotiques Envahissantes. 2017, 1-44.

10. Ministère de La Transition Ecologique, Plan d'action 2022-2030 Pour Prévenir l'Introduction et La Propagation Des Espèces Exotiques Envahissantes. 2022, 1-72.

11. Assemblée Nationale. Rapport d'information déposé en application de l'article 145 du règlement, par la commission du développement durable et de l'aménagement du territoire sur la prolifération des plantes invasives et les moyens pour endiguer cette situation. Available online: https://www.assemblee-nationale.fr/dyn/15/rapports/cion-dvp/l15b4391_rapport-information (accessed on 29 June 2022).

12. Westman, W.E. Managing for Biodiversity. *BioScience*. 1990, 40, 1, 26-33.

13. Watson, R.T.; Baste, I.A.; Larigauderie, A.; Leadley, P.; Pascual, U.; Baptiste, B.; Demissew, S.; Dziba, L.; Erpul, G.; Fazel, A.; *et al*. Membres du Comité de Gestion ayant fourni des Orientations pour la Réalisation de la Présente Evaluation. *IPBES*, 2019, 1-60.

14. Kettunen, M.; Genovesi, P.; Gollasch, S.; Pagad, S.; Starfinger, U. Technical Support to EU Strategy on Invasive Alien Species. Assessment of the Impacts of IAS in Europe and the EU. *Institute European Environ. Policy*. **2007**, 1-131.

15. CBNMC, DREAL. Liste hiérarchisée des plantes exotiques envahissantes d'Auvergne. 2017, 1-4.

16. Debay, P.; Legland, T.; Pache, G.; Merhan, B. Liste actualisée et hiérarchisée des Espèces Exotiques Envahissantes. Bilan de la problématique végétale invasive en Rhône-Alpes. Conservatoire botanique national alpin. **2020**, 1-45.

17. Freudenreich, M ; Condal, V. Accompagner Le Traitement Des Déchets de Plantes Exotiques Envahissantes Issus d'interventions de Gestion. Guide Technique. Centre de Ressources Espèces Exotiques Envahissantes. UICN Comité Français, Office Français de La Biodiversité, Suez Recyclage et Valorisation France. **2022**. 1-136.

18. La Valorisation Socio-Économique Des Espèces Exotiques Envahissantes Établies En Milieux Naturels : Un Moyen de Régulation Adapté ? Première Analyse et Identification de Points de Vigilance. *UICN France*. **2018**, 1-84. ISBN: 978-2-918105-68-8.

19. Maurel, N. De l'introduction à l'invasion : Les Plantes Exotiques En Milieu Urbain. Thèse de doctorat en Ecologie, Paris, *Muséum national d'histoire naturelle*, **2010**.

20. Schnitzler-Lenoble, A.; Muller, S. Écologie et biogéographie de plantes hautement invasives en Europe : les renouées géantes du Japon (*Fallopia Japonica* et *F. sachalinensis*). *Rev. Ecol*. **1998**, 53, 3–38. doi:10.3406/revec.1998.2242.

21. Kozuharova, E.; Ionkova, I.; Raimondo, F. M. Invasive Alien Species: Potential Cheap Resources of Plant Substances for Medicinal Use. *Fl. Medit*. **2019**, 29. doi:10.7320/FlMedit29.013.

22. Peter, A.; Žlabur, J.Š.; Šurić, J.; Voća, S.; Purgar, D.D.; Pezo, L.; Voća, N. Invasive Plant Species Biomass—Evaluation of Functional Value. *Molecules*. **2021**, 26, 3814. doi:10.3390/molecules26133814.

23. Fernandez, X.; Michel, T.; Azoulay, S. Actifs cosmétiques à effet blanchissant - Nature, efficacité et risques. *Formulation*. **2015**. doi:10.51257/a-v1-j2300.

24. Franca C.C.V.; Ueno, H.M. Green Cosmetics: Perspectives and Challenges in the Context of Green Chemistry. Desenvolv. *Meio Ambiente*. **2020**, 53. doi:10.5380/dma.v53i0.62322.

25. Dini, I.; Laneri, S. The New Challenge of Green Cosmetics: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. *Molecules*. **2021**, 26, 3921. doi:10.3390/molecules26133921.

26. Conservatoire du patrimoine Mémento du patrimoine naturel, Territoire de Cambéry. **2007**, 1–68.

27. Le Département de la Savoie/DGAA/DEP. Fiche technique : L'Ambroisie, La reconnaître. **2018**.

28. Le Département de la Savoie. Fiche technique : La Renouée, La reconnaître.

29. Conseil Départemental de la Savoie. Fiche technique : Les Solidages. **2021**.

30. Beerling, D.J.; Bailey, J.P.; Conolly, A.P. *Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decraene. *J. Ecol*. **1994**, 82, 959. doi:10.2307/2261459.

31. Weber, E. Current and Potential Ranges of Three Exotic Goldenrods (*Solidago*) in Europe. *Conserv. Biol*. **2001**, 15, 7.

32. Zhou, Z.-S.; Chen, H.-S.; Zheng, X.-W.; Guo, J.-Y.; Guo, W.; Li, M.; Luo, M.; Wan, F.-H. Control of the Invasive Weed *Ambrosia Artemisiifolia* with *Ophraella Communa* and *Epiblema Strenuana*. *Biocontrol Sci. Technol*. **2014**, 24, 950–964. doi:10.1080/09583157.2014.897305.

33. Dupre, P.-O. Ambroisie : un combat à mener dans la vallée du Rhône. *Sciences pharmaceutiques*. **2002**.

34. Díaz, S.; Settele, J.; Brondízio, E.; Ngo, H.T.; Guèze, M.; Agard, J.; Arneth, A.; Balvanera, P.; Brauman, K.; Watson, R.T.; *et al*. Résumé à l'intention des décideurs du rapport sur l'évaluation mondiale de la biodiversité et des services écosystémiques de la Plateforme intergouvernementale scientifique et politique sur la biodiversité et les services écosystémiques. *IPBES*, **2019**, 1-53.

35. Chiocchio, I.; Mandrone, M.; Tomasi, P.; Marincich, L.; Poli, F. Plant Secondary Metabolites: An Opportunity for Circular Economy. *Molecules*. **2021**, 26, 495. doi:10.3390/molecules26020495.

36. Schéma des Espaces Naturels Sensibles de Haute-Savoie 2016-2022. Environnement et Développement Durable. Département de Haute-Savoie. **2022**.

37. Le Baromètre de la Nature. Pays de Savoie. Asters Conservatoire d'Espaces naturels Haute-Savoie et Conservatoire d'Espaces Naturels Savoie. **2019**, 1-16.

38. Debay, P.; Legland, T.; Pache, G.; Merhan, B. Bilan de la problématique végétale invasive en Rhône-Alpes. **2020**. 1-45.

39. Fried, G. Prioritization of Potential Invasive Alien Plants in France. *Conference Paper*. **2010**, 1-23.

40. Schmiedel, D.; Wilhelm, E.-G.; Roth, M.; Scheibner, C.; Nehring, S.; Winter, S. Evaluation System for Management Measures of Invasive Alien Species. *Biodivers. Conserv*. **2016**, 25, 357–374. doi:10.1007/s10531-016-1054-5.

41. Boyer, M. Une nouvelle technique d'éradication mécanique des renouées du Japon testée avec succès au bord de l'Ain et de l'Isère. *Ingénieries n°57-58*. **2009**, 17-31.

42. Ganie, Z.A.; Jhala, A.J. Glyphosate-Resistant Common Ragweed (*Ambrosia Artemisiifolia*) in Nebraska: Confirmation and Response to Postemergence Corn and Soybean Herbicides. *Weed Technol*. **2017**, 31, 225–237. doi:10.1017/wet.2016.26.

43. Tamura, Y.; Hattori, M.; Konno, K.; Kono, Y.; Honda, H.; Ono, H.; Yoshida, M. Triterpenoid and Caffeic Acid Derivatives in the Leaves of Ragweed, *Ambrosia Artemisiifolia* L. (*Asterales*: *Asteraceae*), as Feeding Stimulants of *Ophraella Communa* LeSage (*Coleoptera*: *Chrysomelidae*). *Chemoecology*. **2004**, 14, 113–118. doi:10.1007/s00049-004-0269-1.

44. Bilon, R; Chauvel, B., Mottet, M. Pollen et semences, La Lettre de l'Observatoire des Ambroisies n°40, octobre. **2016**.

45. Goudard, A. Fonctionnement des écosystèmes et invasions biologiques : importance de la biodiversité et des interactions interspécifiques. *Ecologie, Environnement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI*. **2007**, 1-217.

46. Fan, P.; Marston, A. How Can Phytochemists Benefit from Invasive Plants? *Nat. Prod. Commun*. **2009**, 4, 1934578X0900401, doi:10.1177/1934578X0900401018.

47. Boismal, F.; Serror, K.; Dobos, G.; Zuelgaray, E.; Bensussan, A.; Michel, L. Vieillissement cutané. Physiopathologie et thérapies innovantes. médecine/sciences. *EDP Sci*. **2020**, 36, 12, 1163-1172. doi :10.1051/medsci/2020232.

48. Piccerelle, P. Le vieillissement cutané : prévention et réparation. *Chimie, dermo-cosmétique et beauté*. **2022**, 1-20.

49. Goetz, A. Le Microbiote Cutané. *Université du Québec à Chicoutimi*. **2016**, 1-34.

50. Edwards, C.; Marks, R. Evaluation of Biomechanical Properties of Human Skin. *Clin. Dermatol*. **1995**, 13, 375–380. doi:10.1016/0738-081X(95)00078-T.

51. Arda, O.; Göksügür, N.; Tüzün, Y. Basic Histological Structure and Functions of Facial Skin. *Clin. Dermatol*. **2014**, 32, 3–13. doi:10.1016/j.clindermatol.2013.05.021.

52. Bliss, D. Skin and Its Layers. File:Anatomy The Skin - NCI Visuals Online.jpg. **2021**.

53. Riviere, J.E. Dermal Absorption Models in Toxicology and Pharmacology. *Ed. Taylor & Francis: Boca Raton*. **2005**; ISBN 978-0-415-70036-8.

54. Verdier-Sévrain, S.; Bonté, F. Skin Hydration: A Review on Its Molecular Mechanisms. *J. Cosmet. Dermatol*. **2007**, 6, 75–82. doi:10.1111/j.1473-2165.2007.00300.x.

55. Weis, J.; Ericsson, A.; Åström, G.; Szomolanyi, P.; Hemmingsson, A. High-Resolution Spectroscopic Imaging of the Human Skin. *J. Magn. Reson. Imaging*. **2001**, 19, 275–278. doi:10.1016/S0730-725X(01)00290-9.

56. Hashizume, H. Skin Aging and Dry Skin. *J. Dermatol*. **2004**, 31, 603–609. doi:10.1111/j.1346-8138.2004.tb00565.x.

57. Kamiński, K.; Kazimierczak, U.; Kolenda, T. Oxidative Stress in Melanogenesis and Melanoma Development. *Contemp. Oncol. (Pozn)*. **2022**, 26, 1–7. doi:10.5114/wo.2021.112447.

58. Fayad, S.; Morin, P.; Nehmé, R. Use of Chromatographic and Electrophoretic Tools for Assaying Elastase, Collagenase, Hyaluronidase, and Tyrosinase Activity. *J. Chromatogr. A*. **2017**, 1529, 1–28. doi:10.1016/j.chroma.2017.11.003.

59. Birari, R.B.; Bhutani, K.K. Pancreatic Lipase Inhibitors from Natural Sources: Unexplored Potential. *Drug Discov. Today*. **2007**, 12, 19-20, 879–889, doi:10.1016/j.drudis.2007.07.024.

60. Raynal-Ljutovac, K.; Bouvier, J.; Gayet, C.; Simon, N.; Joffre, F.; Fine, F.; Vendeuvre, J.-L.; Lopez, C.; Chardigny, J.-M.; Michalski, M.-C.; *et al*. Organisation structurale et moléculaire des lipides dans les aliments : impacts possibles sur leur digestion et leur assimilation par l'Homme. *Oilseeds fats Crops Lipids*. **2011**, 18, 324–351. doi:10.1051/ocl.2011.0415.

61. Alabdulkarim, B.; Bakeet, Z.A.N.; Arzoo, S. Role of Some Functional Lipids in Preventing Diseases and Promoting Health. *J. King Saud Univ. Sci*. **2012**, 24, 319–329. doi:10.1016/j.jksus.2012.03.001.

62. Furukawa, S.; Fujita, T.; Shimabukuro, M.; Iwaki, M.; Yamada, Y.; Nakajima, Y.; Nakayama, O.; Makishima, M.; Matsuda, M.; Shimomura, I. Increased Oxidative Stress in Obesity and Its Impact on Metabolic Syndrome. *J. Clin. Invest*. **2004**, 114, 1752–1761. doi:10.1172/JCI21625.

63. Liu, T.-T.; Liu, X.-T.; Chen, Q.-X.; Shi, Y. Lipase Inhibitors for Obesity: A Review. *Biomed. Pharmacother*. **2020**, 128, 110314. doi:10.1016/j.biopha.2020.110314.

64. Mauro, M.; Taylor, V.; Wharton, S.; Sharma, A.M. Barriers to Obesity Treatment. *Eur. J. Intern. Med*. **2008**, 19, 173–180. doi:10.1016/j.ejim.2007.09.011.

65. Salomon, J. Priorité Prévention Rester en bonne santé tout au long de sa vie. Direction générale de la santé et Haut conseil de la santé publique. **2021**, 1–43.

66. Filou, V.; Richou, M.; Bughin, F.; Fédou, C.; de Mauverger, E.; Mercier, J.; Brun, J.-F. Complémentarité de la chirurgie bariatrique et de l'activité physique. *Sci. Sports*. **2018**, 33, 65–72. doi:10.1016/j.scispo.2017.10.002.

67. Milling, L.S.; Gover, M.C.; Moriarty, C.L. The Effectiveness of Hypnosis as an Intervention for Obesity: A Meta-Analytic Review. *Psychol. Conscious. Theory Res. Practice*. **2018**, 5, 1, 29–45. doi:10.1037/cns0000139.

68. Cerdó, T.; García-Santos, J.; G. Bermúdez, M.; Campoy, C. The Role of Probiotics and Prebiotics in the Prevention and Treatment of Obesity. *Nutrients*. **2019**, 11, 635. doi:10.3390/nu11030635.

69. Williams, D.M.; Nawaz, A.; Evans, M. Drug Therapy in Obesity: A Review of Current and Emerging Treatments. *Diabetes Ther*. **2020**, 11, 1199–1216. doi:10.1007/s13300-020-00816-y.

70. Seyedan, A.; Alshawsh, M.A.; Alshagga, M.A.; Koosha, S.; Mohamed, Z. Medicinal Plants and Their Inhibitory Activities against Pancreatic Lipase: A Review. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med*. **2015**, 1–13. doi:10.1155/2015/973143.

71. Aigueperse, L. Plantes à l'officine: soyons phytovigilants! *Sciences pharmaceutiques*. **2014**.

72. Wadden, T.A.; Bray, G.A. *Handbook of Obesity Treatment* (2nd ed.). Guilford Publications. **2018**.

73. Nimse, S.B.; Pal, D. Free Radicals, Natural Antioxidants, and Their Reaction Mechanisms. *RSC Adv*. **2015**, 5, 27986–28006. doi:10.1039/C4RA13315C.

74. Surai, K.P.; Surai, P.F.; Speake, B.K.; Sparks, N.H.C. Antioxidant-Prooxidant Balance in the Intestine. Food for Thought 1. Prooxidants. *Nutr. Genomics Funct. Foods*. **2003**, 1, 1, 51–70.

75. Matsuda, M.; Shimomura, I. Increased Oxidative Stress in Obesity: Implications for Metabolic Syndrome, Diabetes, Hypertension, Dyslipidemia, Atherosclerosis, and Cancer. *Obes. Res. Clin. Pract*. **2013**, 7, e330–e341. doi:10.1016/j.orcp.2013.05.004.

76. López-Alarcón, C.; Denicola, A. Evaluating the Antioxidant Capacity of Natural Products: A Review on Chemical and Cellular-Based Assays. *Anal. Chim. Acta*. **2013**, 763, 1–10. doi:10.1016/j.aca.2012.11.051.

77. Chedea, V.S.; Vicaş, S.I.; Sticozzi, C.; Pessina, F.; Frosini, M.; Maioli, E.; Valacchi, G. Resveratrol: From Diet to Topical Usage. *Food Funct*. **2017**, 8, 3879–3892. doi:10.1039/C7FO01086A.

78. Vargas, F.; Díaz, Y.; Carbonell, K. Antioxidant and Scavenging Activity of Emodin, *Aloe*-Emodin, and Rhein on Free-Radical and Reactive Oxygen Species. *Pharm. Biol*. **2004**, 42, 342–348. doi:10.1080/13880200490519613.

79. Lachowicz, S. UPLC-PDA-Q/TOF-MS Identification of Bioactive Compounds and on-Line UPLC-ABTS Assay in *Fallopia Japonica* Houtt and *Fallopia Sachalinensis* (F. Schmidt) Leaves and Rhizomes Grown in Poland. *Eur. Food Res. Technol*. **2019**, 245, 691–706. doi.org/10.1007/s00217-018-3191-4.

80. Emad, S. Antioxidants; IntechOpen Book Series. *Physiology*, **2019**; 5. ISBN 978-1-78923-919-5.

81. Sen Raychaudhuri, S.; Deng, X.W. The Role of Superoxide Dismutase in Combating Oxidative Stress in Higher Plants. *Bot. Rev*. **2000**, 66, 89–98. doi:10.1007/BF02857783.

82. Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Schaich, K.M.; Özyürek, M.; Güçlü, K. Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/Activity (IUPAC Technical Report). *Pure App. Chem*. **2013**, 85, 957–998. doi:10.1351/PAC-REP-12-07-15.

83. Cyphert, J.M.; Trempus, C.S.; Garantziotis, S. Size Matters: Molecular Weight Specificity of Hyaluronan Effects in Cell Biology. *Int. J. Cell Biol*. **2015**, 2015, 1–8. doi:10.1155/2015/563818.

84. Manuskiatti, W.; Maibach, H.I. Hyaluronic Acid and Skin: Wound Healing and Aging. *Int. J. Dermatol*. **1996**, 35, 539–544. doi:10.1111/j.1365-4362.1996.tb03650.x.

85. Girish, K.; Kemparaju, K.; Nagaraju, S.; Vishwanath, B. Hyaluronidase Inhibitors: A Biological and Therapeutic Perspective. *CMC*. **2009**, 16, 2261–2288. doi:10.2174/092986709788453078.

86. Luo, H.;Wang, J.; Zhou, Y.; Zou, K. Molecular Docking Study of Chlorogenic Acid as a Hyaluronidase Inhibitor. In Proceedings of the 2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Chengdu, China, 18–20 June 2010; IEEE: Piscataway, NJ, USA, 2010; pp. 1–4.

87. Fayad, S.; Nehmé, R.; Langmajerová, M.; Ayela, B.; Colas, C.; Maunit, B.; Jacquinet, J.-C.; Vibert, A.; Lopin-Bon, C.; Zdenˇek, G.; *et al*. Hyaluronidase Reaction Kinetics Evaluated by Capillary Electrophoresis with UV and High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS) Detection. *Anal. Chim. Acta*. **2017**, 951, 140–150. doi:10.1016/j.aca.2016.11.036.

88. Jacob, M.P.; Sauvage, M.; Osborne-Pellegrin, M. Régulation de la synthèse de l'élastine. *J. Soc. Biol*. **2001**, 195, 131–141. doi:10.1051/jbio/2001195020131.

89. Jakimiuk, K.; Gesek, J.; Atanasov, A.G.; Tomczyk, M. Flavonoids as Inhibitors of Human Neutrophil Elastase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*. **2021**, 36, 1016–1028. doi:10.1080/14756366.2021.1927006.

90. Kim, J.H.; Byun, J.C.; Bandi, A.K.R.; Hyun, C.-G.; Ho, N. Compounds with Elastase Inhibition and Free Radical Scavenging Activities from *Callistemon Lanceolatus*. *J. Med. Plants Res*. **2009**, 3, 11, 914-920. ISSN 1996-0875.

91. Tanaka, T.; Metori, K.; Mineo, S.; Matsumoto, H.; Satoh, T. Studies on Collagenase Inhibitors. II. Inhibitory Effets of Anthraquinones on Bacterial Collagenase. *Yakugaku Zasshi J. Pharm. Soc. Jpn*. **1990**, 110, 688–692. doi.org/10.1248/yakushi1947.110.9_688.

92. Angelis, A.; Hubert, J.; Aligiannis, N.; Michalea, R.; Abedini, A.; Nuzillard, J.-M.; Gangloff, S.; Skaltsounis, A.-L.; Renault, J.-H. Bio-Guided Isolation of Methanol-Soluble Metabolites of Common Spruce (*Picea abies*) Bark by-Products and Investigation of Their Dermo-Cosmetic Properties. *Molecules*. **2016**, 21, 1586. doi:10.3390/molecules21111586.

93. Axiotis, E.; Angelis, A.; Antoniadi, L.; Petrakis, E.A.; Skaltsounis, L.A. Phytochemical Analysis and Dermo-Cosmetic Evaluation of *Cymbidium* Sp. (*Orchidaceae*) Cultivation By-Products. *Antioxidants*. **2021**, 11, 101. doi:10.3390/antiox11010101.

94. Munoz-Munoz, J.L.; García-Molina, F.; Varón, R.; Tudela, J.; García-Cánovas, F.; Rodríguez-López, J.N. Generation of Hydrogen Peroxide in the Melanin Biosynthesis Pathway. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteom*. **2009**, 1794, 1017–1029. doi:10.1016/j.bbapap.2009.04.002.

95. Zolghadri, S.; Bahrami, A.; Hassan Khan, M.T.; Munoz-Munoz, J.; Garcia-Molina, F.; Garcia-Canovas, F.; Saboury, A.A. A Comprehensive Review on Tyrosinase Inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem*. **2019**, 34, 279–309. doi:10.1080/14756366.2018.1545767.

96. Bronze-Uhle, E.S.; Paulin, J.V.; Piacenti-Silva, M.; Battocchio, C.; Rocco, M.L.M.; *et al*. Melanin Synthesis under Oxygen Pressure: Melanin Synthesis under Oxygen Pressure. *Polym. Int*. 2016, 65, 1339–1346, doi:10.1002/pi.5185.

97. Liu-Smith, F.; Meyskens, F.L. Molecular Mechanisms of Flavonoids in Melanin Synthesis and the Potential for the Prevention and Treatment of Melanoma. *Mol. Nutr. Food Res*. **2016**, 60, 1264–1274. doi:10.1002/mnfr.201500822.

98. Rescigno, A.; Sollai, F.; Pisu, B.; Rinaldi, A.; Sanjust, E. Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*. **2002**, 17, 207–218. doi:10.1080/14756360210000010923.

99. Wu, X.; Hammer, J.A. Melanosome Transfer: It Is Best to Give and Receive. *Curr. Opin. Cell Biol*. **2014**, 29, 1–7. doi:10.1016/j.ceb.2014.02.003.

100. Chang, T.-S. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci*. **2009**, 10, 2440–2475. doi:10.3390/ijms10062440.

101. Al Hamoui Dit Banni, G., & Nehmé, R. Capillary electrophoresis for enzyme - based studies: Applications to lipases and kinases. *J. Chromatogr. A.* **2021**, 1661, 462687. doi:10.1016/j.chroma.2021.462687.

102. Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D. Lipases and Their Industrial Applications: An Overview. *Appl. Biochem. Biotech*. **2004**, 118, 155–170. doi:10.1385/ABAB:118:1-3:155.

103. Birari, R.B.; Bhutani, K.K. Pancreatic Lipase Inhibitors from Natural Sources: Unexplored Potential. *Drug Discov. Today*. **2007**, 12, 879–889. doi:10.1016/j.drudis.2007.07.024.

104. Lunagariya, N.A.; Patel, N.K.; Jagtap, S.C.; Bhutani, K.K. Inhibitors of Pancreatic Lipase: State of the Art and Clinical Perspectives. *Ecvli J*. **2014**, 25.

105. Tagliaro, F.; Manetto, G.; Crivellente, F.; Smith, F.P. A Brief Introduction to Capillary Electrophoresis. *Forensic Sci. Int*. **1998**, 92, 75–88. doi:10.1016/S0379-0738(98)00010-3.

106. Dewanjee, S.; Gangopadhyay, M.; Bhattacharya, N.; Khanra, R.; Dua, T.K. Bioautography and Its Scope in the Field of Natural Product Chemistry. *J. Pharm. Anal*. **2015**, 5, 75–84. doi:10.1016/j.jpha.2014.06.002.

107. Choma, I.M.; Grzelak, E.M. Bioautography Detection in Thin-Layer Chromatography. *J. Chromatogr. A*. **2011**, 1218, 2684–2691. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.069.

108. Bräm, S.; Wolfram, E. Recent Advances in Effect-Directed Enzyme Assays Based on Thin-Layer Chromatography: Recent Advances in Effect-Directed Enzyme Assays Based on TLC. *Phytochem. Anal*. **2017**, 28, 74–86. doi:10.1002/pca.2669.

109. Agatonovic-Kustrin, S.; Morton, D.W. HPTLC – Bioautographic Methods for Selective Detection of the Antioxidant and a-Amylase Inhibitory Activity in Plant Extracts. *MethodsX*. **2018**, 5, 797–802. doi:10.1016/j.mex.2018.07.013.

110. Legerská, B.; Chmelová, D.; Ondrejovi˘c, M.; Miertuš, S. The TLC-Bioautography as a Tool for Rapid Enzyme Inhibitors Detection—A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem*. **2020**, 52, 275–293. doi:10.1080/10408347.2020.1797467.

111. The Angiosperm Phylogeny Group An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc*. **2016**, 181, 1–20. doi:10.1111/boj.12385.

112. Narasimhulu, G.; Reddy, K.K.; Mohamed, J. The Genus *Polygonum* (*Polygonaceae*): an Ethnopharmacological and Phytochemical Perspectives –Review. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*. **2014**, 6, 2, 21-45. ISSN- 0975-1491.

113. Carlquist, S. Wood Anatomy of *Polygonaceae*: Analysis of a Family with Exceptional Wood Diversity. *Bot. J. Linn. Soc*. **2003**, 141, 25–51. doi:10.1046/j.1095-8339.2003.00100.x.

114. Anderberg, A.A.; Baldwin, B.G.; Bayer, R.G.; *et al*. *Compositae*: *Compositae* Adans., Fam. Pl. 2: 103 (1763). *Asteraceae* Martynov. *Springer Berlin Heidelberg*. **2007**, 61–588. ISBN 978-3-540-31050-1.

115. Piola, F.; Bellvert, F.; Meiffren, G.; Rouifed, S.; Walker, V.; Comte, G.; Bertrand, C. Invasive *Fallopia × Bohemica* Interspecific Hybrids Display Different Patterns in Secondary Metabolites. *Écoscience*. **2013**, 20, 230–239. doi:10.2980/20-3-3597.

116. Gammon, M.A.; Grimsby, J.L.; Tsirelson, D.; Kesseli, R. Molecular and Morphological Evidence Reveals Introgression in Swarms of the Invasive Taxa *Fallopia Japonica* , *F. Sachalinensis* , and *F. × Bohemica* (*Polygonaceae*) in the United States. *Am. J. Bot*. **2007**, 94, 948–956. doi:10.3732/ajb.94.6.948.

117. Martin, M.D.; Quiroz-Claros, E.; Brush, G.S.; Zimmer, E.A. Herbarium Collection-Based Phylogenetics of the Ragweeds (*Ambrosia*, *Asteraceae*). *Mol. Phylogenet. Evol*. **2018**, 120, 335–341. doi:10.1016/j.ympev.2017.12.023.

118. Beres, I; Kazinczi, G; Narwal, S. Allelopathic Plants. 4. Common ragweed (*Ambrosia elatior L. Syn A. artemisiifolia*). *Allelopathy J*. **2002**, 9, 1, 27-34.

119. Skrzypczak, L.; WEso-towsKA, M.; BunziANOWSKI, J. XXIII *Solidago* L. Species (Goldenrod): *In Vitro* Regeneration and Biologically Active Secondary Metabolites. *Biotechnol. Agric. For*. 1962, 43.

120. Semple, J.C. An Intuitive Phylogeny and Summary of Chromosome Number Variation in the Goldenrod Genus *Solidago* (*Asteraceae*: *Astereae*). *Phytoneuron*. **2016**, 32, 1–9. ISSN 2153 733X.

121. Radušienė, J.; Karpavičienė, B.; Vilkickytė, G.; Marksa, M.; Raudonė, L. Comparative Analysis of Root Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Five Native and Invasive *Solidago L*. Species. *Plants*. **2024**, 13, 132. doi:10.3390/plants13010132.

122. Constancias, A. La renouée du Japon : *Polygonum Cuspidatum* Sieb. et Zucc. (*Polygonaceae*). *Sciences pharmaceutiques*. **2008**, 1-124.

123. Thiébaut, M.; Nicolas, S.; Piola, F. "The Fad for Polygonum Will Fade Away!": Historic Aspects of the Propagation and Success in France of the *Reynoutria* Complex Based on Archives. *Bot. Lett*. **2020**, 167, 301–314. doi:10.1080/23818107.2020.1750478.

124. Rouifed, S.; Piola, F.; Spiegelberger, T. Invasion by *Fallopia Spp*. in a French Upland Region Is Related to Anthropogenic Disturbances. *Basic Appl. Ecol*. **2014**, 15, 435–443. doi:10.1016/j.baae.2014.07.005.

125. Navratil, O.; Brekenfeld, N.; Puijalon, S.; Sabastia, M.; Boyer, M.; Pella, H.; Lejot, J.; Piola, F. Distribution of Asian Knotweeds on the Rhône River Basin, France: A Multi-Scale Model of Invasibility That Combines Biophysical and Anthropogenic Factors. *Sci. Total Environ*. **2021**, 763, 142995. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142995.

126. Nouvel-Oeil, F. Les Rivières. Available online: https://www.riviere-arly.com/les-rivieres/ (accessed on 2 March 2022).

127. Luque, G.M.; Bellard, C.; Bertelsmeier, C.; Bonnaud, E.; Genovesi, P.; Simberloff, D.; Courchamp, F. The 100th of the World's Worst Invasive Alien Species. *Biol. Invasions*. **2014**, 16, 981–985. doi:10.1007/s10530-013-0561-5.

128. Dusz, M.-A.; Martin, F.-M.; Dommanget, F.; Petit, A.; Dechaume-Moncharmont, C.; Evette, A. Review of Existing Knowledge and Practices of Tarping for the Control of Invasive Knotweeds. *Plants*. **2021**, 10, 2152. doi:10.3390/plants10102152.

129. Barberis, L. Rôles des endophytes fongiques racinaires dans la tolérance de *Fallopia* aux éléments Traces Métalliques. *Biologie végétale*. Université de Lyon. 2020.

130. Stefanowicz, A.M.; Stanek, M.; Nobis, M.; Zubek, S. Few Effects of Invasive Plants *Reynoutria Japonica*, *Rudbeckia Laciniata* and *Solidago Gigantea* on Soil Physical and Chemical Properties. *Sci. Total Environ*. **2017**, 574, 938–946. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.09.120.

131. Stefanowicz, A.M.; Banaś, A.; Stanek, M.; Woch, M.W.; Zubek, S. Large Differences in Biomass Quantity and Quality between Invasive *Reynoutria Japonica* and Resident Vegetation Are Not Reflected in Topsoil Physicochemical Properties. *Geoderma*. **2020**, 368, 114307. doi:10.1016/j.geoderma.2020.114307.

132. Conseil Départemental de la Savoie. Fiche technique : La Renouée du Japon. **2021**.

133. Peng,W.; Qin, R.; Li, X.; Zhou, H. Botany, Phytochemistry, Pharmacology, and Potential Application of *Polygonum Cuspidatum* Sieb.et Zucc.: A Review. *J. Ethnopharmacol*. **2013**, 148, 729–745. doi:10.1016/j.jep.2013.05.007.

134. Cucu, A.-A.; Baci, G.-M.; Dezsi, ¸S.; Nap, M.-E.; Beteg, F.I.; Bonta, V.; Bobi¸s, O.; Caprio, E.; Dezmirean, D.S. New Approaches on Japanese Knotweed (*Fallopia Japonica*) Bioactive Compounds and Their Potential of Pharmacological and Beekeeping Activities: Challenges and Future Directions. *Plants*. **2021**, 10, 2621. doi:10.3390/plants10122621.

135. Fennell, M.; Wade, M.; Bacon, K.L. Japanese Knotweed (*Fallopia Japonica*): An Analysis of Capacity to Cause Structural Damage (Compared to Other Plants) and Typical Rhizome Extension. *PeerJ*. **2018**, 6, e5246. doi:10.7717/peerj.5246.

136. Wang, Z.; Xie, P. *Monographs for Quality Evaluation of Chinese Crude Drugs*; World Scientific: Singapore, 2015.

137. Pogacnik, L; Poklar Ulrich, N. Invasive Knotweed Species as a Rich Source of Antioxidants. *J. Eco. Agri. Tourism*. **2018**, 14, 1, 1-6. ISSN: 1844-8577.

138. Liu, S.; Zhang, R.; Zhang, X.; Zhu, S.; Liu, S.; Yang, J.; Li, Z.; Gao, T.; Liu, F.; Hu, H. The Invasive Species *Reynoutria Japonica* Houtt. as a Promising Natural Agent for Cardiovascular and Digestive System Illness. *Front. Pharmacol*. **2022**, 13, 863707. doi:10.3389/fphar.2022.863707.

139. Chen, B.-Y.; Kuo, C.-H.; Liu, Y.-C.; Ye, L.-Y.; Chen, J.-H.; Shieh, C.-J. Ultrasonic-Assisted Extraction of the Botanical Dietary Supplement Resveratrol and Other Constituents of *Polygonum cuspidatum*. *J. Nat. Prod*. **2012**, 75, 1810–1813. doi:10.1021/np300392n.

140. Hromádková, Z.; Hirsch, J.; Ebringerová, A. Chemical Evaluation of *Fallopia* Species Leaves and Antioxidant Properties of Their Non-Cellulosic Polysaccharides. *Chem. Pap*. **2010**, 64. doi:10.2478/s11696-010-0054-2.

141. Kim, T.H; Hee, C.H; *et al*. Studies on the Constituents of *Polygonum* sp. *Kor. J. Pharmacog*. **1978**, 9, 2, 89-91.

142. Guo, C.; Bai, M.; Miao, M.; Miao, Y. Analysis of the Chemical, Pharmacological and Clinical Applications of *Polygonum Cuspidatum*. IOP Conf. Ser.: *Mater. Sci. Eng*. **2018**, 301, 012062. doi:10.1088/1757-899X/301/1/012062.

143. Pogačnik, L.; Bergant, T.; Skrt, M.; Poklar Ulrih, N.; Viktorová, J.; Ruml, T. *In Vitro* Comparison of the Bioactivities of Japanese and Bohemian Knotweed Ethanol Extracts. *Foods*. **2020**, 9, 544., doi:10.3390/foods9050544.

144. Kim, Y.-S.; Hwang, C.-S.; Shin, D.-H. Volatile Constituents from the Leaves of *Polygonum Cuspidatum* S. et Z. and Their Anti-Bacterial Activities. *Food Microbiol*. **2005**, 22, 139–144. doi:10.1016/j.fm.2004.01.016.

145. Metličar, V.; Vovk, I.; Albreht, A. Japanese and Bohemian Knotweeds as Sustainable Sources of Carotenoids. *Plants*. **2019**, 8, 384. doi:10.3390/plants8100384.

146. Bensa, M.; Glavnik, V.; Vovk, I. Leaves of Invasive Plants—Japanese, Bohemian and Giant Knotweed—The Promising New Source of Flavan-3-Ols and Proanthocyanidins. *Plants*. **2020**, 9, 118, doi:10.3390/plants9010118.

147. Bensa, M.; Glavnik, V.; Vovk, I. Flavan-3-ols and Proanthocyanidins in Japanese, Bohemian and Giant Knotweed. *Plants*. **2021**, 10, 402. doi:10.3390/plants10020402.

148. Zhang, H.; Li, C.; Kwok, S.-T.; Zhang, Q.-W.; Chan, S.-W. A Review of the Pharmacological Effects of the Dried Root of *Polygonum Cuspidatum* (Hu Zhang) and Its Constituents. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med*. **2013**, 2013, 1–13. doi:10.1155/2013/208349.

149. Patočka, J.; Navrátilová, Z.; Ovando, M. Biologically Active Compounds of Knotweed (*Reynoutria* spp.). *Mil. Med. Sci. Lett*. **2017**, 86, 1, 17–31. doi:10.31482/mmsl.2017.004.

150. Song, J.-H.; Kim, S.-K.; Chang, K.-W.; Han, S.-K.; Yi, H.-K.; Jeon, J.-G. *In Vitro* Inhibitory Effects of *Polygonum Cuspidatum* on Bacterial Viability and Virulence Factors of *Streptococcus Mutans* and *Streptococcus Sobrinus*. *Arch. Oral Biol*. **2006**, 51, 1131–1140. doi:10.1016/j.archoralbio.2006.06.011.

151. Shan, B.; Cai, Y.-Z.; Brooks, J.D.; Corke, H. Antibacterial Properties of *Polygonum Cuspidatum* Roots and Their Major Bioactive Constituents. *Food Chem*. **2008**, 109, 530–537. doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.064.

152. Li, L.; Song, X.; Yin, Z.; Jia, R.; Li, Z.; Zhou, X.; Zou, Y.; Li, L.; Yin, L.; Yue, G.; *et al*. The Antibacterial Activity and Action Mechanism of Emodin from *Polygonum Cuspidatum* against *Haemophilus Parasuis in Vitro*. *Microbiol. Res*. **2016**, 186–187, 139–145. doi:10.1016/j.micres.2016.03.008.

153. Ban, S.-H.; Kwon, Y.-R.; Pandit, S.; Lee, Y.-S.; Yi, H.-K.; Jeon, J.-G. Effects of a Bio-Assay Guided Fraction from *Polygonum Cuspidatum* Root on the Viability, Acid Production and Glucosyltranferase of *Mutans Streptococci*. *Fitoterapia*. **2010**, 81, 30–34. doi:10.1016/j.fitote.2009.06.019.

154. Nawrot-Hadzik, I.; Hadzik, J.; Fleischer, M.; Choromańska, A.; Sterczała, B.; Kubasiewicz-Ross, P.; Saczko, J.; Gałczyńska-Rusin, M.; Gedrange, T.; Matkowski, A. Chemical Composition of East Asian Invasive Knotweeds, Their Cytotoxicity and Antimicrobial Efficacy Against Cariogenic Pathogens:An *In-Vitro* Study. *Med. Sci. Monit*. **2019**, 25, 3279–3287. doi:10.12659/MSM.913855.

155. Anžlovar, S.; Janeš, D.; Dolenc Koce, J. The Effect of Extracts and Essential Oil from Invasive *Solidago* Spp. and *Fallopia Japonica* on Crop-Borne Fungi and Wheat Germination. *Food Technol. Biotechnol*. **2020**, 58, 273–283. doi:10.17113/ftb.58.03.20.6635.

156. Wang, L.; Qiu, P.; Long, X.-F.; Zhang, S.; Zeng, Z.-G.; Tian, Y.-Q. Comparative Analysis of Chemical Constituents, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Ethylacetate Extracts of *Polygonum Cuspidatum* and Its Endophytic Actinomycete, *Streptomyces* Sp. A0916. *Chin. J. Nat. Med*. **2016**, 14, 117–123. doi:10.1016/S1875-5364(16)60004-3.

157. Dołowacka-Jó´zwiak, A.; Matkowski, A.; Nawrot-Hadzik, I. Antiglycoxidative Properties of Extracts and Fractions from *Reynoutria* Rhizomes. *Nutrients*. **2021**, 13, 4066. doi:10.3390/nu13114066.

158. Bozin, B.; Gavrilovic, M.; Kladar, N.; Rat, M.; Anackov, G.; Gavaric, N. Highly Invasive Alien Plant *Reynoutria japonica* Houtt. Represents a Novel Source for Pharmaceutical Industry—Evidence from Phenolic Profile and Biological Activity. *J. Serb. Chem. Soc*. **2017**, 82, 803–813. doi:10.2298/JSC170306054G.

159. Pan, Y.; Zhang, X.; Wang, H.; Liang, Y.; Zhu, J.; Li, H.; Zhang, Z.; Wu, Q. Antioxidant Potential of Ethanolic Extract of *Polygonum Cuspidatum* and Application in Peanut Oil. *Food Chem*. **2007**, 105, 1518–1524. doi:10.1016/j.foodchem.2007.05.039.

160. Nawrot-Hadzik, I.; Slusarczyk, S.; Granica, S.; Hadzik, J.; Matkowski, A. Phytochemical Diversity in Rhizomes of Three *Reynoutria* Species and Their Antioxidant Activity Correlations Elucidated by LC-ESI-MS/MS Analysis. *Molecules*. **2019**, 24, 1136. doi:10.3390/molecules24061136.

161. Hsu, C.-Y.; Chan, Y.-P.; Chang, J. Antioxidant Activity of Extract from *Polygonum cuspidatum*. *Biol. Res*. **2007**, 40, 13–21. doi:10.4067/S0716-97602007000100002.

162. Ardelean, F.; Moaca, E.A.; Pacurariu, C.; Antal, D.S.; Toma, C.-C.; Dragan, S. Invasive *Polygonum cuspidatum*: Physico-chemical Analysis of Plant Extract with Pharmaceutical Potential. *Ser. Stiintele Vietii*. **2016**, 26, 7.

163. Pogačnik, L.; Rogelj, A.; Ulrih, N.P. Chemiluminescence Method for Evaluation of Antioxidant Capacities of Different Invasive Knotweed Species. *Anal. Lett*. **2016**, 49, 350–363. doi:10.1080/00032719.2014.979361.

164. Lachowicz, S.; Oszmia´ nski, J. Profile of Bioactive Compounds in the Morphological Parts of Wild *Fallopia Japonica* (Houtt) and *Fallopia Sachalinensis* (F. Schmidt) and Their Antioxidative Activity. *Molecules*. **2019**, 24, 1436. doi:10.3390/molecules24071436.

165. Lee, M.-H.; Kao, L.; Lin, C.-C. Comparison of the Antioxidant and Transmembrane Permeative Activities of the Different *Polygonum Cuspidatum* Extracts in Phospholipid-Based Microemulsions. *J. Agric. Food Chem*. **2011**, 59, 9135–9141. doi:10.1021/jf201577f.

166. Bralley, E.E.; Greenspan, P.; Hargrove, J.L.; Wicker, L.; Hartle, D.K. Topical Anti-Inflammatory Activity of *Polygonum Cuspidatum* Extract in the TPA Model of Mouse Ear Inflammation. *J. Inflamm*. **2008**, 5, 1. doi:10.1186/1476-9255-5-1.

167. Ghanim, H.; Sia, C.L.; Abuaysheh, S.; Korzeniewski, K.; Patnaik, P.; Marumganti, A.; Chaudhuri, A.; Dandona, P. An Anti-inflammatory and Reactive Oxygen Species Suppressive Effects of an Extract of *Polygonum Cuspidatum* Containing Resveratrol. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. **2010**, 95, E1–E8. doi:10.1210/jc.2010-0482.

168. Yu, M.; Chen, T.-T.; Zhang, T.; Jia, H.-M.; Li, J.-J.; Zhang, H.-W.; Zou, Z.-M. Anti-Inflammatory Constituents in the Root and Rhizome of *Polygonum Cuspidatum* by UPLC-PDA-QTOF/MS and Lipopolysaccharide-Activated RAW264.7 Macrophages. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **2021**, 195, 113839. doi:10.1016/j.jpba.2020.113839.

169. Kim, Y.-S.; Nam, Y.; Song, J.; Kim, H. Gastroprotective and Healing Effects of *Polygonum cuspidatum* Root on Experimentally Induced Gastric Ulcers in Rats. *Nutrients*. **2020**, 12, 2241. doi:10.3390/nu12082241.

170. Wu, X.; Luo, X.; Gu, S.; Xu, J. The Effects of *Polygonum Cuspidatum* Extract on Wound Healing in Rats. *J. Ethnopharmacol*. **2012**, 141, 934–937. doi:10.1016/j.jep.2012.03.040.

171. Nawrot-Hadzik, I.; Matkowski, A.; Pitułaj, A.; Sterczała, B.; Olchowy, C.; Szewczyk, A.; Choroma´ nska, A. *In Vitro* Gingival Wound Healing Activity of Extracts from *Reynoutria Japonica* Houtt Rhizomes. *Pharmaceutics*. **2021**, 13, 1764. doi:10.3390/pharmaceutics13111764.

173. Lin, Y.-W.; Yang, F.-J.; Chen, C.-L.; Lee, W.-T.; Chen, R.-S. Free Radical Scavenging Activity and Antiproliferative Potential of *Polygonum Cuspidatum* Root Extracts. *J. Nat. Med*. **2010**, 64, 146–152. doi:10.1007/s11418-009-0387-8.

174. Wang, Y.; Horng, C.; Hsieh, M.; Chen, H.; Huang, Y.; Yang, J.; Wang, G.; Chiang, J.; Chen, H.; Lu, C.; *et al*. Autophagy and Apoptotic Machinery Caused by *Polygonum cuspidatum* Extract in Cisplatin-resistant Human Oral Cancer CAR Cells. *Oncol. Rep*. **2019**, 41, 2549-2557. doi:10.3892/or.2019.6985.

175. Chang, J.; Liu, H.; Wang, K.; Chen, M.; Chiang, L.; Hua, Y.; Lin, C. Ethanol Extract of *Polygonum Cuspidatum* Inhibits Hepatitis B Virus in a Stable HBV-Producing Cell Line. *Antiviral Res*. **2005**, 66, 29–34. doi:10.1016/j.antiviral.2004.12.006.

176. Yiu, C.-Y.; Chen, S.-Y.; Yang, T.-H.; Chang, C.-J.; Yeh, D.-B.; Chen, Y.-J.; Lin, T.-P. Inhibition of Epstein-Barr Virus Lytic Cycle by an Ethyl Acetate Subfraction Separated from *Polygonum Cuspidatum* Root and Its Major Component, Emodin. *Molecules*. **2014**, 19, 1258–1272. doi:10.3390/molecules19011258.

177. Nawrot-Hadzik, I.; Zmudzinski, M.; Matkowski, A.; Preissner, R.; K¸esik-Brodacka, M.; Hadzik, J.; Drag, M.; Abel, R. *Reynoutria* Rhizomes as a Natural Source of SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors–Molecular Docking and *In Vitro* Study. *Pharmaceuticals*. **2021**, 14, 742. doi:10.3390/ph14080742.

178. Park, C.-S.; Lee, Y.-C.; Kim, J.-D.; Kim, H.-M.; Kim, C.-H. Inhibitory Effects of *Polygonum Cuspidatum* Water Extract (PCWE) and Its Component Resveratrol on Acyl-Coenzyme A–Cholesterol Acyltransferase Activity for Cholesteryl Ester Synthesis in HepG2 Cells. *Vascul. Pharmacol*. **2004**, 40, 279–284. doi:10.1016/j.vph.2004.01.003.

179. Kim, K.-W.; Ha, K.-T.; Park, C.-S.; Jin, U.-H.; Chang, H.W.; Lee, I.-S.; Kim, C.-H. *Polygonum Cuspidatum*, Compared with Baicalin and Berberine, Inhibits Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 Gene Expressions in RAW 264.7 Macrophages. *Vascul. Pharmacol*. **2007**, 47, 99–107. doi:10.1016/j.vph.2007.04.007.

180. Wang, Z.-J.; Trill, J.; Tan, L.-L.; Chang, W.-J.; Zhang, Y.; Willcox, M.; Xia, R.-Y.; Jiang, Y.; Moore, M.; Liu, J.-P.; *et al*. *Reynoutria Japonica* Houtt for Acute Respiratory Tract Infections in Adults and Children: A Systematic Review. *Front. Pharm*. **2022**, 13, 787032. doi:10.3389/fphar.2022.787032.

181. Park, B.; Lee, I.; Hyun, S.-W.; Jo, K.; Lee, T.; Kim, J.; Kim, C.-S. The Protective Effect of *Polygonum Cuspidatum* (PCE) Aqueous Extract in a Dry Eye Model. *Nutrients*. **2018**, 10, 1550. doi:10.3390/nu10101550.

182. Zhang, C.; Zhang, X.; Zhang, Y.; Xu, Q.; Xiao, H.; Liang, X. Analysis of Estrogenic Compounds in *Polygonum Cuspidatum* by Bioassay and High Performance Liquid Chromatography. *J. Ethnopharmacol*. **2006**, 105, 223–228. doi:10.1016/j.jep.2005.10.029.

183. Zhang, L.; Li, Y.; Gu, Z.; Wang, Y.; Shi, M.; Ji, Y.; Sun, J.; Xu, X.; Zhang, L.; Jiang, J.; *et al*. Resveratrol Inhibits Enterovirus 71 Replication and Pro-Inflammatory Cytokine Secretion in Rhabdosarcoma Cells through Blocking IKKs/NF-κB Signaling Pathway. *PLoS One*. **2015**, 10, e0116879. doi:10.1371/journal.pone.0116879.

184. Hodgin, K.S.; Donovan, E.K.; Kekes-Szabo, S.; Lin, J.C.; Feick, J.; Massey, R.L.; Ness, T.J.; Younger, J.W. A Placebo-Controlled, Pseudo-Randomized, Crossover Trial of Botanical Agents for Gulf War Illness: Resveratrol (*Polygonum Cuspidatum*), Luteolin, and Fisetin (*Rhus Succedanea*). *Int. J. Environ. Res. Public Health*. **2021**, 18, 2483. doi:10.3390/ijerph18052483.

185. Colica, C.; Milanović, M.; Milić, N.; Aiello, V.; De Lorenzo, A.; Abenavoli, L. A Systematic Review on Natural Antioxidant Properties of Resveratrol. *Nat. Prod. Commun*. **2018**, 13, 9, 1195-1203. doi:10.1177/1934578X1801300923.

186. Tseng, S.-H.; Lin, S.-M.; Chen, J.-C.; Su, Y.-H.; Huang, H.-Y.; Chen, C.-K.; Lin, P.-Y.; Chen, Y. Resveratrol Suppresses the Angiogenesis and Tumor Growth of Gliomas in Rats. *Clin. Cancer Res*. **2004**, 10, 2190–2202. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0105.

187. Ratz-Łyko, A.; Arct, J. Resveratrol as an Active Ingredient for Cosmetic and Dermatological Applications: A Review. *J. Cosmet. Laser Ther*. **2019**, 21, 84–90. doi:10.1080/14764172.2018.1469767.

188. Kasiotis, K.M.; Pratsinis, H.; Kletsas, D.; Haroutounian, S.A. Resveratrol and Related Stilbenes: Their Anti-Aging and Anti-Angiogenic Properties. *Food Chem. Toxicol*. **2013**, 61, 112–120. doi:10.1016/j.fct.2013.03.038.

189. Pezzuto, J.M.; Kondratyuk, T.P.; Ogas, T. Resveratrol Derivatives: A Patent Review (2009 – 2012). *Expert Opin. Ther. Pat*. **2013**, 23, 1529–1546. doi:10.1517/13543776.2013.834888.

190. Xie, Q.; Yang, Y.; Wang, Z.; Chen, F.; Zhang, A.; Liu, C. Resveratrol-4-*O*-*D*-(2'-Galloyl)-Glucopyranoside Isolated from *Polygonum Cuspidatum* Exhibits Anti-Hepatocellular Carcinoma Viability by Inducing Apoptosis *via* the JNK and ERK Pathway. *Molecules*. **2014**, 19, 1592–1602. doi:10.3390/molecules19021592.

191. Hegde, V.R.; Pu, H.; Patel, M.; Black, T.; Soriano, A.; Zhao, W.; Gullo, V.P.; Chan, T.-M. Two New Bacterial DNA Primase Inhibitors from the Plant *Polygonum Cuspidatum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2004**, 14, 2275–2277. doi:10.1016/j.bmcl.2004.02.006.

192. Jiao, Y.; Wu, Y.; Du, D. Polydatin Inhibits Cell Proliferation, Invasion and Migration, and Induces Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma. *Braz. J. Med. Biol. Res*. **2018**, 51, e6867. doi:10.1590/1414-431x20176867.

193. Park, B.; Jo, K.; Lee, T.G.; Hyun, S.-W.; Kim, J.S.; Kim, C.-S. Polydatin Inhibits NLRP3 Inflammasome in Dry Eye Disease by Attenuating Oxidative Stress and Inhibiting the NF-κB Pathway. *Nutrients*. 2019, 11, 2792. doi:10.3390/nu11112792.

194. Wang, H.-L.; Gao, J.-P.; Han, Y.-L.; Xu, X.;Wu, R.; Gao, Y.; Cui, X.-H. Comparative Studies of Polydatin and Resveratrol on Mutual Transformation and Antioxidative Effect *in Vivo*. *Phytomedicine*. **2015**, 22, 553–559. doi:10.1016/j.phymed.2015.03.014.

195. Jin, J.; Li, Y.; Zhang, X.; Chen, T.; Wang, Y.; Wang, Z. Evaluation of Both Free Radical Scavenging Capacity and Antioxidative Damage Effect of Polydatin. *Oxygen Transport to Tissue XXXVIII*, Advances in Experimental Medicine and Biology. *Springer Int. Publishing*. **2016**, 923, 57–62. doi:10.1007/978-3-319-38810-6_8.

196. Jeong, E.T.; Jin, M.H.; Kim, M.-S.; Chang, Y.H.; Park, S.G. Inhibition of Melanogenesis by Piceid Isolated from *Polygonum cuspidatum*. *Arch. Pharmacal Res*. **2010**, 33, 1331–1338. doi:10.1007/s12272-010-0906-x.

197. Bonucci, M.; Raggi, R.; Vacca, R.A. Polydatin and Its Potential Protective Effect on COVID-19. *Clin. Nut*. **2020**, 39, 3850–3851. doi:10.1016/j.clnu.2020.09.052.

198. He, Y.-D.; Liu, Y.-T.; Lin, Q.-X.; Zhu, J.; Zhang, Y.; Wang, L.-Y.; Ren, X.-L.; Ye, X.-Y. Polydatin Suppresses Ultraviolet B-Induced Cyclooxygenase-2 Expression *in Vitro* and *in Vivo via* Reduced Production of Reactive Oxygen Species: Correspondence. *Br. J. Dermatol*. **2012**, 167, 941–944. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.10951.x.

199. Du, Q.-H.; Peng, C.; Zhang, H. Polydatin: A Review of Pharmacology and Pharmacokinetics. *Pharm. Biol*. **2013**, 51, 1347–1354. doi:10.3109/13880209.2013.792849.

200. Şöhretoğlu, D.; Baran, M.Y.; Arroo, R.; Kuruüzüm-Uz, A. Recent Advances in Chemistry, Therapeutic Properties and Sources of Polydatin. *Phytochem. Rev*. **2018**, 17, 973–1005. doi:10.1007/s11101-018-9574-0.

201. Li, F.; Zhan, Z.; Liu, F.; Yang, Y.; Li, L.; Feng, Z.; Jiang, J.; Zhang, P. Polyflavanostilbene A, a New Flavanol-Fused Stilbene Glycoside from *Polygonum Cuspidatum*. *Org. Lett*. **2013**, 15, 674–677. doi:10.1021/ol3035033.

202. Jug, U.; Naumoska, K.; Vovk, I. (-)-Epicatechin—An Important Contributor to the Antioxidant Activity of Japanese Knotweed Rhizome Bark Extract as Determined by Antioxidant Activity-Guided Fractionation. *Antioxidants*. **2021**, 10, 133. doi:10.3390/antiox10010133.

203. Li, W; *et al*. 2-Ethoxystypandrone, a Novel Small-Molecule STAT3 Signaling Inhibitor from *Polygonum Cuspidatum*, Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis of HCC Cells and HCC Cancer Stem Cells. *BMC Complement. Altern. Med*. **2019**, 13, 19-38. doi.org/10.1186/s12906-019-2440-9.

204. Lin, H.-W.; Sun, M.-X.; Wang, Y.-H.; Yang, L.-M.; Yang, Y.-R.; Huang, N.; Xuan, L.-J.; Xu, Y.-M.; Bai, D.-L.; Zheng, Y.-T.; *et al*. Anti-HIV Activities of the Compounds Isolated from *Polygonum Cuspidatum* and *Polygonum Multiflorum*. *Planta Med*. **2010**, 76, 889–892. doi:10.1055/s-0029-1240796.

205. Leu, Y.-L.; Hwang, T.-L.; Hu, J.-W.; Fang, J.-Y. Anthraquinones From *Polygonum Cuspidatum* as Tyrosinase Inhibitors for Dermal Use. *Phytother. Res*. **2008**, 22, 552–556. doi:10.1002/ptr.2324.

206. Matsuda, H.; Shimoda, H.; Morikawa, T.; Yoshikawa, M. Phytoestrogens from the Roots of *Polygonum Cuspidatum* (*Polygonaceae*): Structure-Requirement of Hydroxyanthraquinones for Estrogenic Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2001**, 11, 1839–1842. doi:10.1016/S0960-894X(01)00318-3.

207. Liu, Z.; Wei, F.; Chen, L.-J.; Xiong, H.-R.; Liu, Y.-Y.; Luo, F.; Hou, W.; Xiao, H.; Yang, Z.-Q. *In Vitro* and *in Vivo* Studies of the Inhibitory Effects of Emodin Isolated from *Polygonum Cuspidatum* on Coxsakievirus B4. *Molecules*. **2013**, 18, 11842–11858. doi:10.3390/molecules181011842.

208. Kim, J.; Kim, M.-M. The Effect of Emodin on Melanogenesis through the Modulation of ERK and MITF Signaling Pathway. *Nat. Prod. Res*. **2022**, 36, 1084–1088. doi:10.1080/14786419.2020.1849200.

209. Wang, C.; Zhang, D.; Ma, H.; Liu, J. Neuroprotective Effects of Emodin-8-*O*-β-*d*-Glucoside *in Vivo* and *in Vitro*. *Eur. J. Pharmacol*. **2007**, 577, 58–63. doi:10.1016/j.ejphar.2007.08.033.

210. Akinwumi, B.; Bordun, K.-A.; Anderson, H. Biological Activities of Stilbenoids. *J. Mass Spectrom*. **2018**, 19, 792. doi:10.3390/ijms19030792.

211. Chang, R.C.-C.; Chao, J.; Yu, M.-S.; Wang, M. 10. Neuroprotective Effects of Oxyresveratrol from Fruit against Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Recent Adv. Nutr. Prev. Alzheimer's Disease*. **2010**, 155-168.

212. Saxena, S.; Srivastava, A. Resveratrol: Biological Activities and Therapeutic Potentia. *J. Pharm.Technol. Res. Manage*. **2014**, 2, 145–157. doi:10.15415/jptrm.2014.22010.

213. Bolton, J.L.; Trush, M.A.; Penning, T.M.; Dryhurst, G.; Monks, T.J. Role of Quinones in Toxicology. *Chem. Res. Toxicol*. **2000**, 13, 135–160. doi:10.1021/tx9902082.

214. El-Najjar, N.; Gali-Muhtasib, H.; Ketola, R.A.; Vuorela, P.; Urtti, A.; Vuorela, H. The Chemical and Biological Activities of Quinones: Overview and Implications in Analytical Detection. *Phytochem. Rev*. **2011**, 10, 353–370. doi:10.1007/s11101-011-9209-1.

215. Nonomura, S.; Kanagawa, H.; Makimoto, A. Studies on the Constituents of *Polygonaceous* Plants. III. Constituents of Ko-jô-kon (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.) *Yakugaku Zasshi*. **1963**; 83, 988-90. PMID: 14089847.

216. Cui, Y.; Chen, L.-J.; Huang, T.; Ying, J.-Q.; Li, J. The Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Potential of Anthraquinone Derivative Emodin. *Chin. J. Nat. Med*. **2020**, 18, 425–435. doi:10.1016/S1875-5364(20)30050-9.

217. Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *J. Nutr. Biochem*. **2002**, 13, 572–584. doi:10.1016/S0955-2863(02)00208-5.

218. Montagnani, C.; Gentili, R.; Smith, M.; Guarino, M.F.; Citterio, S. The Worldwide Spread, Success, and Impact of Ragweed (*Ambrosia* Spp.). *Crit. Rev. Plant Sci*. **2017**, 36, 139–178. doi:10.1080/07352689.2017.1360112.

219. Mang, T.; Essl, F.; Mosef, D.; Dullinger, S. Climate Warming Drives Invasion History of *Ambrosia Artemisiifolia* in Central Europe. *Preslia*. **2018**, 90, 59–81. doi:10.23855/preslia.2018.059.

220. Chauvel, B.; Cadet, É. Introduction et dispersion d'une espèce envahissante: le cas de l'ambroisie à feuilles d'armoise (*Ambrosia artemisiifolia L.*) en France. *Acta Bot. Gallica*. **2011**, 158, 309–327. doi:10.1080/12538078.2011.10516276.

221. Skálová, H. Performance of *Ambrosia Artemisiifolia* and Its Potential Competitors in an Experimental Temperature and Salinity Gradient and Implications for Management. *Manag. Biol. Invasions*. **2019**, 10, 359–376. doi:10.3391/mbi.2019.10.2.10.

222. Knolmajer, B.; Jócsák, I.; Taller, J.; Keszthelyi, S.; Kazinczi, G. Common Ragweed—*Ambrosia Artemisiifolia L.*: A Review with Special Regards to the Latest Results in Biology and Ecology. *Agronomy*. **2024**, 14, 497. doi:10.3390/agronomy14030497.

223. Girodet, B. Les allergènes de l'ambroisie. *Rev. Fr. Allergol*. **2013**, 53, 473–476. doi:10.1016/j.reval.2013.02.183.

224. Bagarozzi, D.A.; Travis, J. Ragweed Pollen Proteolytic Enzymes: Possible Roles in Allergies and Asthma. *Phytochem*. **1998**, 47, 593–598. doi:10.1016/S0031-9422(97)00634-1.

225. Turkalj, M.; Banic, I.; Anzic, S.A. A Review of Clinical Efficacy, Safety, New Developments and Adherence to Allergen-Specific Immunotherapy in Patients with Allergic Rhinitis Caused by Allergy to Ragweed Pollen (*Ambrosia Artemisiifolia*). *Patient Prefer. Adherence*. **2017**, 11, 247–257. doi:10.2147/PPA.S70411.

226. Taglialatela-Scafati, O.; Pollastro, F.; Minassi, A.; Chianese, G.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V.; Appendino, G. Sesquiterpenoids from Common Ragweed (*Ambrosia Artemisiifolia* L.), an Invasive Biological Polluter. *Eur. J. Org. Chem*. **2012**, 2012, 5162–5170. doi:10.1002/ejoc.201200650.

227. Kiss, T.; Szabó, A.; Oszlánczi, G.; Lukács, A.; Tímár, Z.; Tiszlavicz, L.; Csupor, D. Repeated-Dose Toxicity of Common Ragweed on Rats. *PLoS One*. **2017**, 12, 5, e0176818. doi:10.1371/journal.pone.0176818.

228. Kincel, K.; Ramona, Ș; Alin, C. Influence of *Ambrosia artemisiifolia* Extract on Germination and Growth of *Amaranthus retroflexus* and *Zea mays*. *Res. J. Agric. Sci*. **2019**, 51, 2.

229. Rasmussen, J.A.; Einhellig, F.A. Allelochemic Effects of Leaf Extracts of *Ambrosia Trifida* (*Compositae*). *Southwest. Nat*. **1979**, 24, 637. doi:10.2307/3670522.

230. Krajšek, Z.; Jakoš, Š.; Krajšek, S.S. The impact of mowing on the growth and blooming of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*). *Acta Biol. Slov*. **2019**, 62, 1, 67-76. ISSN: 1854-3073.

231. Dmitrović, S.; Perišić, M.; Stojić, A.; Živković, S.; Boljević, J.; Nestorović Živković, J.; Aničić, N.; Ristić, M.; Mišić, D. Essential Oils of Two *Nepeta* Species Inhibit Growth and Induce Oxidative Stress in Ragweed (*Ambrosia Artemisiifolia* L.) Shoots *in Vitro*. *Acta Physiol. Plant*. **2015**, 37, 64. doi:10.1007/s11738-015-1810-2.

232. ANSES. Impacts Sanitaires et Coûts associés à l'Ambroisie à feuilles d'armoise en France, Rapport d'expertise. *Ed. Sci*. **2020**.

233. Ballabriga, A. La nourriture des dieux et le parfum des déesses [A propos d'Iliade, XIV, 170-172]: A propos d'Iliade, XIV, 170-172. *Mètis-Anthropologie des mondes grecs anciens*. **1997**, 12, 119–127. doi:10.3406/metis.1997.1064.

234. Mamedov, Nazim; Mehdiyeva, N.P.; Craker, Lyle E. Medicinal Plants Used in Traditional Medicine of the Caucasus and North America. *J. Med. Act. Plants*. **2015**, 4, 3-4, 1-27. doi:10.7275/R51834DS.

235. Shemluck, M. Medicinal and Other Uses of the *Compositae* by Indians in the United States and Canada. *J. Ethnopharmacol*. **1982**, 5, 303–358. doi:10.1016/0378-8741(82)90016-2.

236. Roersch, C. Medicinal Plants in the Dominican Republic and Their Possible Role in Public Health Care. *Acta Hortic*. **2016**, 249–254. doi:10.17660/ActaHortic.2016.1125.31.

237. Željko, M.; Željko, Ć.; Milica Ž. B.; IGOR, S.; MiloŠ, K. Basic Nutrients and Minerals in the Samples of Common Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia L.*) from Different Sites. *Contemp. Agri*. **2011**, 60, 164-174.

238. Panda, S.; Roy, P.; Mahanty, D.S. Inventorization and Documentation of Herbal Black Salt Preparation by the *Apatanese* (Abo-Tani) of Apatani Valley in Lower Subansiri District of Arunachal Pradesh (India) Using 'Gonde Unio' Plant (*Ambrosia Artemisiifolia* L.---*Asteraceae*). *World Sci. News*. **2016**, 47, 2, 254-266. EISSN 2392-2192.

239. Hubbard, D. E. IVDDM abd Chemical Constituents in Selected Species of Wetland Plants. *Proc. S.D. Acad. Sci*. **1988**, 67.

240. Marten, G.C.; Andersen, R.N. Forage Nutritive Value and Palatability of 12 Common Annual Weeds 1. *Crop Sci*. **1975**, 15, 821–827. doi:10.2135/cropsci1975.0011183X001500060024x.

241. Chihladze K.A.; Goryacha L.M.; Shulga L.I.; Zhuravel I.O. Thick Extract of *Ambrosia artemisiifolia*-New Substance for Creation of Medicines. *The National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine*. **2015**.

242. Raszeja, W.; Gill, St. Isolation and Identification of Psilostachyin B from *Ambrosia artemisiifolia* L. *Planta Med*. **1977**, 32, 319–322. doi:10.1055/s-0028-1097606.

243. Thompson, A. C. The chemistry of allelopathy: Biochemical interactions among plants. In *ACS symposium series* (Vol. 268). *American Chemical Society*. **1985**. doi. org/10.1021/bk-1985-0268.

244. Ata, A.; Diduck, C.; Udenigwe, C.C.; Zahid, S.; Decken, A. New Chemical Constituents of *Ambrosia Psilostachya*. *Arkivoc*. **2007**, 2007, 195–203. doi:10.3998/ark.5550190.0008.d22.

245. Ivleva, N.P.; Niessner, R.; Panne, U. Characterization and Discrimination of Pollen by Raman Microscopy. *Anal. Bioanal. Chem*. **2005**, 381, 261–267. doi:10.1007/s00216-004-2942-1.

246. Bagarozzi, D.A.; Pike, R.; Potempa, J.; Travis, J. Purification and Characterization of a Novel Endopeptidase in Ragweed (*Ambrosia Artemisiifolia*) Pollen. *J. Biol. Chem*. **1996**, 271, 26227–26232. doi:10.1074/jbc.271.42.26227.

247. Løwenstein, H.; Marsh, D.G. Antigens of *Ambrosia Elatior* (Short Ragweed) Pollen. III. Crossed Radioimmunoelectrophoresis of Ragweed-Allergic Patients' Sera with Special Attention to Quantification of IgE Responses. *J. Immunol*. **1983**, 130, 2, 727–731. PMID: 6217252.

248. Mole, L.E.; Goodfriend, L.; Lapkoff, C.B.; Kehoe, J.M.; Capra, J.D. Amino Acid Sequence of Ragweed Pollen Allergen Ra5. *Biochemistry*. **1975**, 14, 1216–1220. doi:10.1021/bi00677a019.

249. Kanter, U.; Heller, W.; Durner, J.; Winkler, J.B.; Engel, M.; Behrendt, H.; Holzinger, A.; Braun, P.; Hauser, M.; Ferreira, F.; *et al*. Molecular and Immunological Characterization of Ragweed (*Ambrosia Artemisiifolia* L.) Pollen after Exposure of the Plants to Elevated Ozone over a Whole Growing Season. *PLoS One*. **2013**, 8, e61518. doi:10.1371/journal.pone.0061518.

250. Zhao, F.; Elkelish, A.; Durner, J.; Lindermayr, C.; Winkler, J.B.; Ruëff, F.; Behrendt, H.; Traidl-Hoffmann, C.; Holzinger, A.; Kofler, W.; *et al*. Common Ragweed (*Ambrosia Artemisiifolia* L.): Allergenicity and Molecular Characterization of Pollen after Plant Exposure to Elevated NO_2: Ragweed Pollen Allergenicity under Elevated NO_2. *Plant Cell Environ*. **2016**, 39, 147–164. doi:10.1111/pce.12601.

251. Chalchat, J.-C.; Maksimovic, Z.A.; Petrovic, S.D.; Gorunovic, M.S.; Dordevic, S.; Mraovic, M. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Ambrosia Artemisiifolia* L. Essential Oil. *J. Essent. Oil Res*. **2004**, 16, 270–273. doi:10.1080/10412905.2004.9698718.

252. Arnason, J.T.; Philogène, B.J.R.; Duval, F.; McLachlan, D.; Picman, A.K.; Towers, G.H.N.; Balza, F. Effects of Sesquiterpene Lactones on Development of *Aedes Atropalpus* and Relation to Partition Coefficient. *J. Nat. Prod*. **1985**, 48, 581–584. doi:10.1021/np50040a010.

253. Cai, H.; Meng, X.; Li, Y.; Yang, C.; Liu, Y. Growth Inhibition Effects of Isoalantolactone on K562/A02 Cells: Caspase-Dependent Apoptotic Pathways, S Phase Arrest, and Downregulation of Bcr/Abl: Isoalantolactone Inhibits Growth of K562/A02 Cells. *Phytother. Res*. **2014**, 28, 1679–1686. doi:10.1002/ptr.5182.

254. Lawrence, N.J.; McGown, A.T.; Nduka, J.; Had, J.A.; Pritchard, R.G. Cytotoxic Michael-Type Amine Adducts of α-Methylene Lactones Alantolactone and Isoalantolactone. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2001**, 3, 11, 429-431.

255. Li, Z.; Qin, B.; Qi, X.; Mao, J.; Wu, D. Isoalantolactone Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells via ROS-Mediated Mitochondrial Pathway and Downregulation of SIRT1. *Arch. Pharm. Res*. **2016**, 39, 1441–1453. doi:10.1007/s12272-016-0815-8.

256. Venables, L.; Koekemoer, T.C.; Van de Venter, M.; Goosen, E.D. Isoalantolactone, a Sesquiterpene Lactone from *Artemisia Afra* Jacq. Ex Willd and Its *in Vitro* Mechanism of Induced Cell Death in HeLa Cells. *S. Afr. J. Bot*. **2016**, 103, 216–221. doi:10.1016/j.sajb.2015.08.016.

257. Kumar, A.; Kumar, D.; Maurya, A.K.; Padwad, Y.S.; Agnihotri, V.K. New Semi-Synthetic Scaffolds of Isoalantolactone and Their Cytotoxic Activity. *Phytochem. Lett*. **2016**, 18, 117–121. doi:10.1016/j.phytol.2016.09.004.

258. Manole, C.G; Paraschiv, M; *et al*. Ragweed and Birthwort-Antimicrobial Evaluation. *Lucrări Ştiinţifice – seria Agronomie*. **2016**, 59, 1, 1-6.

259. Kleef, F.S. Application of Leaf Extracts of Ambrosia Artemisiifolia to Control *Spilocaea Oleagina* the Causal Agent of Olive Leaf Spot Disease on Olive Trees. *Faculty of Graduate Studies Palestine Technical University-Kadoorie*. **2019**, 1-79.

260. Kim, Y.O.; Lee, E.J. Comparison of Phenolic Compounds and the Effects of Invasive and Native Species in East Asia: Support for the Novel Weapons Hypothesis. *Ecol. Res*. **2011**, 26, 87–94. doi:10.1007/s11284-010-0762-7.

261. Chubinidze, V.V.; Beradze, L.V.; Bochoridze, L.D. Chemical Composition of the Essential Oil of *Ambrosia Artemisifolia*. *Chem. Nat. Compd*. **1984**, 20, 504–505. doi:10.1007/BF00574355.

262. Han, C.; Shao, H.; Zhou, S.; Mei, Y.; Cheng, Z.; Huang, L.; Lv, G. Chemical Composition and Phytotoxicity of Essential Oil from Invasive Plant, *Ambrosia Artemisiifolia* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. **2020**, 211, 111879, doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111879.

263. Sarić-Krsmanović, M.M.; Radivojević, L.M.; Šantrić, L.R.; Đorđević, T.M.; Gajić Umiljendić, J.S. Effects of Mixtures of Allelopathic Plant Water Extracts and a Herbicide on Weed Suppression Part B. *J. Environ. Sci. Health*. **2021**, 56, 16–22. doi:10.1080/03601234.2020.1831862.

264. Pérez G., R.M. Anti-Inflammatory Activity of *Ambrosia Artemisiifolia* and *Rhoeo Spathacea*. *Phytomedicine*. **1996**, 3, 163–167. doi:10.1016/S0944-7113(96)80030-4.

265. Parkhomenko, A.Yu.; Oganesyan, E.T.; Andreeva, O.A.; Dorkina, E.G.; Paukova, E.O.; Agadzhanyan, Z.S. Pharmacologically Active Substances from *Ambrosia Artemisiifolia*. Part 2. *Pharm. Chem. J*. **2006**, 40, 11, 627–632. doi:10.1007/s11094-006-0208-2.

266. Teodor, E.D.; Gatea, F.; Albu, C.; Rădulescu, C.M.; Chira, A.; Radu, G.L. Polyphenols, Radical Scavenger Activity, Short-Chain Organic Acids and Heavy Metals of Several Plants Extracts from "Bucharest Delta." *Chem. Pap*. **2015**, 69, 12, 1582-1590. doi:10.1515/chempap-2015-0177.

267. Maksimović, Z. *In Vitro* Antioxidant Activity of Ragweed (*Ambrosia Artemisiifolia* L., *Asteraceae*) Herb. *Ind. Crops Prod*. **2008**, 28, 3, 356–360. doi:10.1016/j.indcrop.2008.04.001.

268. Mihajlovic, L.; Radosavljevic, J.; Burazer, L.; Smiljanic, K.; Cirkovic Velickovic, T. Composition of Polyphenol and Polyamide Compounds in Common Ragweed (*Ambrosia Artemisiifolia* L.) Pollen and Sub-Pollen Particles. *Phytochemistry*. **2015**, 109, 125–132. doi:10.1016/j.phytochem.2014.10.022.

269. Qin, Z.; Mao, D.; Quan, G.; Zhang, J.-E.; Xie, J.; DiTommaso, A. Antioxidant Response of the Invasive Herb *Ambrosia Artemisiifolia* L. to Different Irradiance Levels. *Phytoprotection*. **2013**, 93, 1, 8–15. doi:10.7202/1015232ar.

270. Randelovic, V.; *et al*. 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara planina Mt., 20th to 23th June, Book of Abstracts. **2019**.

271. Sülsen, V.P.; Cazorla, S.I.; Frank, F.M.; Laurella, L.C.; Muschietti, L.V.; Catalán, C.A.; Martino, V.S.; Malchiodi, E.L. Natural Terpenoids from *Ambrosia* Species Are Active *In Vitro* and *In Vivo* against Human Pathogenic Trypanosomatids. *PLoS Negl. Trop. Dis*. **2013**, 7, e2494. doi:10.1371/journal.pntd.0002494.

272. Martino, R.; Beer, M.F.; Elso, O.; Donadel, O.; Sülsen, V.; Anesini, C. Sesquiterpene Lactones from *Ambrosia* Spp. Are Active against a Murine Lymphoma Cell Line by Inducing Apoptosis and Cell Cycle Arrest. *Toxicol. in Vitro*. **2015**, 29, 1529–1536. doi:10.1016/j.tiv.2015.06.011.

273. Lastra, A.L.; Ramírez, T.O.; Salazar, L.; Martínez, M.; Trujillo-Ferrara, J. The Ambrosanolide Cumanin Inhibits Macrophage Nitric Oxide Synthesis: Some Structural Considerations. *J. Ethnopharmacol*. **2004**, 95, 221–227. doi:10.1016/j.jep.2004.07.020.

274. Sülsen, V.P.; Puente, V.; Papademetrio, D.; Batlle, A.; Martino, V.S.; Frank, F.M.; Lombardo, M.E. Mode of Action of the Sesquiterpene Lactones Psilostachyin and Psilostachyin C on Trypanosoma Cruzi. *PLoS One*. **2016**, 11, e0150526. doi:10.1371/journal.pone.0150526.

275. Sülsen, V.P.; Frank, F.M.; Cazorla, S.I.; Barrera, P.; Freixa, B.; Vila, R.; Sosa, M.A.; Malchiodi, E.L.; Muschietti, L.V.; Martino, V.S. Psilostachyin C: A Natural Compound with Trypanocidal Activity. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **2011**, 37, 536–543. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.02.003.

276. Blanco, J.G.; Gil, R.R.; Alvarez, C.I.; Patrito, L.C.; Genti-Raimondi, S.; Flury, A. A Novel Activity for a Group of Sesquiterpene Lactones: Inhibition of Aromatase. *FEBS Lett*. **1997**, 409, 396–400. doi:10.1016/S0014-5793(97)00560-7.

277. Sülsen, V.P.; Cazorla, S.I.; Frank, F.M.; Anesini, C.; Muschietti, L.V.; Martino, V.S. South American Medicinal Flora: A Promising Source of Novel Compounds with Antiprotozoal Activity. *Lat. Am. J. Pharm*. **2011**, 30, 1, 202-208. ISSN 0326-2383.

278. Sülsen, V.P.; Frank, F.M.; Cazorla, S.I.; Anesini, C.A.; Malchiodi, E.L.; Freixa, B.; Vila, R.; Muschietti, L.V.; Martino, V.S. Trypanocidal and Leishmanicidal Activities of Sesquiterpene Lactones from *Ambrosia Tenuifolia* Sprengel (*Asteraceae*). *Antimicrob. Agents Chemother*. **2008**, 52, 2415–2419. doi:10.1128/AAC.01630-07.

279. Sülsen, V.; Gutierrez Yappu, D.; Laurella, L.; Anesini, C.; Gimenez Turba, A.; Martino, V.; Muschietti, L. *In Vitro* Antiplasmodial Activity of Sesquiterpene Lactones from *Ambrosia Tenuifolia*. *Evid. Based Complementary Altern. Med*. **2011**, 2011, 1–4. doi:10.1155/2011/352938.

280. Watanabe, S.; Kobayashi, A.; Yamashita, K. Growth and Germination Inhibitors in Hog-weed. *Agri. Biol. Chem*. **1981**, 45, 12, 2919-2920.

281. Beer, M.F.; Bivona, A.E.; Sánchez Alberti, A.; Cerny, N.; Reta, G.F.; Martín, V.S.; Padrón, J.M.; Malchiodi, E.L.; Sülsen, V.P.; Donadel, O.J. Preparation of Sesquiterpene Lactone Derivatives: Cytotoxic Activity and Selectivity of Action. *Molecules*. **2019**, 24, 1113. doi:10.3390/molecules24061113.

282. Sturgeon, C.M.; Craig, K.; Brown, C.; Rundle, N.T.; Andersen, R.J.; Roberge, M. Modulation of the G 2 Cell Cycle Checkpoint by Sesquiterpene Lactones Psilostachyins A and C Isolated from the Common Ragweed *Ambrosia Artemisiifolia*. *Planta Med*. **2005**, 71, 938–943. doi:10.1055/s-2005-873109.

283. Bosco, A.; Golsteyn, R. Emerging Anti-Mitotic Activities and Other Bioactivities of Sesquiterpene Compounds upon Human Cells. *Molecules*. **2017**, 22, 459. doi:10.3390/molecules22030459.

284. Sülsen, V.; Barrera, P.; Muschietti, L.; Martino, V.; Sosa, M. Antiproliferative Effect and Ultrastructural Alterations Induced by Psilostachyin on Trypanosoma Cruzi. *Molecules*. **2010**, 15, 545–553. doi:10.3390/molecules15010545.

285. Da Silva, C.F.; Batista, D. da G.J.; De Araújo, J.S.; Batista, M.M.; Lionel, J.; de Souza, E.M.; Hammer, E.R.; da Silva, P.B.; De Mieri, M.; Adams, M.; *et al*. Activities of Psilostachyin A and Cynaropicrin against Trypanosoma Cruzi *In Vitro* and *In Vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **2013**, 57, 5307–5314. doi:10.1128/AAC.00595-13.

286. Stanic, A.; Pavlovic, D.; Solujic, S. Preliminary Results on Biological Activity of a Pollen Extract of *Ambrosia Artemisiifolia* L. *J. Biol. Res.-Thessalon*. **2008**, 9, 45-53.

287. Dirsch, V.; Stuppner, H.; Vollmar, A. Cytotoxic Sesquiterpene Lactones Mediate Their Death-Inducing Effect in Leukemia T Cells by Triggering Apoptosis. *Planta Med*. **2001**, 67, 557–559. doi:10.1055/s-2001-16478.

288. Villagomez, R.; Collado, J.A.; Muñoz, E.; Almanza, G.; Sterner, O. Natural and Semi-Synthetic Pseudoguaianolides as Inhibitors of NF-κB. *J. Biomed. Sci. Eng*. **2014**, 07, 833–847. doi:10.4236/jbise.2014.710083.

289. Abouzid, S.; Orihara, Y.; Kawanaka, M. Molluscicidal Activity of Polyacetylenes from *Ambrosia Maritima* Hairy Roots. *Nat. Prod. Commun*. **2007**, 2, 2, 177-180. doi:10.1177/1934578X0700200214.

290. Rodríguez, E.; Dillon, M.O.; Mabry, T.J.; Mitchell, J.C.; Towers, G.H.N. Dermatologically Active Sesquiterpene Lactones in Trichomes of *Parthenium Hysterophorus* L. (*Compositae*). *Experientia*. **1976**, 32, 236–238. doi:10.1007/BF01937785.

291. Molinaro, F.; Monterumici, C.M.; Ferrero, A.; Tabasso, S.; Negre, M. Bioherbicidal Activity of a Germacranolide Sesquiterpene Dilactone from *Ambrosia Artemisiifolia* L. Part B. *J. Environ. Sci. Health*. **2016**, 51, 847–852. doi:10.1080/03601234.2016.1208466.

292. Molinaro, F.; Tyc, O.; Beekwilder, J.; Cankar, K.; Bertea, C.M.; Negre, M.; Garbeva, P. The Effect of Isabelin, a Sesquiterpene Lactone from *Ambrosia Artemisiifolia* on Soil Microorganisms and Human Pathogens. *FEMS Microbiol. Lett*. **2018**, 365. doi:10.1093/femsle/fny001.

293. Cotugno, R.; Fortunato, R.; Santoro, A.; Gallotta, D.; Braca, A.; De Tommasi, N.; Belisario, M.A. Effect of Sesquiterpene Lactone Coronopilin on Leukaemia Cell Population Growth, Cell Type-Specific Induction of Apoptosis and Mitotic Catastrophe: Effect of Sesquiterpene Lactone Coronopilin on Leukaemia. *Cell Prolif*. **2012**, 45, 53–65. doi:10.1111/j.1365-2184.2011.00796.x.

294. Villagomez, R.; Rodrigo, G.C.; Collado, I.G.; Calzado, M.A.; Muñoz, E.; Åkesson, B.; Sterner, O.; Almanza, G.R.; Duan, R.-D. Multiple Anticancer Effects of Damsin and Coronopilin Isolated from *Ambrosia Arborescens* on Cell Cultures. *Anticancer Res*. **2013**, 7, 33, 3799-3806. PMID: 24023312.

295. Picman, A.K.; Picman, J.; Towers, G.H.N. Cross-Reactivity between Sesquiterpene Lactones Related to Parthenin in Parthenin-Sensitized Guinea Pigs. *Contact Dermatitis*. **1982**, 8, 294–301. doi:10.1111/j.1600-0536.1982.tb04234.x.

296. Ramesh, C.; Harakishore, K.; Murty, U.S.N.; Das, B. Analogues of Parthenin and Their Antibacterial Activity. *Arkivoc*. **2004**, 2003, 126–132. doi:10.3998/ark.5550190.0004.915.

297. He, Q.; Liu, X.C.; Sun, R.Q.; Deng, Z.W.; Du, S.S.; Liu, Z.L. Mosquito Larvicidal Constituents from the Ethanol Extract of *Inula Racemosa* Hook. f. Roots against *Aedes Albopictus*. *J. Chem*. **2014**, 2014, 1–6. doi:10.1155/2014/738796.

298. Ding, W.; Huang, R.; Zhou, Z.; He, H.; Li, Y. *Ambrosia Artemisiifolia* as a Potential Resource for Management of Golden Apple Snails, *Pomacea Canaliculata* (Lamarck). *Pest. Manag. Sci*. **2018**, 74, 944–949. doi:10.1002/ps.4792.

299. An, J.-P.; Ha, T.K.Q.; Kim, H.W.; Ryu, B.; Kim, J.; Park, J.; Lee, C.H.; Oh, W.K. Eudesmane Glycosides from *Ambrosia Artemisiifolia* (Common Ragweed) as Potential Neuroprotective Agents. *J. Nat. Prod*. **2019**, 82, 1128–1138. doi:10.1021/acs.jnatprod.8b00841.

300. Weber, E. Biological Flora of Central Europe: *Solidago Altissima* L. *Flora*. **2000**, 195, 123–134. doi:10.1016/S0367-2530(17)30960-X.

301. Shelepova, V.; Tkacheva, E.V.; Vinogradova, Y.K. North American Species of *Solidago* as Ornamental Plants and a Source of Promising Raw Plant Materials. IOP Conf. Ser.: *Earth Environ. Sci*. **2021**, 845, 012150. doi:10.1088/1755-1315/845/1/012150.

302. Weber, E. Morphological Variation of the Introduced Perennial *Solidago Canadensis* L. Sensu Lato (*Asteraceae*) in Europe. *Bot. J. Linn. Soc.* **1997**, 123, 197–210. doi:10.1111/j.1095-8339.1997.tb01413.x.

303. Zhang, F.; Wan, F. Canada Goldenrod *Solidago Canadensis* L. Biological Invasions and Its Management in China. *Invading Nature-Springer Series in Invasion Ecology 13*. **2017**, 143–151. doi:10.1007/978-981-10-3427-5_10.

304. Poljuha, D.; Sladonja, B.; Uzelac Božac, M.; Šola, I.; Damijanić, D.; Weber, T. The Invasive Alien Plant *Solidago Canadensis*: Phytochemical Composition, Ecosystem Service Potential, and Application in Bioeconomy. *Plants*. **2024**, 13, 1745. doi:10.3390/plants13131745.

305. Muller, S.; Aboucaya, A.; Affre, L.; Cassan, S.; Collectif Plantes invasives en France. *Muséum National d'Histoire Naturelle Paris*. **2004**. ISBN 978-2-85653-570-7.

306. Czortek, P.; Królak, E.; Borkowska, L.; Bielecka, A. Impacts of Soil Properties and Functional Diversity on the Performance of Invasive Plant Species *Solidago Canadensis* L. on Post-Agricultural Wastelands. *Sci. Total Environ*. **2020**, 729, 139077. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139077.

307. Vinogradova, Yu.K.; Galkina, M.A. Hybridization as a Factor of Invasive Activity of Alien Goldenrod Species (*Solidago*). *Biol. Bull. Rev*. **2020**, 10, 57–70. doi:10.1134/S2079086420010090.

308. Ye, X.-Q.; Yan, Y.-N.; Wu, M.; Yu, F. High Capacity of Nutrient Accumulation by Invasive *Solidago Canadensis* in a Coastal Grassland. *Front. Plant Sci*. **2019**, 10, 575. doi:10.3389/fpls.2019.00575.

309. Zhang, S.; Jin, Y.; Tang, J.; Chen, X. The Invasive Plant *Solidago Canadensis* L. Suppresses Local Soil Pathogens through Allelopathy. *Appl. Soil Ecol*. **2009**, 41, 215–222. doi:10.1016/j.apsoil.2008.11.002.

310. Pei, Y.; Siemann, E.; Tian, B.; Ding, J. Root Flavonoids Are Related to Enhanced AMF Colonization of an Invasive Tree. *AoB Plants*. **2020**, 12, plaa002. doi:10.1093/aobpla/plaa002.

311. Wu, S.; Cheng, J.; Xu, X.; Zhang, Y.; Zhao, Y.; Li, H.; Qiang, S. Polyploidy in Invasive *Solidago Canadensis* Increased Plant Nitrogen Uptake, and Abundance and Activity of Microbes and Nematodes in Soil. *Soil Biol. Biochem*. **2019**, 138, 107594. doi:10.1016/j.soilbio.2019.107594.

312. Yuan, Y.; Wang, B.; Zhang, S.; Tang, J.; Tu, C.; Hu, S.; Yong, J.W.H.; Chen, X. Enhanced Allelopathy and Competitive Ability of Invasive Plant *Solidago Canadensis* in Its Introduced Range. *J. Plant Ecol*. **2013**, 6, 253–263. doi:10.1093/jpe/rts033.

313. Abhilasha, D.; Quintana, N.; Vivanco, J.; Joshi, J. Do Allelopathic Compounds in Invasive *Solidago Canadensis* s.l. Restrain the Native European Flora?: *Solidago* in Europe: An Allelopathic Perspective. *J. Ecol*. **2008**, 96, 993–1001. doi:10.1111/j.1365-2745.2008.01413.x.

314. Yang, R.; Yu, G.; Tang, J.; Chen, X. Effects of Metal Lead on Growth and Mycorrhizae of an Invasive Plant Species (*Solidago Canadensis* L.). *J. Environ. Sci*. **2008**, 20, 739–744. doi:10.1016/S1001-0742(08)62121-X.

315. Moerman, D.E. Native American Ethnobotany. *Timber Press*. **1998**. ISBN 978-0-88192-453-4.

316. Shelepova, O.; Vinogradova, Y.; Vergun, O.; Grygorieva, O.; Brindza, J. Invasive *Solidago Canadensis* L. as a Resource of Valuable Biological Compounds. *Potr. S. J. F. Sci*. **2019**, 13, 1, 280–286. doi:10.5219/1125.

317. Królak, E. Negative and Positive Aspects of the Presence of Canadian Goldenrod in the Environment. *Environ. Protect. Nat. Resour*. **2021**, 32, 6–12. doi:10.2478/oszn-2021-0002.

318. Novikova E. K; Kaukhova I. E. Development of Granule Composition Based on the Total Evaporated Extract of *Bidens Tripartita*, *Solidago Canadensis* and *Agrimonia Eupatoria* Herbs. *J. Pharm. Pharmacol*. **2021**, 9. doi:10.17265/2328-2150/2020.02.005.

319. Amtmann, M. The Chemical Relationship between the Scent Features of Goldenrod (*Solidago Canadensis* L.) Flower and Its Unifloral Honey. *J. Food Compos. Anal*. **2010**, 23, 122–129. doi:10.1016/j.jfca.2009.10.001.

320. Shelepova, O. Phytochemistry and Inflorescences Morphometry of Invasive *Solidago* L. (Goldenrods) Species – Valuable Late Autumn Mellifers. *Agrobiodivers. Improv. Nutr. health life Qual*. **2021**, 5. doi:10.15414/ainhlq.2021.0019.

321. Zihare, L.; Blumberga, D. Insight into Bioeconomy. *Solidago Canadensis* as a Valid Resource. Brief Review. *Energy Procedia*. **2017**, 128, 275–280. doi:10.1016/j.egypro.2017.09.074.

322. Ye, J.-R.; Wang, N.; Wang, H.; Luo, H.; Ren, Y.; Shen, Q. Structure and Properties of Cellulose/*Solidago canadensis* L. Blend. *Cellul. Chem. Technol*. **2015**, 49, 3-4, 275-280.

323. Ratiu, I.-A.; Al-Suod, H.; Ligor, M.; Ligor, T.; Railean-Plugaru, V.; Buszewski, B. Complex Investigation of Extraction Techniques Applied for Cyclitols and Sugars Isolation from Different Species of *Solidago* Genus. *Electrophoresis*. **2018**, 39, 15, 1966–1974. doi:10.1002/elps.201700419.

324. Šutovská, M.; Capek, P.; Kocmálová, M.; Fraňová, S.; Pawlaczyk, I.; Gancarz, R. Characterization and Biological Activity of *Solidago Canadensis* Complex. *Int. J. Biol. Macromol*. **2013**, 52, 192–197. doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.09.021.

325. Woźniak, D.; Ślusarczyk, S.; Domaradzki, K.; Dryś, A.; Matkowski, A. Comparison of Polyphenol Profile and Antimutagenic and Antioxidant Activities in Two Species Used as Source of *Solidaginis Herba* - Goldenrod. *Chem. Biodivers*. **2018**, 15, 4, e1800023. doi:10.1002/cbdv.201800023.

326. Burrell, R.C.; Houston, F.G. Isolation of a Saponin from the Leaves of *Solidago Canadensis* L. *J. Am. Chem. Soc*. **1948**, 70, 862–862. doi:10.1021/ja01182a503.

327. Mietlińska, K.; Przybyt, M.; Kalemba, D. Polish Plants as Raw Materials for Cosmetic Purposes. *Biotechnol. Food Sci*. **2020**, 95-106. doi:10.34658/BFS.2019.83.2.95-107.

328. Reznicek, G.; Jurenitsch, J.; Plasun, M.; Korhammer, S.; Haslinger, E.; Hiller, K.; Kubelka, W. Four Major Saponins from *Solidago Canadensis*. *Phytochem*. **1991**, 30, 1629–1633. doi:10.1016/0031-9422(91)84222-E.

329. Reznicek', G.; Jurenitsch, J.; Kubelka, W.; Korhammer, S.; Haslinger, F; Hiller, K. The First Spectroscopically Confirmed Saponins from *Solidago Canadensis*. *Planta Med*. **1990**, 56.

330. Reznicek, G.; Jurenitsch, J.; Freiler, M.; Korhammer, S.; Haslinger, E.; Hiller, K.; Kubelka, W. Isolierung und Struktur weiterer neuer Saponine aus *Solidago canadensis*. *Planta Med*. **1992**, 58, 94–98. doi:10.1055/s-2006-961398.

331. Horváth, G.; Molnár, P.; Farkas, Á.; Szabó, L.Gy.; Turcsi, E.; Deli, J. Separation and Identification of Carotenoids in Flowers of *Chelidonium Majus* L. and Inflorescences of *Solidago Canadensis* L. *Chromatographia.* **2010**, 71, S1, 103–108, doi:10.1365/s10337-010-1510-4.

332. Suleymanova, F.; Nesterova, O.; Matyushin, A. HPLC Quantification of Hydroxycinnamic and Organic Acids of Canadian Goldenrod (*Solidago Canadensis* L.). *Pharmacogn. J*. **2019**, 11, 2, 400–404. doi:10.5530/pj.2019.11.62.

333. Ichiharat, K.; *et al*. Polyacetylenes of *Solidago Altissima* L. *Agric. Biol. Chem*. **1978**, 42, 2, 427-431.

334. Tiansheng, L.; Menelaou, M.A.; Vargas, D.; Fronczek, F.R.; Fischer, N.H. Polyacetylenes and Diterpenes from *Solidago Canadensis*. *Phytochem*. **1993**, 32, 1483–1488. doi:10.1016/0031-9422(93)85163-L.

335. Sawabe, A.; Minemoto, K.; *et al*. Characterization of the *Z* and *E* Isomers of Dehydromatricaria Lactones. *J. Jpn. Oil Chem. Soc*. **1997**, 46, 4.

336. Ichihara, K.; Kawai, T.; Kaji, M.; Noda, M. A New Polyacetylene from *Solidago Altissima* L. *Agric. Biol. Chem*. **1976**, 40, 353–358. doi:10.1080/00021369.1976.10862050.

337. Mishra, D.; Joshi, S.; Sah, S.P.; Bisht, G. Chemical Composition, Analgesic and Antimicrobial Activity of Essential Oil from India. *J. Pharm. Res*. **2011**, 4, 1, 63-66. ISSN: 0974-6943.

338. Elshafie, H.S.; Gruľová, D.; Baranová, B.; Caputo, L.; Martino, L.D.; Sedlák, V.; Camele, I. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oil Extracted from *Solidago Canadensis* L. Growing Wild in Slovakia. *Molecules*. **2019**, 24, 1206. doi:10.3390/molecules24071206.

339. Marinas, I.-C.; Oprea, E.; Buleandra, M.; Bleotu, C.; Badea, I.A.; Anastasiu, P.; Lazar, V.; Gardus, I.-D.; Chifiriuc, M.C. Chemical, Antimicrobial, Antioxidant and Anti-Proliferative Features of the Essential Oil Extracted from the Invasive Plant *Solidago Canadensis* L. *Rev. Chim*. **2020**, 71, 255–264. doi:10.37358/RC.20.7.8243.

340. Gruľová, D.; Baranová, B.; Ivanova, V.; Martino, L.D.; Mancini, E. Composition and Bio Activity of Essential Oils of *Solidago* Spp. and Their Impact on Radish and Garden Cress. *Allelopathy J*. **2016**, 39, 2, 129-142.

341. Benelli, G.; Pavela, R.; Cianfaglione, K.; Nagy, D.U.; Canale, A.; Maggi, F. Evaluation of Two Invasive Plant Invaders in Europe (*Solidago Canadensis* and *Solidago Gigantea*) as Possible Sources of Botanical Insecticides. J. Pest. Sci. **2019**, 92, 2, 805–821, doi:10.1007/s10340-018-1034-5.

342. Shelepova, O.; Vinogradova, Y.; Zaitchik, B.; Ruzhitsky, A.; Grygorieva, O.; Brindza, J. Constituents of the essential oil in *Solidago canadensis* L. from Eurasia. *Potravinarstvo Slovak J. Food Sci*. **2018**, 12, 1, 20-25. ISSN 1337-0960.

343. Móricz, Á.M.; Jamshidi-Aidji, M.; Krüzselyi, D.; Darcsi, A.; Böszörményi, A.; Csontos, P.; Béni, S.; Ott, P.G.; Morlock, G.E. Distinction and Valorization of 30 Root Extracts of Five Goldenrod (*Solidago*) Species. *J. Chrom. A*. **2019**, 1611, 460602. doi:10.1016/j.chroma.2019.460602.

344. Jun, L.; Yonghao, Y.; Hongwu, H.; Liyao, D. Kaempferol-3-*O*-*β*-*D*-Glucoside, a Potential Allelochemical Isolated from *Solidago Canadensis*. *Allelopathy J*. **2011**, 28, 2, 259-266.

345. Gala-Czekaj, D.; Dziurka, M.; Bocianowski, J.; Synowiec, A. Autoallelopathic Potential of Aqueous Extracts from Canadian Goldenrod (*Solidago Canadensis* L.) and Giant Goldenrod (*S. Gigantea* Aiton). *Acta Physiol. Plant*. **2022**, 44, 1. doi:10.1007/s11738-021-03330-1.

346. Barbara Kołodziej Antibacterial and Antimutagenic Activity of Extracts Aboveground Parts of Three *Solidago* Species: *Solidago Virgaurea* L., *Solidago Canadensis* L. and *Solidago Gigantea* Ait. *J. Med. Plants Res*. **2011**, 5. doi:10.5897/JMPR11.1098.

347. Ye, M.; Zhang, L.; Ge, J.; Sun, H.; Ni, J.; Yang, S.; Wei, W. Antibacterial Properties of Extracts of *Solidago Canadensis* and Their Potential Use as Dietary Supplements in Red Swamp Crayfish (*Procambarus Clarkii*). *Front. Agr. Sci. Eng*. **2015**, 2, 327. doi:10.15302/J-FASE-2015078.

348. Frey, F.M.; Meyers, R. Antibacterial Activity of Traditional Medicinal Plants Used by Haudenosaunee Peoples of New York State. *BMC Complement Altern. Med*. **2010**, 10, 64. doi:10.1186/1472-6882-10-64.

349. Al-Rekaby, L.S.; Mohsein Atiyah, K. Antibacterial activities for root extracts of (goldenrods) *Solidago canadensis* L. treated by Nano and bio fertilizer. *Al-Qadisiyah J. Pure Sci*. **2020**, 25, 4, 1–14. doi.org/10.29350/ jops.2020.25.4.1201.

350. Deng, Y.; Zhao, Y.; Padilla-Zakour, O.; Yang, G. Polyphenols, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Leaf and Bark Extracts of *Solidago Canadensis* L. *Ind. Crops Prod*. **2015**, 74, 803–809, doi:10.1016/j.indcrop.2015.06.014.

351. Dżugan, M.; Miłek, M.; Kielar, P.; Stępień, K.; Sidor, E.; Bocian, A. SDS-PAGE Protein and HPTLC Polyphenols Profiling as a Promising Tool for Authentication of Goldenrod Honey. *Foods*. **2022**, 11, 16, 2390, doi:10.3390/foods11162390.

352. Apati, P.; Szentmihályi, K.; Balázs, A.; Baumann, D.; Hamburger, M.; Kristó, T.Sz.; Szőke, É.; Kéry, Á. HPLC Analysis of the Flavonoids in Pharmaceutical Preparations from Canadian Goldenrod (*Solidago Canadensis*). *Chromatographia*. **2002**, 56, S65–S68. doi:10.1007/BF02494115.

353. Czigle, S.; Filep, R.; Balažová, E.; Szentgyörgyi, H.; Balázs, V.L.; Kocsis, M.; Purger, D.; Papp, N.; Farkas, Á. Antioxidant Capacity Determination of Hungarian-, Slovak-, and Polish-Origin Goldenrod Honeys. *Plants*. **2022**, 11, 6, 792. doi:10.3390/plants11060792.

354. Moaddel, R.; Rossi, M.; Rodriguez, S.; Munk, R.; Khadeer, M.; Abdelmohsen, K.; Gorospe, M.; Ferrucci, L. Identification of Gingerenone A as a Novel Senolytic Compound. *PLoS One*. **2022**, 17, e0266135. doi:10.1371/journal.pone.0266135.

355. Baležentien, L. Secondary Metabolite Accumulation and Phytotoxicity of Invasive Species *Solidago Canadensis* L. during the Growth Period. *Allelopathy J*. **2015**, 35, 2, 217-226.

356. Baležentienė, L. Allelopathic Activity of Invasive Species *Solidago canadensis* L. *Proceedings of the 7th International Scientific Conference Rural Development*. **2015**. doi.org/10.15544/RD.2015.037.

357. Anžlovar, A.L.; Anžlovar, S. Allelopathic Effect of Aqueous Extracts of Canadian Goldenrod on Germination and Growth of Radish. *Acta Biol. Slov*. **2019**, 62, 2, 27-34.

358. Sun, J.F.; Liang, Q.J.; Wu, N.; Javed, Q.; Huang, P.; Du, D.L. Allelopathic effects of aqueous extracts from different plant parts of Canada Goldenrod (*Solidago canadensis* L.) on seed germination and seedling growth of Korean Lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.). *Appl. Ecol. Env. Res*. **2022**, 20, 2, 1009–1022. doi:10.15666/aeer/2002_10091022.

359. Zandi, P.; Barabasz-Krasny, B.; Stachurska-Swakoń, A.; Puła, J.; Możdżeń, K. Allelopathic Effect of Invasive Canadian Goldenrod (*Solidago Canadensis* L.) on Early Growth of Red Clover (*Trifolium Pratense* L.). *Not. Bot. Horti. Agrobo*. **2020**, 48, 2060–2071. doi:10.15835/nbha48412081.

360. Możdżeń, K.; Barabasz-Krasny, B.; Zandi, P.; Kliszcz, A.; Puła, J. Effect of Aqueous Extracts from *Solidago Canadensis* L. Leaves on Germination and Early Growth Stages of Three Cultivars of *Raphanus Sativus* L. *Var. Radicula Pers*. *Plants*. **2020**, 9, 1549. doi:10.3390/plants9111549.

361. Shen, X.; Wang, Z.; Liu, L.; Zou, Z. Molluscicidal Activity of *Solidago Canadensis* L. Extracts on the Snail *Pomacea Canaliculata* Lam. *Pestic. Biochem. Physiol*. **2018**, 149, 104–112. doi:10.1016/j.pestbp.2018.06.009.

362. Huang, Y.; Bai, Y.; Wang, Y.; Kong, H. Allelopathic Effects of the Extracts from an Invasive Species *Solidago Canadensis* L. on *Microcystis Aeruginosa*. *Lett. Appl. Microbiol*. **2013**, 57, 451–458. doi:10.1111/lam.12133.

363. Nkuimi Wandjou, J.G.; Quassinti, L.; Gudžinskas, Z.; Nagy, D.U.; Cianfaglione, K.; Bramucci, M.; Maggi, F. Chemical Composition and Antiproliferative Effect of Essential Oils of Four *Solidago* Species (*S. Canadensis*, *S. Gigantea*, *S. Virgaurea* and *S.× Niederederi*). *Chem. Biodivers*. **2020**, 17, doi:10.1002/cbdv.202000685.

364. Li, D.Q.; Pan, S.H.; Zhu, X.W.; Tan, L.; Cao, Y.F. Anticancer Activity and Chemical Composition of Leaf Essential Oil from *Solidago Canadensis* L. in China. *Acad. Manage. Rev*. **2011**, 347–353, 1584–1589. doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.347-353.1584.

365. Huang, B.; Lei, Y.; Qin, L.; Liu, J. Chemical Composition and Cytotoxic Activities of the Essential Oil from the Inflorescences of *Solidago Canadensis* L., an Invasive Weed in Southeastern China. *J. Essent. Oil-Bear. Plants*. **2012**, 15, 667–671. doi:10.1080/0972060X.2012.10644103.

366. El-Sherei, M.; Khaleel, A.; Motaal, A.A.; Abd-Elbaki, P. Effect of Seasonal Variation on the Composition of the Essential Oil of *Solidago Canadensis* Cultivated in Egypt. *J. Essent. Oil-Bear. Plants*. **2014**, 17, 891–898. doi:10.1080/0972060X.2014.901612.

367. Johnson, R.H.; Halitschke, R.; Kessler, A. Simultaneous Analysis of Tissue- and Genotype-Specific Variation in *Solidago Altissima* (*Asteraceae*) Rhizome Terpenoids, and the Polyacetylene Dehydromatricaria Ester. *Chemoecology*. **2010**, 20, 255–264. doi:10.1007/s00049-010-0055-1.

368. Apáti, P.; Szentmihályi, K.; Kristó, Sz.T.; Papp, I.; Vinkler, P.; Szoke, É.; Kéry, Á. Herbal Remedies of *Solidago*—Correlation of Phytochemical Characteristics and Antioxidative Properties. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **2003**, 32, 1045–1053. doi:10.1016/S0731-7085(03)00207-3.

369. Marksa, M.; Zymone, K.; Ivanauskas, L.; Radušienė, J.; Pukalskas, A.; Raudone, L. Antioxidant Profiles of Leaves and Inflorescences of Native, Invasive and Hybrid *Solidago* Species. *Ind. Crops Prod*. **2020**, 145, 112123. doi:10.1016/j.indcrop.2020.112123.

370. Marksa, M.; Radušienė, J.; Jakštas, V.; Ivanauskas, L.; Marksienė, R. Development of an HPLC Post-Column Antioxidant Assay for *Solidago Canadensis* Radical Scavengers. *Nat. Prod. Res*. **2016**, 30, 536–543. doi:10.1080/14786419.2015.1027703.

371. Apáti, P.; Kéry, Á.; Houghton, P.J.; Steventon, G.B.; Kite, G. *In-Vitro* Effect of Flavonoids from *Solidago Canadensis* Extract on Glutathione *S*-Transferase. *J. Pharm. Pharmacol*. **2010**, 58, 251–256. doi:10.1211/jpp.58.2.0013.

372. Huang, Y.; Hao, Y.-L.; Mai, X.-Y. Chemical Constituents from *Solidago Canadensis* with Hypolipidemic Effects in HFD-Fed Hamsters. *J. Asian Nat. Prod. Res*. **2013**, 15, 4, 319–324. doi:10.1080/10286020.2012.753059.

373. Li, J.; Pan, L.; Fletcher, J.N.; Lv, W.; Deng, Y.; Vincent, M.A.; Slack, J.P.; McCluskey, T.S.; Jia, Z.; Cushman, M.; *et al*. *In Vitro* Evaluation of Potential Bitterness-Masking Terpenoids from the Canada Goldenrod (*Solidago Canadensis*). *J. Nat. Prod*. **2014**, 77, 7, 1739–1743. doi:10.1021/np5001413.

374. Chaturvedula, V.S.P.; Zhou, B.-N.; Gao, Z.; Thomas, S.J.; Hecht, S.M.; Kingston, D.G.I. New Lupane Triterpenoids from *Solidago Canadensis* That Inhibit the Lyase Activity of DNA Polymerase *β*. *Bioorg. Med. Chem*. **2004**, 12, 6271–6275. doi:10.1016/j.bmc.2004.08.048.

375. Bradette-Hébert, M.-E.; Legault, J.; Lavoie, S.; Pichette, A. A New Labdane Diterpene from the Flowers of *Solidago Canadensis*. *Chem. Pharm. Bull*. **2008**, 56, 82–84. doi:10.1248/cpb.56.82.

376. Radusiene, J.; Marska, M.; Ivanauskas, L.; Jakstas, V.; Karpaviciene, B. Assessment of Phenolic Compound Accumulation in Two Widespread Goldenrods. *Ind. Crops Prod*. **2015**, 63, 158–166. doi:10.1016/j.indcrop.2014.10.015.

377. Likhanov, A.; Oliinyk, M.; Pashkevych, N.; Churilov, A.; Kozyr, M. The Role of Flavonoids in Invasion Strategy of *Solidago Canadensis* L. *Plants*. **2021**, 10, 1748. doi:10.3390/plants10081748.

378. Werner, P.A.; Gross, R.S.; Bradbury, I.K. The Biology of Canadian weeds: 45. *Solidago Canadensis* L. *Can. J. Plant Sci*. **1980**, 60, 1393–1409. doi:10.4141/cjps80-194.

379. Camel, V. Microwave-Assisted Solvent Extraction of Environmental Samples. *Trends Anal. Chem*. **2000**, 19, 229–248. doi:10.1016/S0165-9936(99)00185-5.

380. Oreopoulou, A.; Tsimogiannis, D.; Oreopoulou, V. Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. *In Polyphenols in Plants; Elsevier*, **2019**; 243–259. ISBN 978-0-12-813768-0.

381. Chemat, F.; Vian, M.A.; Cravotto, G. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *Int. J. Mass Spectrom*. **2012**, 13, 8615–8627. doi:10.3390/ijms13078615.

382. Rostagno, M.A. ; Prado, M. Natural Product Extraction Principles and Applications. *The Royal Society of Chemistry*. **2013**; 1-516. P001–P004 ISBN 978-1-84973-606-0.

383. Hidayat, R.; Wulandari, P. Methods of Extraction: Maceration, Percolation and Decoction. *Eu. Herb. Ina*. **2021**, 2, 73–79. doi:10.37275/ehi.v2i1.15.

384. Zimmerman, J.B. Through the 12 Principles Green Engineering. *Eenv. Sci. Technol*. 2003, 1-8.

385. Chemat, F.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Abert-Vian, M. Les six principes de l'éco-extraction du végétal. *Procédés chimie - bio – agro, Opérations unitaires. Génie de la réaction chimique*. **2018**.

386. Wang, J.; Feng, J.; Xu, L.; Ma, J.; Li, J.; Ma, R.; Sun, K.; Wang, Z.; Zhang, H. Ionic Liquid-Based Salt-Induced Liquid-Liquid Extraction of Polyphenols and Anthraquinones in *Polygonum Cuspidatum*. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **2019**, 163, 95–104. doi:10.1016/j.jpba.2018.09.050.

387. Zuin, V.G.; Ramin, L.Z. Green and Sustainable Separation of Natural Products from Agro-Industrial Waste: Challenges, Potentialities, and Perspectives on Emerging Approaches. *Top Curr. Chem. (Z)*. **2018**, 376, 3. doi:10.1007/s41061-017-0182-z.

388. Khadhraoui, B.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Robinet, P.; Imbert, R.; Chemat, F. Ultrasound Technology for Food Processing, Preservation, and Extraction. *Green Food Process. Techn*. **2019**, 23–56. ISBN 978-0-12-815353-6.

389. Draye, M.; Chevallier, M.; Quinty, V.; Besnard, C.; Vandeponseele, A.; Chatel, G. Sustainable activation of chemical substrates under sonochemical conditions. CHAPTER 8. Sustainable organic synthesis: tools and strategies. *R. Soc. Chem*. **2021**; 212–238.

390. Perino, S.; Makerri, C.; Abert-Vian, M.; Chemat, F. Extraction d'actifs cosmétiques. *Formulation*. **2016**. doi:10.51257/a-v1-j2215.

391. Draye, M.; Estager, J.; Malacria, M.; Goddard, J.-P.; Ollivier, C. Sonochimie organique. *Chimie verte*. **2009**. doi:10.51257/a-v1-k1250.

392. Wen, C.; Zhang, J.; Zhang, H.; Dzah, C.S.; Zandile, M.; Duan, Y.; Ma, H.; Luo, X. Advances in Ultrasound Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Cash Crops – A Review. *Ultrason. Sonochem*. **2018**, 48, 538–549. doi:10.1016/j.ultsonch.2018.07.018.

393. Leonelli, C.; Mason, T.J. Microwave and Ultrasonic Processing: Now a Realistic Option for Industry. *Chem. Engine. Process. Process Intens*. **2010**, 49, 885–900. doi:10.1016/j.cep.2010.05.006.

394. Ganzler, K.; *et al*. Microwave Extraction, a novel sample preparation Method for Chromatography. *J. Chromatogr*. **1986**, 371, 299-306.

395. Perino, S.; Chemat, F. Chauffage micro-ondes comme éco-procédé en industrie agroalimentaire. *Agroalimentaire*. **2015**, doi:10.51257/a-v1-f3070.

396. Anizon, J.-Y.; Lemaire, B.; Surbled, M. Extraction assistée par micro-ondes. *Agroalimentaire*. **2003**. doi:10.51257/a-v1-f3060.

397. Varghese, T.; Pare, A. Effect of Microwave Assisted Extraction on Yield and Protein Characteristics of Soymilk. *J. Food Engine*. **2019**, 262, 92–99. doi:10.1016/j.jfoodeng.2019.05.020.

398. Kamel, E. Effect of Heating by Microwave Oven on Weeds Seed Germination in Imported Shipments. *Egypt. J. Agron*. **2021**. doi:10.21608/agro.2021.77144.1259.

399. Hall, R.M.; Urban, B.; Durec, N.; Renner-Martin, K.; Kaul, H.-P.; Wagentristl, H.; Karrer, G. Heat Treatment of Seeds to Control Invasive Common Ragweed (*Ambrosia Artemisiifolia*), Narrow-Leaved Ragwort (*Senecio Inaequidens*) and Giant Hogweed (*Heracleum Mantegazzianum*). *Plants*. **2024**, 13, 341. doi:10.3390/plants13030341.

400. Curet, S. Microwave heating processes: experimental and numerical approaches to interactions with food products. *ISTE Ltd*. **2019**, 2. doi:10.21494/ISTE.OP.2021.0676.

401. Poux, M.; Estel, L.; Len, C. Micro-ondes en synthèse organique. *Chimie verte*. **2016**. doi:10.51257/a-v1-j5020.

402. Goupy, J. Modélisation par les plans d'expériences. *Génie industriel, Métier : responsable qualité*. **2016**.

403. Equixor, I. Comprendre les plans d'expérience. *Génie industriel, Métier : responsable qualité*. **2014**. doi:10.51257/f-1296.

404. Goupy, J. Plans d'expériences. *Mesures – Analyses, Qualité et sécurité au laboratoire*. **1997**.

405. Pillet, M.; Louvet, F.; Pillet, D. Plan d'expériences « Definitive Screening Design », une alternative crédible aux plans composites centrés? *Qualita*. **2017**, 1-10.

406. Husson, F. Plans pour surfaces de réponses. *UP de mathématiques appliquées Agrocampus Ouest*. **2020**, 1-24.

407. Bélanger, J.M.R.; Jocelyn Paré, J.R.; Sigouin, M. Chapter 2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles and Applications. In Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry. *Instrumental Methods Food Anal*. **1997**, 18, 37–59.

408. Yiasmin, M.N.; Waleed, A.-A. Recent Applications of HPLC in Food Analysis: A Mini Review. *Int. J. Adv. Engine. Manage. Sci*. **2021**, 7, 5, 2454-1311.

409. Karabat, R. R.; Hammood, A. J.; Abdulrasool, W. A.; Hussein, S.S. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): Primary Mechanism and Popular Applications. *Al-Nahrain J. Sci*. **2023**, 26, 1–12. doi:10.22401/ANJS.26.4.01.

410. Veuthey, J.-L. Particules superficiellement poreuses en chromatographie liquide. *Techniques d'analyse*. **2016**. doi:10.51257/a-v1-in187.

411. Guillarme, D. Évolutions majeures en chromatographie liquide. *Médicaments et produits pharmaceutiques*. **2014**. doi:10.51257/a-v1-p1494.

412. Veuthey, J.-L. Chromatographie en phase liquide - Introduction. *Techniques d'analyse*. **2020**. doi:10.51257/a-v1-p1454.

413. Sherma, J.; Rabel, F. Review of Advances in Planar Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol*. **2020**, 43, 394–412. doi:10.1080/10826076.2020.1725561.

414. Morlock, G.E. Background Mass Signals in TLC/HPTLC–ESI-MS and Practical Advices for Use of the TLC-MS INTERFACE. *J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol*. **2014**, 37, 2892–2914. doi:10.1080/10739149.2014.907000.

415. Kiprovski, B.; Malencic, D.; Lukovic, J.; Boza, P. Antioxidant Potential of Ragweeds: *Ambrosia Artemisiifolia*, *A. Trifida* and *Iva Xanthifolia*. *Zb. Mat. Srp. Prir. Nauk*. **2019**, 155–164. doi:10.2298/ZMSPN1936155K.

416. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int. J. Mol. Sci*. **2021**, 22, 7, 3380. doi:10.3390/ijms22073380.

417. Orbán-Gyapai, O.; Lajter, I.; Hohmann, J.; Jakab, G.; Vasas, A. Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Extracts Prepared from *Polygonaceae* Species. *Phytother. Res*. **2015**, 29, 459–465. doi:10.1002/ptr.5275.

418. Lee, C.-C.; Chen, Y.-T.; Chiu, C.-C.; Liao, W.-T.; Liu, Y.-C.; David Wang, H.-M. *Polygonum cuspidatum* Extracts as Bioactive Antioxidaion, Anti-Tyrosinase, Immune Stimulation and Anticancer Agents. *J. Biosci. Bioeng*. **2015**, 119, 464–469. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.09.008.

419. Champagne, B. Protéolise de ICAM-1 par l'Elastase de Laucocyte. *INSTITUT ARMAND-FRAPPIER Université du Québec*. **1999**.

420. El Kady, W.M.; Ayoub, I.M.; El Mehrate, A.K.; Emad, M.; Tarek, M.; El Gdeily, A.; Mohamed, E.-R.; Medhat, R.; Mahmoud, O.; Gad, A.M.; *et al*. Valorization of *Citrus* Peels: GC/MS-Based Metabolites Profiling, Multivariate Analysis, and Antiaging Potential. *Archiv. Der. Pharmazie*. **2024**, 357, 2300742. doi:10.1002/ardp.202300742.

421. Heinzle, A.; Papen-Botterhuis, N.E.; Schiffer, D.; Schneider, K.P.; Binder, B.; Schintler, M.; Haaksman, I.K.; Lenting, H.B.; Gübitz, G.M.; Sigl, E. Novel Protease-Based Diagnostic Devices for Detection of Wound Infection. *Wound Repair Regen*. **2013**, 21, 482–489. doi:10.1111/wrr.12040.

422. Bo, Y. S.; Hyun, P. K. Inhibition of Collagenase by Naturally-Occurring Flavonoids. *Arch. Pharm. Res.* **2005**, 28, 10, 1152-1155.

423. Chen, J.; Yu, X.; Huang, Y. Inhibitory Mechanisms of Glabridin on Tyrosinase. *Spectro. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectro*. **2016**, 168, 111–117. doi:10.1016/j.saa.2016.06.008.

424. Jiratchayamaethasakul, C.; Ding, Y.; Hwang, O.; Im, S.-T.; Jang, Y.; Myung, S.-W.; Lee, J.M.; Kim, H.-S.; Ko, S.-C.; Lee, S.-H. *In Vitro* Screening of Elastase, Collagenase, Hyaluronidase, and Tyrosinase Inhibitory and Antioxidant Activities of 22 Halophyte Plant Extracts for Novel Cosmeceuticals. *Fish Aquatic. Sci*. **2020**, 23, 6. doi:10.1186/s41240-020-00149-8.

425. Glavnik, V.; Vovk, I. Extraction of Anthraquinones from Japanese Knotweed Rhizomes and Their Analyses by High Performance Thin-Layer Chromatography and Mass Spectrometry. *Plants*. **2020**, 9, 1753. doi:10.3390/plants9121753.

426. Zekič, J.; Vovk, I.; Glavnik, V. Extraction and Analyses of Flavonoids and Phenolic Acids from Canadian Goldenrod and Giant Goldenrod. *Forests*. **2020**, 12, 40. doi:10.3390/f12010040.

427. Glavnik, V.; Vovk, I. High Performance Thin-Layer Chromatography–Mass Spectrometry Methods on Diol Stationary Phase for the Analyses of Flavan-3-Ols and Proanthocyanidins in Invasive Japanese Knotweed. *J. Chromatogr. A*. **2019**, 1598, 196–208. doi:10.1016/j.chroma.2019.03.050.

428. Jug, U.; Vovk, I.; Glavnik, V.; Makuc, D.; Naumoska, K. Off-Line Multidimensional High Performance Thin-Layer Chromatography for Fractionation of Japanese Knotweed Rhizome Bark Extract and Isolation of Flavan-3-Ols, Proanthocyanidins and Anthraquinones. *J. Chromatogr. A*. **2021**, 1637, 461802. doi:10.1016/j.chroma.2020.461802.

429. Zhao, R.; Liu, S.; Zhou, L. Rapid Quantitative HPTLC Analysis, on One Plate, of Emodin, Resveratrol, and Polydatin in the Chinese Herb *Polygonum cuspidatum*. *Chromatographia*. **2005**, 61, 311–314. doi:10.1365/s10337-005-0514-y.

430. Hawrył, M.A.; Waksmundzka-Hajnos, M. Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography of Selected *Polygonum* Sp. Extracts on Polar-Bonded Stationary Phases. *J. Chromatogr. A*. **2011**, 1218, 2812–2819. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.020.

431. Fichou, D.; Ristivojević, P.; Morlock, G.E. Proof-of-Principle of rTLC, an Open-Source Software Developed for Image Evaluation and Multivariate Analysis of Planar Chromatograms. *Anal. Chem*. **2016**, 88, 12494–12501. doi:10.1021/acs.analchem.6b04017.

432. Lee, S.K.; Mbwambo, Z.H.; Chung, H.; Luyengi, L.; Gamez, E.J.; Mehta, R.G.; Kinghorn, A.D.; Pezzuto, J.M. Evaluation of the Antioxidant Potential of Natural Products. *Comb. Chem. High Throughput Screen*. **1998**, 1, 1, 35–46.

433. Vrchotová, N.; Sera, B.; Dadakova, E. HPLC and CE Analysis of Catechins, Stilbens and Quercetin in Flowers and Stems of *Polygonum Cuspidatum*, *P. Sachalinense* and *P. x Bohemicum*. *J. Indian Chem. Soc*. **2010**, 87, 1267–1272.

434. Gao, F.; Zhou, T.; Hu, Y.; Lan, L.; Heyden, Y.V.; Crommen, J.; Lu, G.; Fan, G. Cyclodextrin-Based Ultrasonic-Assisted Microwave Extraction and HPLC-PDA-ESI-ITMS^n Separation and Identification of Hydrophilic and Hydrophobic Components of *Polygonum Cuspidatum*: A Green, Rapid and Effective Process. *Ind. Crops Prod*. **2016**, 80, 59–69. doi:10.1016/j.indcrop.2015.10.039.

435. Fletes-Vargas, G.; Rodríguez-Rodríguez, R.; Pacheco, N.; Pérez-Larios, A.; Espinosa-Andrews, H. Evaluation of the Biological Properties of an Optimized Extract of *Polygonum Cuspidatum* Using Ultrasonic-Assisted Extraction. *Molecules*. **2023**, 28, 4079. doi:10.3390/molecules28104079.

436. Kuo, C.-H.; Chen, B.-Y.; Liu, Y.-C.; Chang, C.-M.; Deng, T.-S.; Chen, J.-H.; Shieh, C.-J. Optimized Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Polygonum Cuspidatum*. *Molecules*. **2013**, 19, 67–77. doi:10.3390/molecules19010067.

437. Mena-García, A.; Rodríguez-Sánchez, S.; Ruiz-Matute, A.I.; Sanz, M.L. Exploitation of Artichoke Byproducts to Obtain Bioactive Extracts Enriched in Inositols and Caffeoylquinic Acids by Microwave Assisted Extraction. *J. Chromatogr. A*. **2020**, 1613, 460703. doi:10.1016/j.chroma.2019.460703.

438. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radic. Biol. Med*. **1996**, 20, 7, 933–956. doi:10.1016/0891-5849(95)02227-9.

439. Kurita, S.; Kashiwagi, T.; Ebisu, T.; Shimamura, T.; Ukeda, H. Content of Resveratrol and Glycoside and Its Contribution to the Antioxidative Capacity of *Polygonum Cuspidatum* (Itadori) Harvested in Kochi. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2014**, 78, 499–502. doi:10.1080/09168451.2014.890032.

440. Bustanji, Y.; Hudaib, M.; Tawaha, K.; Mohammad, M.K.; Almasri, I.; Hamed, S.; Oran, S. *In Vitro* Xanthine Oxidase Inhibition by Selected Jordanian Medicinal Plants. *Jordan J. Pharm. Sci*. **2011**, 4.

441. Al Hamoui Dit Banni, G.; Nasreddine, R.; Fayad, S.; Cao-Ngoc, P.; Rossi, J.-C.; Leclercq, L.; Cottet, H.; Marchal, A.; Nehmé, R. Screening for Pancreatic Lipase Natural Modulators by Capillary Electrophoresis Hyphenated to Spectrophotometric and Conductometric Dual Detection. *Analyst*. **2021**, 146, 4, 1386–1401, doi:10.1039/D0AN02234A.

442. Al Hamoui Dit Banni, G.; Nasreddine, R.; Fayad, S.; Colas, C.; Marchal, A.; Nehmé, R. Investigation of Lipase-Ligand Interactions in Porcine Pancreatic Extracts by Microscale Thermophoresis. *Anal. Bioanal. Chem*. **2021**, 413, 3667–3681, doi:10.1007/s00216-021-03314-7.

443. Liang, Q.; Gao, X.; Chen, Y.; Hong, K.; Wang, H.-S. Cellular Mechanism of the Nonmonotonic Dose Response of Bisphenol A in Rat Cardiac Myocytes. *Environ. Health Perspect*. **2014**, 122, 601–608. doi:10.1289/ehp.1307491.

444. Vandenberg, L.N. Non-Monotonic Dose Responses in Studies of Endocrine Disrupting Chemicals: Bisphenol A as a Case Study. *Dose-Response*. **2014**, 12, doi:10.2203/dose-response.13-020.

445. Marano, F. Doses Réponses Non Monotones : Un Enjeu Pour l'évaluation Des Risques. Environnement, *Risques Santé*. **2017**, 2, 45.

446. Moulishankar, A.; Ganesan, P.; Elumalai, M.: Lakshmanan, K. Significance of TLC and HPTLC in Phytochemical Screening of Herbal Drugs. *J. Glob. Pharm. Technol*. **2020**. ISSN: 0975 -8542.

447. Senguttuvan, J.; Subramaniam, P. HPTLC Fingerprints of Various Secondary Metabolites in the Traditional Medicinal Herb *Hypochaeris Radicata L. J. Bot*. **2016**, 1–11, doi:10.1155/2016/5429625.

448. Morlock, G.E.; Sabir, G. Comparison of Two Orthogonal Liquid Chromatographic Methods for Quantification of Sugars in Food. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol*. **2011**, 34, 902–919. doi:10.1080/10826076.2011.571118.

449. Massacci, A.; Battistelli, A.; Loreto, F. Effect of Drought Stress on Photosynthetic Characteristics, Growth and Sugar Accumulation of Field-Grown Sweet *Sorghum*. *Funct. Plant Biol*. **1996**, 23, 331. doi:10.1071/PP9960331.

450. Mishra, B.S.; Sharma, M.; Laxmi, A. Role of Sugar and Auxin Crosstalk in Plant Growth and Development. *Physiol. Plant*. **2022**, 174, e13546. doi:10.1111/ppl.13546.

451. Morlock, G.; Morlock, L. Chapter 17 - Applications in Food Analysis. In Instrumental Thin-Layer Chromatography (Second Edition); Poole, C.F., Ed.; *Handbooks Separation Sci.* **2023**; 473–491. ISBN 978-0-323-99970-0.

452. Jug, U.; Glavnik, V.; Kranjc, E.; Vovk, I. HPTLC–Densitometric and HPTLC–MS Methods for Analysis of Flavonoids. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol*. **2018**, 41, 329–341. doi:10.1080/10826076.2018.1448690.

453. Bubueanu, C.; Pavaloiu, R. HPTLC Chromatographic Polyphenolic Fingerprints of Plant Species from Eastern Europe. *Malays. J. Med. Biol. Res*. **2018**, 5, 41–44. doi:10.18034/mjmbr.v5i1.448.

454. De Oliveira, T.B.; Guimarães, T.F.; Kelly, A.M.; Valverde, S.S. Analytical and Chromatographic Parameters Used to Quantify Flavonols and Chlorogenic Acid in *Solidago* Raw Extracts. *Braz. J. Develop*. **2023**, 9, 21545–21557. doi:10.34117/bjdv9n7-024.

455. Kelly, A.M.; Oliveira, T.B. de; Valverde, S.S. Determination of the Metabolic Profile of *Solidago Canadensis* Using UFLC-PDA-ESI-TOF. *Rodriguésia*. **2020**, 71, e01062019. doi:10.1590/2175-7860202071046.

456. Nhiem, N.X.; Van Kiem, P.; Van Minh, C.; Hoai, N.T.; Duc, H.V.; Tai, B.H.; Quang, T.H.; Le Tuan Anh, H.; Yeo, S.-G.; Song, J.-H.; *et al*. Anti-Influenza Sesquiterpene from the Roots of *Reynoutria Japonica*. *Nat. Prod. Commun*. **2014**, 9, 3, 315-318. doi:10.1177/1934578X1400900308.

457. Cheynier, V. Phenolic Compounds: From Plants to Foods. *Phytochem. Rev*. **2012**, 11, 153–177. doi:10.1007/s11101-012-9242-8.

458. Sarker, S.D.; Latif, Z.; Gray, A.I. Natural Product Isolation. In Natural Products Isolation, Humana Press: Totowa, *NJ*, **2005**, 1–25. ISBN 978-1-59259-955-4.

459. Zhang, X.; Thuong, P. T., *et al*. Antioxidant Activity of Anthraquinones and Flavonoids from Flower of *Reynoutria sachalinensis*. *Arch. Pharm. Res.* **2005**, 28, 1, 22-27.

460. Abed, S.A.; Sirat, H.M.; Taher, M. Tyrosinase Inhibition, Anti-Acetylcholinesterase, and Antimicrobial Activities of the Phytochemicals from *Gynotroches Axillaris* Blume. *Pak. J. Pharm. Sci*. **2016**, 8.

461. Vrianty, D.; Qodariah, R.L.; Widowati, W.; Sinaga, A.P.F.; Fibrina, D.; Fachrial, E.; Lister, I.N.E. Comparison of Antioxidant and Anti-Tyrosinase Activities of Pineapple (*Ananas Comosus*) Core Extract and Luteolin Compound. *J. Kedokteran Brawijaya*. **2019**, 30, 240–246. doi:10.21776/ub.jkb.2019.030.04.2.

462. Chung, S.W.; Ha, Y.M.; Kim, Y.J.; Song, S.; Lee, H.; Suh, H.; Chung, H.Y. Inhibitory Effects of 6-(3-Hydroxyphenyl)-2-Naphthol on Tyrosinase Activity and Melanin Synthesis. *Arch. Pharm. Res*. **2009**, 32, 289–294. doi:10.1007/s12272-009-1235-9.

463. Wu, X.; Song, M.; Qiu, P.; Li, F.; Wang, M.; Zheng, J.; Wang, Q.; Xu, F.; Xiao, H. A Metabolite of Nobiletin, 4′-Demethylnobiletin and Atorvastatin Synergistically Inhibits Human Colon Cancer Cell Growth by Inducing G0/G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Food Funct*. **2018**, 9, 87–95. doi:10.1039/C7FO01155E.

464. Thitimuta, S.; Pithayanukul, P.; Nithitanakool, S.; Bavovada, R.; Leanpolchareanchai, J.; Saparpakorn, P. Camellia Sinensis L. Extract and Its Potential Beneficial Effects in Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anti-Hepatotoxic, and Anti-Tyrosinase Activities. *Molecules*. **2017**, 22, 401. doi:10.3390/molecules22030401.

465. Pack, C.S.; Ryu, I.H.; Lee, K.S. Enzymological Evaluation of Oral Inflammation Inhibitory Activity by *Aloe Vera* Peel Extract. Korean *J. Food Sci. Technol*. **2001**, 33, 753–759.

466. Ao, C.; Higa, T.; Ming, H.; Ding, Y.; Tawata, S. Isolation and Identification of Antioxidant and Hyaluronidase Inhibitory Compounds from *Ficus Microcarpa* L. Fil. Bark. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem*. **2010**, 25, 406–413. doi:10.3109/14756360903213473.

467. Kuppusamy, U.R.; Khoo, H.E.; Das, N.P. Structure-Activity Studies of Flavonoids as Inhibitors of Hyaluronidase. *Biochem. Pharmacol*. **1990**, 40, 397–401. doi:10.1016/0006-2952(90)90709-T.

468. Zembower, D.E.; Kam, C.M.; Powers, J.C.; Zalkow, L.H. Novel Anthraquinone Inhibitors of Human Leukocyte Elastase and Cathepsin G. *J. Med. Chem*. **1992**, 35, 1597–1605. doi:10.1021/jm00087a014.

469. Rotondo, S.; Rajtar, G.; Manarini, S.; Celardo, A.; Rotilio, D.; De Gaetano, G.; Evangelista, V.; Cerletti, C. Effect of *Trans*-Resveratrol, a Natural Polyphenolic Compound, on Human Polymorphonuclear Leukocyte Function: *Trans*-Resveratrol and Human PMN Leukocyte Function. *Br. J. Pharm*. **1998**, 123, 1691–1699. doi:10.1038/sj.bjp.0701784.

470. Tsai, Y.-F.; Chen, C.-Y.; Chang, W.-Y.; Syu, Y.-T.; Hwang, T.-L. Resveratrol Suppresses Neutrophil Activation *via* Inhibition of Src Family Kinases to Attenuate Lung Injury. *Free Radic. Biol. Med*. **2019**, 145, 67–77. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.021.

471. Sun, C.; Hu, Y.; Guo, T.; Wang, H.; Zhang, X.; He, W.; Tan, H. Resveratrol as a Novel Agent for Treatment of Multiple Myeloma with Matrix Metalloproteinase Inhibitory Activity. *Acta Pharmacol. Sin*. **2006**, 27, 1447–1452. doi:10.1111/j.1745-7254.2006.00343.x.

472. Lee, K.; Lee, J.-S.; Jang, H.-J.; Kim, S.-M.; Chang, M.S.; Park, S.H.; Kim, K.S.; Bae, J.; Park, J.-W.; Lee, B.; *et al*. Chlorogenic Acid Ameliorates Brain Damage and Edema by Inhibiting Matrix Metalloproteinase-2 and 9 in a Rat Model of Focal Cerebral Ischemia. *Eur. J. Pharm*. **2012**, 689, 89–95. doi:10.1016/j.ejphar.2012.05.028.

473. Boo, Y.C. Human Skin Lightening Efficacy of Resveratrol and Its Analogs: From *in Vitro* Studies to Cosmetic Applications. *Antioxidants*. **2019**, 8, 332. doi:10.3390/antiox8090332.

474. Hsu, K.-D.; Chan, Y.-H.; Chen, H.-J.; Lin, S.-P.; Cheng, K.-C. Tyrosinase-Based TLC Autography for Anti-Melanogenic Drug Screening. *Sci. Rep*. **2018**, 8, 401. doi:10.1038/s41598-017-18720-0.

475. Papaemmanouil, C.D.; Peña-García, J.; Banegas-Luna, A.J.; Kostagianni, A.D.; Gerothanassis, I.P.; Pérez-Sánchez, H.; Tzakos, A.G. ANTIAGE-DB: A Database and Server for the Prediction of Anti-Aging Compounds Targeting Elastase, Hyaluronidase, and Tyrosinase. *Antioxidants*. **2022**, 11, 2268. doi:10.3390/antiox11112268.

476. Bralley, E. Nutraceutical Properties of Muscadine Grape (*Vitis rotundifolia*), *Sorghum bicolor*, and *Polygonum cuspidatum*. Ph.D. Thesis, University of Georgia, Athens, GA, USA, 2007.

477. Wittenauer, J.; Mäckle, S.; Sußmann, D.; Schweiggert-Weisz, U.; Carle, R. Inhibitory Effects of Polyphenols from Grape Pomace Extract on Collagenase and Elastase Activity. *Fitoterapia*. **2015**, 101, 179–187. doi:10.1016/j.fitote.2015.01.005.

478. Brás, N.F.; Gonçalves, R.; Mateus, N.; Fernandes, P.A.; Ramos, M.J.; de Freitas, V. Inhibition of Pancreatic Elastase by Polyphenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem*. **2010**, 58, 10668–10676. doi:10.1021/jf1017934.

479. Alperth, F.; Melinz, L.; Fladerer, J.-P.; Bucar, F. UHPLC Analysis of *Reynoutria Japonica* Houtt. Rhizome Preparations Regarding Stilbene and Anthranoid Composition and Their Antimycobacterial Activity Evaluation. *Plants*. **2021**, 10, 1809. doi:10.3390/plants10091809.

480. Zhang, J.; Zhou, L.; Zhang, P.; Liu, T.; Yang, G.; Lin, R.; Zhou, J. Extraction of Polydatin and Resveratrol from *Polygonum Cuspidatum* Root: Kinetics and Modeling. *Food Bioprod. Process*. **2015**, 94, 518–524. doi:10.1016/j.fbp.2014.07.011.

481. Békési-Kallenberger, H.; Horváth, G.; Bencsik, T.; Balázs, V.L.; Filep, R.; Papp, N. Comparative Histological and Phytochemical Study of *Fallopia* Species. *Nat. Prod. Comm*. **2016**, 11, 1934578X1601100. doi:10.1177/1934578X1601100229.

482. Wang, D.-G.; Liu, W.-Y.; Chen, G.-T. A Simple Method for the Isolation and Purification of Resveratrol from *Polygonum Cuspidatum*. J. Pharm. Anal. **2013**, 3, 241–247. doi:10.1016/j.jpha.2012.12.001.

483. Hynstova, V.; Sterbova, D.; Klejdus, B.; Hedbavny, J.; Huska, D.; Adam, V. Separation, Identification and Quantification of Carotenoids and Chlorophylls in Dietary Supplements Containing *Chlorella Vulgaris* and *Spirulina Platensis* Using High Performance Thin Layer Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **2017**, 148, 108–118, doi:10.1016/j.jpba.2017.09.018.

484. Mei, B.; Xie, H.; Xing, H.; Kong, D.; Pan, X.; Li, Y.; Wu, H. Changes of Phenolic Acids and Antioxidant Activities in Diploid and Tetraploid *Echinacea Purpurea* at Different Growth Stages. *Rev. Bras. Farmacogn*. **2020**, 30, 510–518. doi:10.1007/s43450-020-00069-7.

485. Pérez-Ochoa, M.L.; Vera-Guzmán, A.M.; Mondragón-Chaparro, D.M.; Sandoval-Torres, S.; Carrillo-Rodríguez, J.C.; Chávez-Servia, J.L. Effects of Growth Conditions on Phenolic Composition and Antioxidant Activity in the Medicinal Plant *Ageratina Petiolaris* (*Asteraceae*). *Diversity*. **2022**, 14, 595. doi:10.3390/d14080595.

486. El-Nashar, H.A.S.; El-Din, M.I.G.; Hritcu, L.; Eldahshan, O.A. Insights on the Inhibitory Power of Flavonoids on Tyrosinase Activity: A Survey from 2016 to 2021. *Molecules*. **2021**, 26, 7546. doi:10.3390/molecules26247546.

487. Bahadır Acıkara, Ö.; Ilhan, M.; Kurtul, E.; Šmejkal, K.; Küpeli Akkol, E. Inhibitory Activity of *Podospermum Canum* and Its Active Components on Collagenase, Elastase and Hyaluronidase Enzymes. *Bioorg. Chem*. **2019**, 93, 103330. doi:10.1016/j.bioorg.2019.103330.

488. Kim, H.H.; Kim, J.K.; Kim, J.; Jung, S.-H.; Lee, K. Characterization of Caffeoylquinic Acids from *Lepisorus Thunbergianus* and Their Melanogenesis Inhibitory Activity. *ACS Omega*. **2020**, 5, 30946–30955. doi:10.1021/acsomega.0c03752.

489. Bessada, S.M.F.; Barreira, J.C.M.; Oliveira, M.B.P.P. *Asteraceae* Species with Most Prominent Bioactivity and Their Potential Applications: A Review. *Ind. Crops Prod*. **2015**, 76, 604–615. doi:10.1016/j.indcrop.2015.07.073.

490. Oh, J.H.; Karadeniz, F.; Kong, C.-S.; Seo, Y. Antiphotoaging Effect of 3,5-Dicaffeoyl-Epi-Quinic Acid against UVA-Induced Skin Damage by Protecting Human Dermal Fibroblasts *In Vitro*. *Int. J. Mass Spectrom*. **2020**, 21, 7756. doi:10.3390/ijms21207756.

491. Oh, J.; Karadeniz, F.; Lee, J.; Seo, Y.; Kong, C. Protective Effect of 3,5-dicaffeoyl-epi-quinic Acid against UVB-induced Photoaging in Human HaCaT Keratinocytes. *Mol. Med. Report*. **2019**. doi:10.3892/mmr.2019.10258.

492. Panichakul, T.; Ponnikorn, S.; Tupchiangmai, W.; Haritakun, W.; Srisanga, K. Skin Anti-Aging Potential of *Ipomoea Pes-Caprae* Ethanolic Extracts on Promoting Cell Proliferation and Collagen Production in Human Fibroblasts (CCD-986sk Cells). *Pharmaceuticals*. **2022**, 15, 969. doi:10.3390/ph15080969.

493. Li, R.; Tao, M.; Wu, T.; Zhuo, Z.; Xu, T.; Pan, S.; Xu, X. A Promising Strategy for Investigating the Anti-Aging Effect of Natural Compounds: A Case Study of Caffeoylquinic Acids. *Food Funct*. **2021**, 12, 8583–8593. doi:10.1039/D1FO01383A.

494. Oh, J. H. ; Lee, J. I. *et al*. Antiphotoaging Effects of 3,5-Dicaffeoyl-epi-quinic Acid via Inhibition of Matrix Metalloproteinases in UVB-Irradiated Human Keratinocytes. *Evid-Based Complementary Altern. Med*. **2020**, ID 8949272, 10. https://doi.org/10.1155/2020/8949272.

495. Marijan, M.; Tomić, D.; Strawa, J.W.; Jakupović, L.; Inić, S.; Jug, M.; Tomczyk, M.; Zovko Končić, M. Optimization of Cyclodextrin-Assisted Extraction of Phenolics from *Helichrysum Italicum* for Preparation of Extracts with Anti-Elastase and Anti-Collagenase Properties. *Metabolites*. **2023**, 13, 257. doi:10.3390/metabo13020257.

496. Gourguillon, L.; Destandau, E.; Lobstein, A.; Lesellier, E. Comparaison de différentes méthodes d'extraction d'acides dicaféoylquiniques à partir d'une plante halophile. *Comptes Rendus Chimie*. **2016**, 19, 9, 1133–1141, doi:10.1016/j.crci.2016.03.009.

497. Riffault, L.; Destandau, E.; Pasquier, L.; André, P.; Elfakir, C. Phytochemical Analysis of *Rosa Hybrida Cv*. 'Jardin de Granville' by HPTLC, HPLC-DAD and HPLC-ESI-HRMS: Polyphenolic Fingerprints of Six Plant Organs. *Phytochemistry*. **2014**, 99, 127–134. doi:10.1016/j.phytochem.2013.12.015.

498. Alnukari, S. S. Anti-Lipase Activity of *Rosa Damascena* Extracts. *Egypt. J. Chem*. **2019**, 63, 3, 861-865. doi:10.21608/ejchem.2019.10388.1686.

499. Martinez-Gonzalez, A.I.; Díaz-Sánchez, Á.G.; Rosa, L.A. de la; Vargas-Requena, C.L.; Bustos-Jaimes, I.; Alvarez-Parrilla, and E. Polyphenolic Compounds and Digestive Enzymes: *In Vitro* Non-Covalent Interactions. *Molecules*. **2017**, 22, 4, 669. doi:10.3390/molecules22040669.

500. Clifford, M.N.; Knight, S.; Kuhnert, N. Discriminating between the Six Isomers of Dicaffeoylquinic Acid by LC-MS^n . *J. Agric. Food Chem*. **2005**, 53, 10, 3821–3832, doi:10.1021/jf050046h.

501. Zheleva-Dimitrova, D.; Gevrenova, R.; Zaharieva, M.M.; Najdenski, H.; Ruseva, S.; Lozanov, V.; Balabanova, V.; Yagi, S.; Momekov, G.; Mitev, V. HPLC-UV and LC-MS Analyses of Acylquinic Acids in *Geigeria Alata* (DC) Oliv. & Hiern. and Their Contribution to Antioxidant and Antimicrobial Capacity. *Phytochem. Anal*. **2017**, 28, 3, 176–184. doi:10.1002/pca.2658.

502. Wu, D.; Duan, R.; Tang, L.; Hu, X.; Geng, F.; Sun, Q.; Zhang, Y.; Li, H. Binding Mechanism and Functional Evaluation of Quercetin 3-Rhamnoside on Lipase. *Food Chem*. **2021**, 359, 129960. doi:10.1016/j.foodchem.2021.129960.

503. Worsztynowicz, P.; Napierała, M.; Białas, W.; Grajek, W.; Olkowicz, M. Pancreatic α-Amylase and Lipase Inhibitory Activity of Polyphenolic Compounds Present in the Extract of Black Chokeberry (*Aronia Melanocarpa* L.). *Process Biochem*. **2014**, 49, 9, 1457–1463. doi:10.1016/j.procbio.2014.06.002.

504. Narita, Y.; Inouye, K. Inhibitory Effects of Chlorogenic Acids from Green Coffee Beans and Cinnamate Derivatives on the Activity of Porcine Pancreas α-Amylase Isozyme I. *Food Chem*. **2011**, 127, 4, 1532–1539. doi:10.1016/j.foodchem.2011.02.013.

505. Hu, B.; Cui, F.; Yin, F.; Zeng, X.; Sun, Y.; Li, Y. Caffeoylquinic Acids Competitively Inhibit Pancreatic Lipase through Binding to the Catalytic Triad. *Int. J. Biol. Macromol*. **2015**, 80, 529–535. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.07.031.

506. Li, Y.-Q.; Yang, P.; Gao, F.; Zhang, Z.-W.; Wu, B. Probing the Interaction between 3 Flavonoids and Pancreatic Lipase by Methods of Fluorescence Spectroscopy and Enzymatic Kinetics. *Eur. Food Res. Technol*. **2011**, 233, 1, 63–69. doi:10.1007/s00217-011-1491-z.

507. Weremfo, A.; Adulley, F.; Adarkwah-Yiadom, M. Simultaneous Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Avocado (*Persea americana* Mill.) Seeds Using Response Surface Methodology. J. Anal. Methods Chem. 2020, ID 7541927, 11. https://doi.org/10.1155/2020/7541927.

508. Mendes, M.; Carvalho, A.P.; Magalhães, J.M.C.S.; Moreira, M.; Guido, L.; Gomes, A.M.; Delerue-Matos, C. Response Surface Evaluation of Microwave-Assisted Extraction Conditions for *Lycium Barbarum* Bioactive Compounds. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*. **2016**, 33, 319–326. doi:10.1016/j.ifset.2015.12.025.

509. Milutinović, M.; Radovanović, N.; Ćorović, M.; Šiler-Marinković, S.; Rajilić-Stojanović, M.; Dimitrijević-Branković, S. Optimisation of Microwave-Assisted Extraction Parameters for Antioxidants from Waste *Achillea Millefolium* Dust. *Ind. Crops Prod*. **2015**, 77, 333–341. doi:10.1016/j.indcrop.2015.09.007.

510. Xu, W.; Zhu, G.; Song, C.; Hu, S.; Li, Z. Optimization of Microwave Vacuum Drying and Pretreatment Methods for *Polygonum Cuspidatum*. *Math. Probl. Eng*. **2018**, 1–11. doi:10.1155/2018/4967356.

511. Zhang, H.-F.; Yang, X.-H.; Wang, Y. Microwave Assisted Extraction of Secondary Metabolites from Plants: Current Status and Future Directions. *Trends Food Sci. Technol*. **2011**, 22, 672–688. doi:10.1016/j.tifs.2011.07.003.

512. Granados-Vallejo, M.; Arriola-Guevara, E.; Corona-González, R.I.; Flores-Méndez, D.A.; Padilla-de La Rosa, J.D.; Esquivel-Solis, H.; Pelayo-Ortiz, C.; Guatemala-Morales, G.M. Optimization of 5-CQA Extraction Conditions from Green Coffee By-Product (*Coffea Arabica*) Using a Response-Surface Design and the Study of Its Extraction Kinetics. *Molecules*. **2022**, 27, 5704. doi:10.3390/molecules27175704.

513. Diemer, E.; Chadni, M.; Grimi, N.; Ioannou, I. Optimization of the Accelerated Solvent Extraction of Caffeoylquinic Acids from Forced Chicory Roots and Antioxidant Activity of the Resulting Extracts. *Foods*. **2022**, 11, 3214. doi:10.3390/foods11203214.

514. Lopes, G.R.; Passos, C.P.; Rodrigues, C.; Teixeira, J.A.; Coimbra, M.A. Impact of Microwave-Assisted Extraction on Roasted Coffee Carbohydrates, Caffeine, Chlorogenic Acids and Coloured Compounds. *Food Res. Int*. **2020**, 129, 108864. doi:10.1016/j.foodres.2019.108864.

515. Pimentel-Moral, S.; Borrás-Linares, I.; Lozano-Sánchez, J.; Arráez-Román, D.; Martínez-Férez, A.; Segura-Carretero, A. Microwave-Assisted Extraction for *Hibiscus Sabdariffa* Bioactive Compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **2018**, 156, 313–322. doi:10.1016/j.jpba.2018.04.050.

516. Chadni, M.; Isidore, E.; Diemer, E.; Ouguir, O.; Brunois, F.; Catteau, R.; Cassan, L.; Ioannou, I. Optimization of Extraction Conditions to Improve Chlorogenic Acid Content and Antioxidant Activity of Extracts from Forced Witloof Chicory Roots. *Foods*. **2022**, 11, 1217. doi:10.3390/foods11091217.

517. Ciulca, S.; Roma, G.; Alexa, E.; Radulov, I.; Cocan, I.; Madosa, E.; Ciulca, A. Variation of Polyphenol Content and Antioxidant Activity in Some Bilberry (*Vaccinium Myrtillus L.*) Populations from Romania. *Agronomy*. **2021**, 11, 2557. doi:10.3390/agronomy11122557.

518. Wieczorek, P.P.; Hudz, N.; Yezerska, O.; Horčinová-Sedláčková, V.; Shanaida, M.; Korytniuk, O.; Jasicka-Misiak, I. Chemical Variability and Pharmacological Potential of Propolis as a Source for the Development of New Pharmaceutical Products. *Molecules*. **2022**, 27, 1600. doi:10.3390/molecules27051600.

519. Bielecka, A.; Królak, E. *Solidago Canadensis* as a Bioaccumulator and Phytoremediator of Pb and Zn. *Environ. Sci. Pollut. Res*. **2019**, 26, 36942–36951. doi:10.1007/s11356-019-06690-x.

520. Bae, J.; Benoit, D.L.; Watson, A.K. Effect of Heavy Metals on Seed Germination and Seedling Growth of Common Ragweed and Roadside Ground Cover Legumes. *Env. Pollut*. **2016**, 213, 112–118. doi:10.1016/j.envpol.2015.11.041.

521. Murai, Y.; Setoguchi, H.; Kitajima, J.; Iwashina, T. Altitudinal Variation of Flavonoid Content in the Leaves of *Fallopia Japonica* and the Needles of *Larix Kaempferi* on Mt. Fuji. *Nat. Prod. Comm*. **2015**, 10, 1934578X1501000. doi:10.1177/1934578X1501000308.

522. Hashim, A.M.; Alharbi, B.M.; Abdulmajeed, A.M.; Elkelish, A.; Hozzein, W.N.; Hassan, H.M. Oxidative Stress Responses of Some Endemic Plants to High Altitudes by Intensifying Antioxidants and Secondary Metabolites Content. *Plants*. **2020**, 9, 869. doi:10.3390/plants9070869.

523. Móricz, Á.M.; Ott, P.G.; Krüzselyi, D.; Baglyas, M.; Morlock, G.E. High-Performance Thin-Layer Chromatography–Direct Bioautography Combined with Chemometrics for the Distinction of Goldenrod Species. *J Planar. Chromat*. **2022**, 35, 339–344. doi:10.1007/s00764-022-00159-3.

524. Beerling, D.J.; Huntley, B.; Bailey, J.P. Climate and the Distribution of *Fallopia Japonica* : Use of an Introduced Species to Test the Predictive Capacity of Response Surfaces. *J Veget. Sci*. **1995**, 6, 269–282. doi:10.2307/3236222.

525. Park, J. H?; Moon, H. K.; Park, C. W. Flavonoid Chemestry of *Fallopia* sect. *Reynoutria* (*Polygonaceae*) in *Korea. Korean J. Pl. Taxon*. **2011**.

526. Machino, S.; Nagano, S.; Hikosaka, K. The Latitudinal and Altitudinal Variations in the Biochemical Mechanisms of Temperature Dependence of Photosynthesis within *Fallopia Japonica*. *Env. Exp. Bot*. **2021**, 181, 104248. doi:10.1016/j.envexpbot.2020.104248.

527. Sakata, T.; Nakano, T.; Kachi, N. Effects of Internal Conductance and Rubisco on the Optimum Temperature for Leaf Photosynthesis in *Fallopia Japonica* Growing at Different Altitudes. *Ecol. Res*. **2015**, 30, 163–171. doi:10.1007/s11284-014-1223-5.

528. Cucu, A.-A.; Bobiș, O.; Bonta, V.; Moise, A.; Pașca, C.; Cornea-Cipcigan, M.; Mărgăoan, R.; Dezsi, Ștefan; Botezan, S.; Baciu, E.-D.; *et al*. Unraveling the Physicochemical, Nutritional and Antioxidant Properties of the Honey Produced from the *Fallopia Japonica* Plant. *Foods*. **2024**, 13, 1959. doi:10.3390/foods13131959.

529. Jasicka-Misiak, I.; Makowicz, E.; Stanek, N. Chromatographic Fingerprint, Antioxidant Activity, and Colour Characteristic of Polish Goldenrod (*Solidago Virgaurea L.*) Honey and Flower. *Eur. Food Res. Technol*. **2018**, 244, 1169–1184. doi:10.1007/s00217-018-3034-3.

530. Males, Z.; Medic-Saric, M.; Bucar, F. Flavonoids of *Guiera Senegalensis* J. F. GMEL. Thin-Layer Chromatography and Numerical Methods. *Croat. Chem. Acta*. **1998**, 11, 69–79.

531. Plainfosse, H. Recherche et développement d'ingrédients cosmétiques innovants favorisant la réparation cutanée à partir de matières premières naturelles d'origine méditerranéenne. *Chimie analytique*. COMUE Université Côte d'Azur. 2019.

532. Sun, Y.; Beuchat, C.; Müller-Schärer, H. Is biocontrol efficacy rather driven by the plant or the antagonist genotypes? A conceptual bioassay approach. *NeoBiota*. **2020**, 63, 81-100. doi: 10.3897/neobiota.63.54962.

533. Messaili, S.; Colas, C.; Fougère, L.; Destandau, E. Combination of Molecular Network and Centrifugal Partition Chromatography Fractionation for Targeting and Identifying *Artemisia Annua* L. Antioxidant Compounds. *J. Chrom. A*. **2020**, 1615, 460785. doi:10.1016/j.chroma.2019.460785.

534. Tagliazucchi, D.; Verzelloni, E.; Bertolini, D.; Conte, A. *In Vitro* Bio-Accessibility and Antioxidant Activity of Grape Polyphenols. *Food Chem*. **2010**, 120, 599–606. doi:10.1016/j.foodchem.2009.10.030.

535. Apak, R.; Güçlü, K.; Özyürek, M.; Karademir, S.E. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food Chem*. **2004**, 52, 26, 7970–7981, doi:10.1021/jf048741x.

536. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay. *Anal. Biochem*. **1996**, 239, 1, 70–76, doi:10.1006/abio.1996.0292.

537. Dinis, T.C.P.; Madeira, V.M.C.; Almeida, L.M. Action of Phenolic Derivatives (Acetaminophen, Salicylate, and 5-Aminosalicylate) as Inhibitors of Membrane Lipid Peroxidation and as Peroxyl Radical Scavengers. *Arch. Biochem. Biophys*. **1994**, 315, 1, 161–169, doi:10.1006/abbi.1994.1485.

538. Nehmé, R.; Nasreddine, R.; Orlic, L.; Lopin-Bon, C.; Hamacek, J.; Piazza, F. Kinetic Theory of Hyaluronan Cleavage by Bovine Testicular Hyaluronidase in Standard and Crowded Environments. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj*. **2021**, 7, 129837. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129837.

539. Cao-Ngoc, P.; Leclercq, L.; Rossi, J.-C.; Hertzog, J.; Tixier, A.-S.; Chemat, F.; Nasreddine, R.; Al Hamoui Dit Banni, G.; Nehmé, R.; Schmitt-Kopplin, P.; *et al*. Water-Based Extraction of Bioactive Principles from Blackcurrant Leaves and *Chrysanthellum Americanum*: A Comparative Study. *Foods*. **2020**, 9, 1478. doi:10.3390/foods9101478.

540. Lim, Y.-J.; Lee, E.H.; Kang, T.H.; Ha, S.K.; Oh, M.S.; Kim, S.M.; Yoon, T.-J.; Kang, C.; Park, J.-H.; Kim, S.Y. Inhibitory Effects of Arbutin on Melanin Biosynthesis of *α*-Melanocyte Stimulating Hormone-Induced Hyperpigmentation in Cultured Brownish Guinea Pig Skin Tissues. *Arch. Pharm. Res*. **2009**, 32, 367–373. doi:10.1007/s12272-009-1309-8.

541. Chandana, N.G.A.S.S.; Morlock, G.E. Comprehensive Bioanalytical Multi-Imaging by Planar Chromatography in Situ Combined with Biological and Biochemical Assays Highlights Bioactive Fatty Acids in Abelmosk. *Talanta*. **2021**, 223, 121701. doi:10.1016/j.talanta.2020.121701.

542. Lefebvre, T.; Destandau, E.; Lesellier, E. Selective Extraction of Bioactive Compounds from Plants Using Recent Extraction Techniques: A Review. *J. Chrom. A*. **2021**, 1635, 461770. doi:10.1016/j.chroma.2020.461770.

543. Turkalj, M.; Banic, I.; Anzic, S. A. A review of clinical efficacy, safety, new developments and adherence to allergen-specific immunotherapy in patients with allergic rhinitis caused by allergy to ragweed pollen (*Ambrosia artemisiifolia*). *Patient Pref. Adher*. **2017**.

RESUME

La valorisation des espèces végétales exotiques envahissantes (EVEE) peut représenter une solution permettant de concilier les enjeux de conservation de la biodiversité et le développement économique à l'échelle du territoire. C'est dans ce contexte et dans une démarche d'économie circulaire que ces travaux de thèse visent à explorer le potentiel de valorisation chimique de trois EVEE (*Fallopia japonica, Ambrosia artemisiifolia* et *Solidago canadensis*). Toutes trois sont problématiques sur le territoire Savoie Mont Blanc avec des impacts négatifs environnementaux, socio-économiques, sanitaires et sur la sécurité. Ces espèces végétales renferment par ailleurs des molécules variées leur conférant des propriétés biologiques et thérapeutiques d'intérêt pour l'Homme. Le domaine cosmétique et santé étant particulièrement demandeur de produits naturels innovants à l'efficacité démontrée, des valorisations dermo-cosmétiques et nutraceutiques ont été envisagées pour ces plantes. L'idée complémentaire était d'utiliser une approche chimique plus respectueuse de l'Homme et de l'environnement *via* la mise œuvre de techniques et solvants d'extraction respectant les principes de la chimie verte pour l'obtention d'ingrédients actifs naturels. La plupart des activités biologiques ciblées pour ces travaux n'avaient pas été évaluées auparavant, pouvant ouvrir à de nouvelles alternatives de gestion pour ces trois EVEE de Savoie et Haute-Savoie. Une meilleure connaissance des matières végétales était de plus indispensable. Ces travaux ont alors permis la mise en place d'une méthodologie fiable utilisant des outils performants pour le criblage et l'évaluation des activités biologiques des extraits d'EVEE. Les compositions phytochimiques de ces derniers ont pu être étudiées et les principaux actifs caractérisés. Des relations « structure-activité » ont pu être mises en évidence. Les paramètres pouvant impacter les compositions chimiques globales et polyphénoliques des plantes ainsi que les teneurs en molécules actives ont également été examinées et discutées.

Mots clés : Espèces végétale exotiques envahissantes, valorisation chimique, extraction éco-responsable, alternative de gestion durable, ingrédients dermo-cosmétiques, ingrédients nutraceutiques, variabilité polyphénolique.

ABSTRACT

The valorization of invasive alien plant species (EVEE) can represent a solution to reconcile the issues of biodiversity conservation and economic development on a territorial scale. It is in this context and within a circular economy approach that this thesis work aims to explore the potential for chemical valorization of three EVEEs (*Fallopia japonica*, *Ambrosia artemisiifolia* and *Solidago canadensis*). All three are problematic in the Savoie Mont Blanc territory with negative environmental, socio-economic, health and safety impacts. These plant species also contain various molecules giving them biological and therapeutic properties of interest to humans. As the cosmetics and health sector is particularly demanding of innovative natural products with demonstrated effectiveness, dermo-cosmetic and nutraceutical developments have been considered for these plants. The complementary idea was to use a chemical approach that is more respectful of humans and the environment through the implementation of extraction techniques and solvents respecting the principles of green chemistry to obtain natural active ingredients. Most of the biological activities targeted for this work had not been previously evaluated, which could open up new management alternatives for these three EVEE in Savoie and Haute-Savoie. A better knowledge of plant materials was also essential. This work then allowed the establishment of a reliable methodology using efficient tools for screening and evaluating the biological activities of EVEE extracts. The phytochemical compositions of plant extracts could be studied and the main active ingredients characterized. "Structure-activity" relationships could be highlighted. The parameters that can impact the overall chemical and polyphenolic compositions of plants as well as the contents of active molecules were also examined and discussed.

Keywords: Invasive alien plant species, chemical valorization, eco-responsible extraction, sustainable management alternative, dermo-cosmetic ingredients, nutraceutical ingredients, polyphenolic variability.