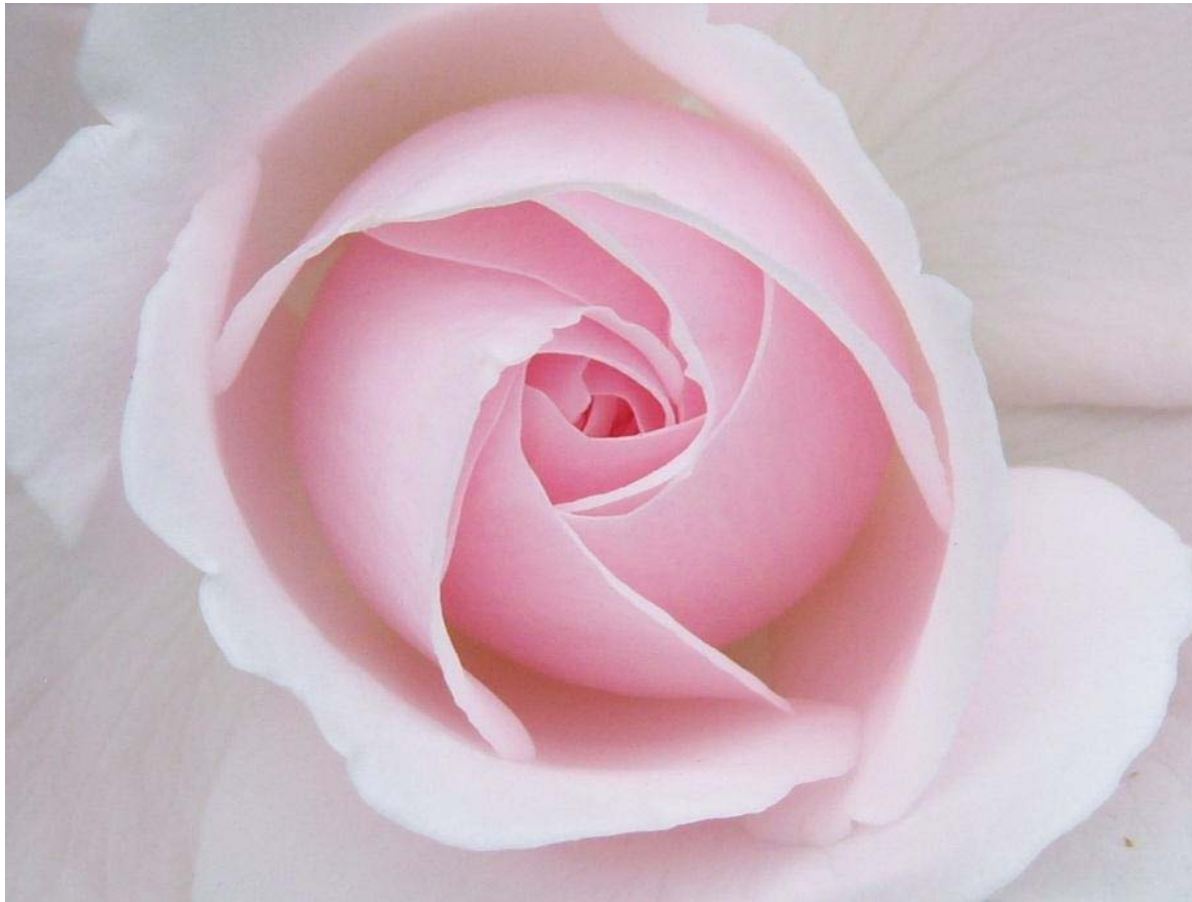


Recherche de marqueurs phytochimiques chez la variété de rose 'Jardin de Granville' Etude comparative par HPTLC et HPLC



6 Décembre 2012 - Ludivine RIFFAULT

Le projet

Sélection d'une variété pour ses propriétés physiques et biologiques par les Parfums Christian Dior pour être intégrée dans une gamme de produits de luxe.



'Jardin de Granville'

- Variété inédite
- Apparence remarquable
- Très résistante aux maladies
- Activité biologique favorable à l'utilisation en cosmétique

But : apporter les preuves moléculaires de son caractère unique.

⇒ Recherche de marqueurs phytochimiques spécifiques.

Screening complet de la plante

Comparaison à d'autres variétés de rose

Les variétés étudiées

'John Clare' (mère de JDG)



'Annapurna' (père de JDG)



'Jardin de Granville'



Rosa damascena x bifer



'Sir Cedric Morris'



Les organes étudiés

- Bois de taille d'hiver – février
5 variétés
- Jeunes pousses - début avril
5 variétés
- Boutons (précoces et avant éclosion) – mai
- Fleurs - fin mai/début juin
- Feuilles - fin juin



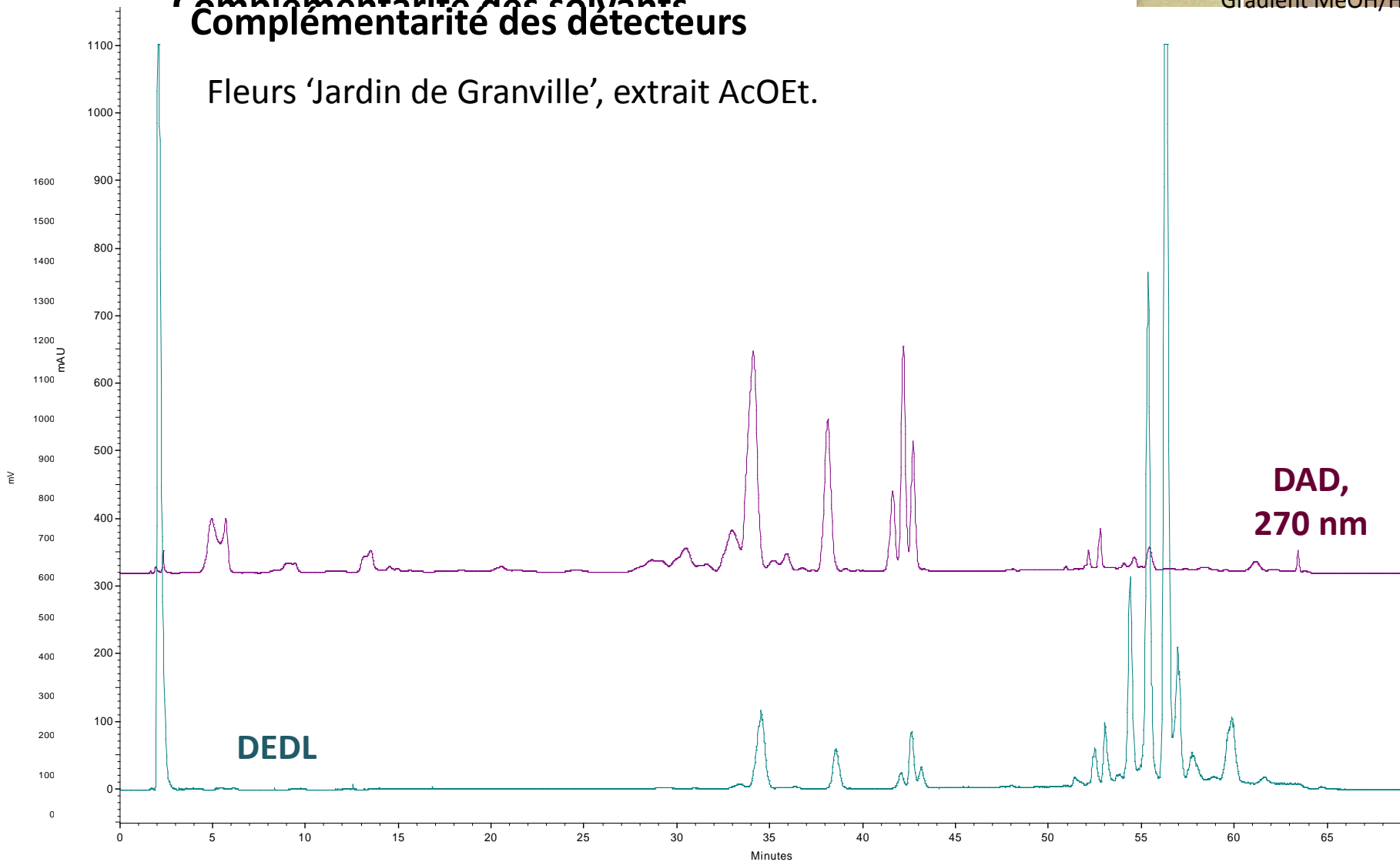
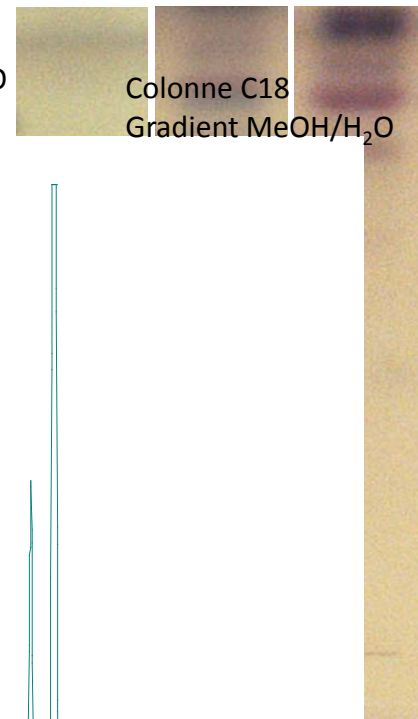
Complémentarité des solvants

Complémentarité des détecteurs

Fleurs 'Jardin de Granville', extrait AcOEt.

silice
MeOH/H₂O

Colonne C18
Gradient MeOH/H₂O



**DAD,
270 nm**

DEDL

Résultats

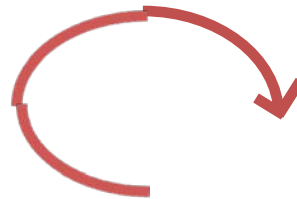
2 axes d'analyse :

- ① - Etude approfondie de 'Jardin de Granville'
Comparaison des différents organes
⇒ observer l'évolution du contenu moléculaire de la plante au cours de son développement

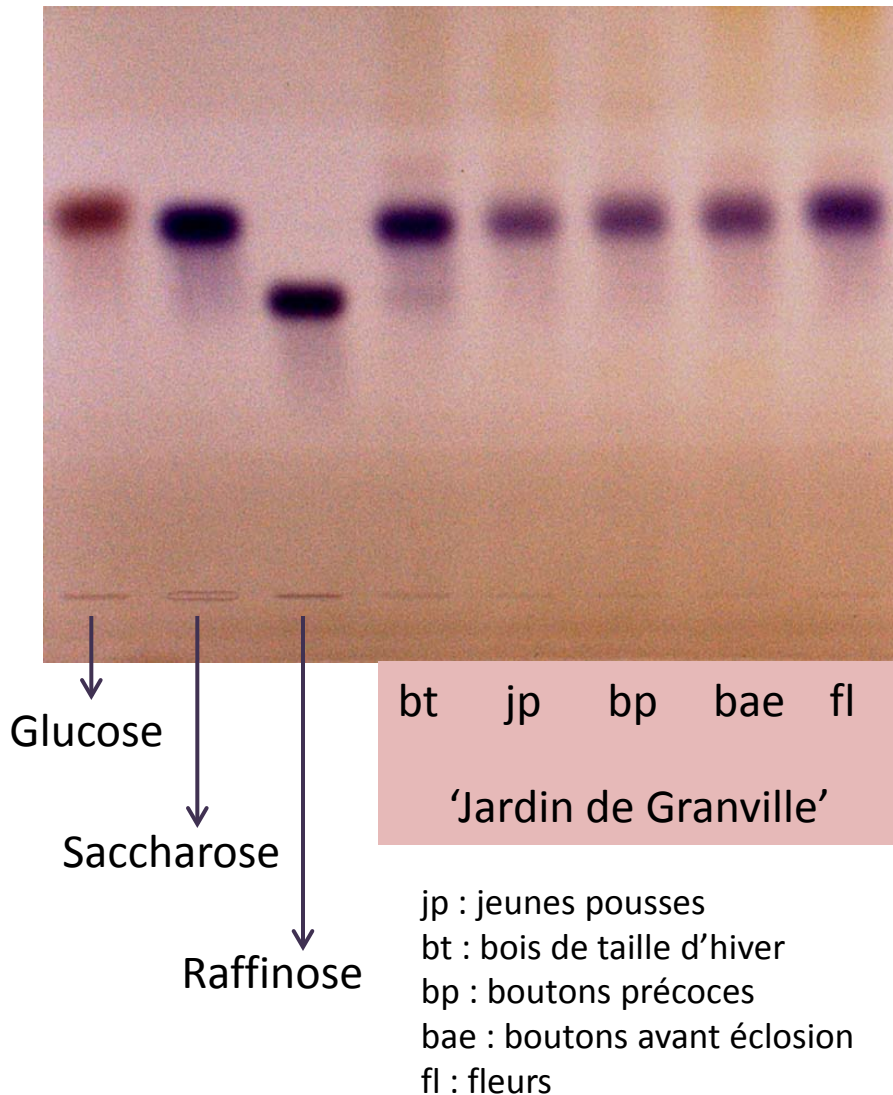
- ② - Etude des différents organes des autres variétés
Comparaison des variétés entre elles
⇒ trouver des marqueurs spécifiques à 'Jardin de Granville'

Besoin de l'outil statistique pour faire parler toutes ces données.

① Etude des différents organes de 'Jardin de Granville'



Comparaison des organes de 'Jardin de Granville' par HPTLC



Partie Polaire

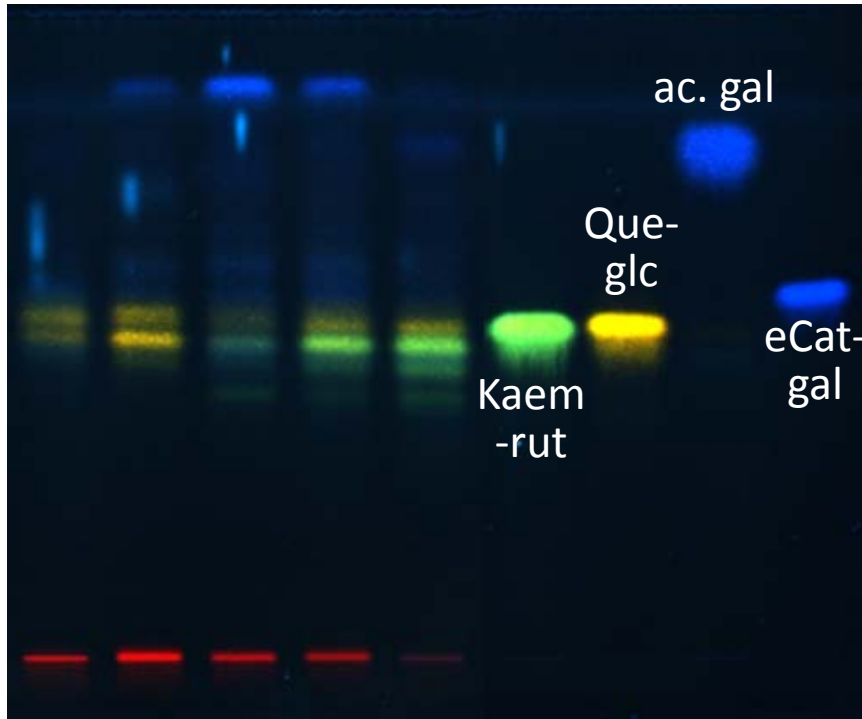
Révélation des sucres
Extraits EtOH/H₂O

Plaque silice, AcOEt/acide propanolique/H₂O/CH₃COOH

Visible + Molisch + vanilline sulfurique

- Profils similaires des organes
- Majorité de monosaccharides et disaccharides.
- Quelques trisaccharides

Comparaison des organes de 'Jardin de Granville' par HPTLC



bt jp bp bae fl

'Jardin de Granville'

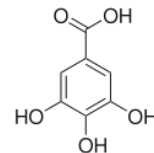
jp : jeunes pousses
 bt : bois de taille d'hiver
 bp : boutons précoces
 bae : boutons avant éclosion
 fl : fleurs

Partie Polaire

Révélation des polyphénols
 Extraits EtOH/H₂O

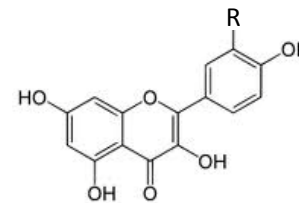
Plaque silice RP18
 ACN/H₂O/HCOOH
 366 nm + Neu + PEG

Présence de tanins :
 fluorescence bleue.



Acide gallique

Présence de dérivés
 de kaempférol :
 fluorescence verte.



R = H, Kaempférol
 R=OH, Quercétine

Présence de dérivés
 de quercétine :
 fluorescence jaune

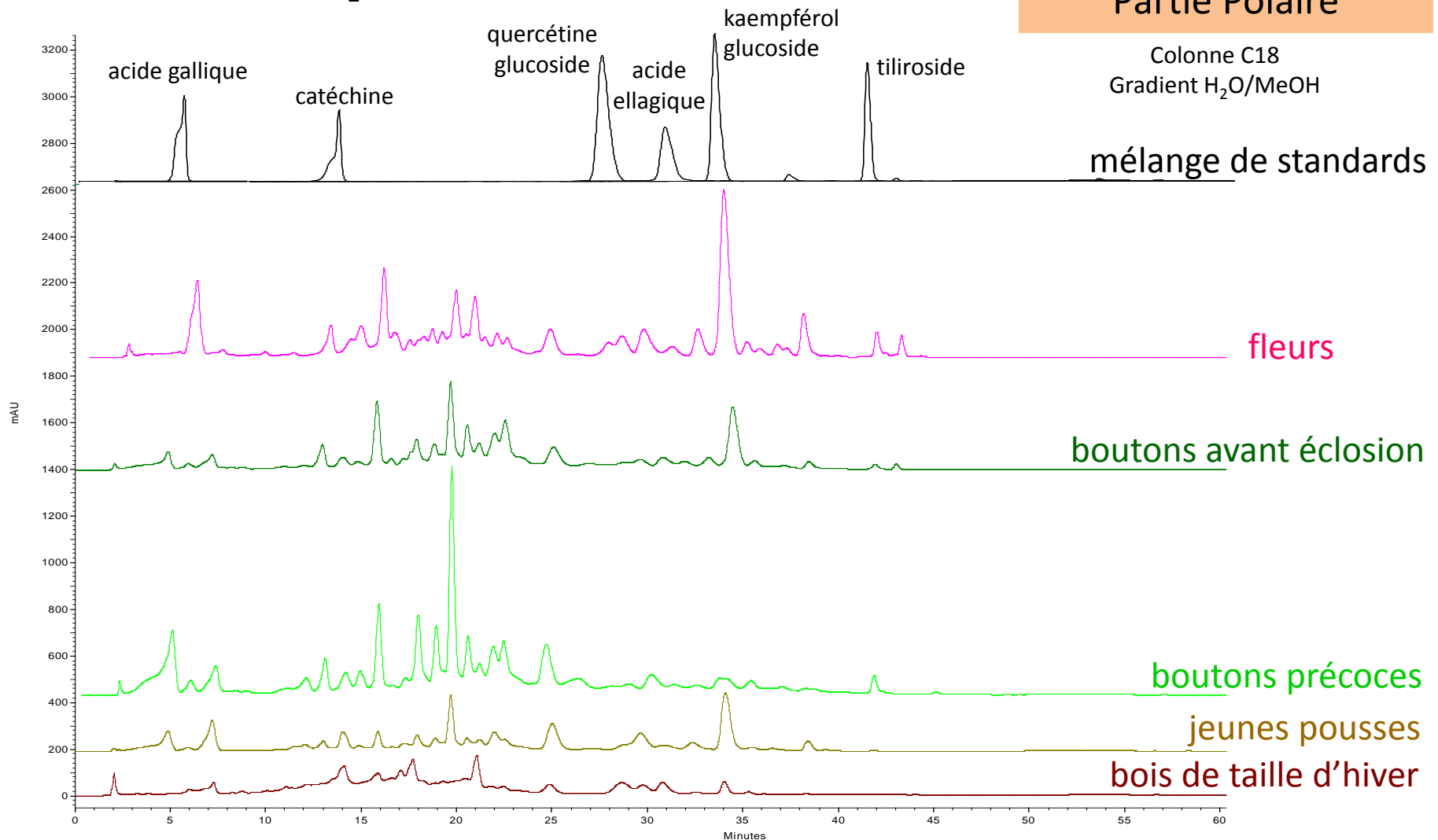
⇒ Augmentation au cours du développement de la teneur en dérivés de kaempférol.

Comparaison des organes de 'Jardin de Granville' par HPLC-DAD

Extraits EtOH/H₂O, 270 nm.

Partie Polaire

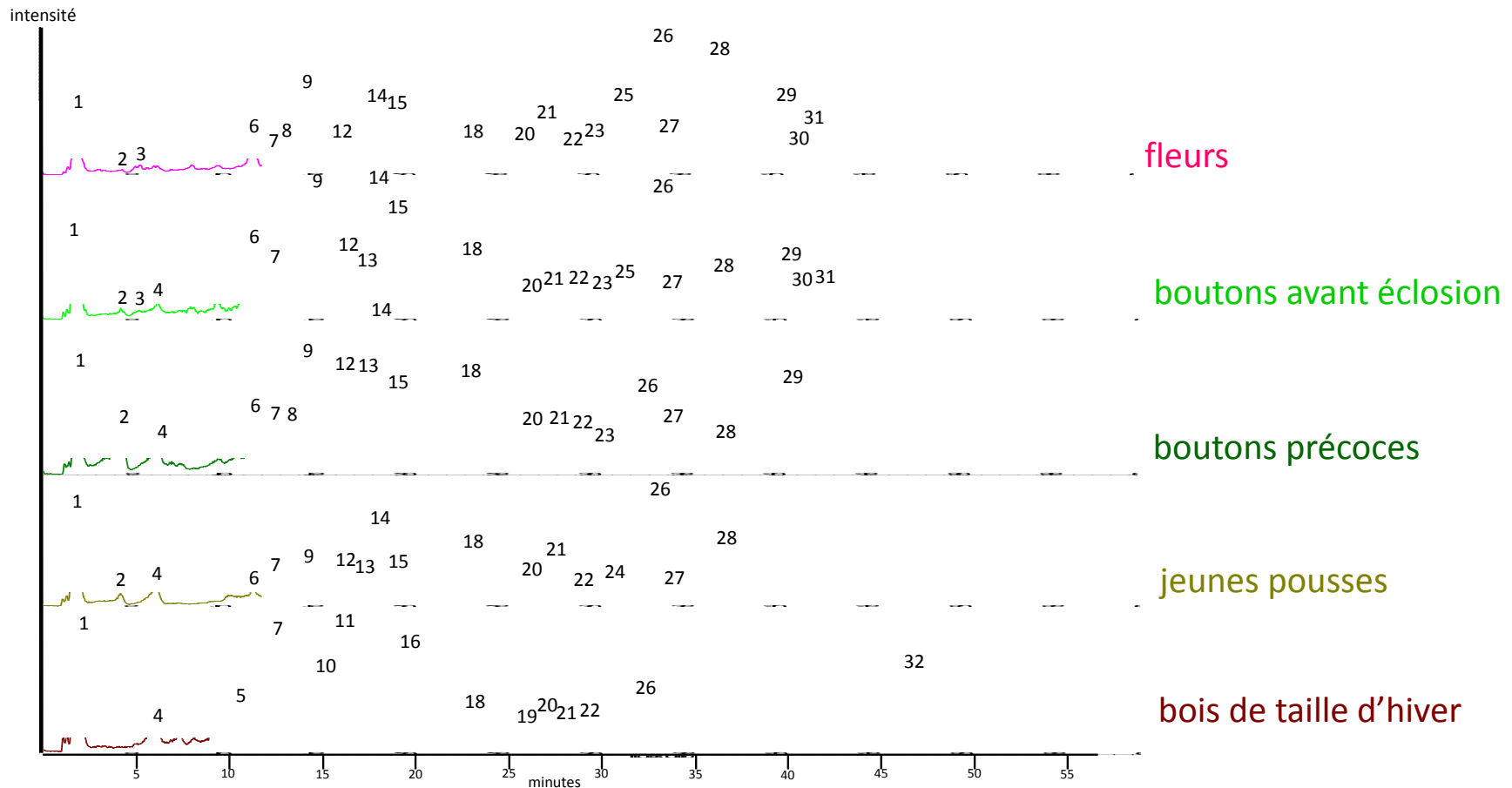
Colonne C18
Gradient H₂O/MeOH



Identification de marqueurs du stade de développement de la plante

HPLC-MS

TIC des différents organes de 'Jardin de Granville', extraits EtOH/H₂O



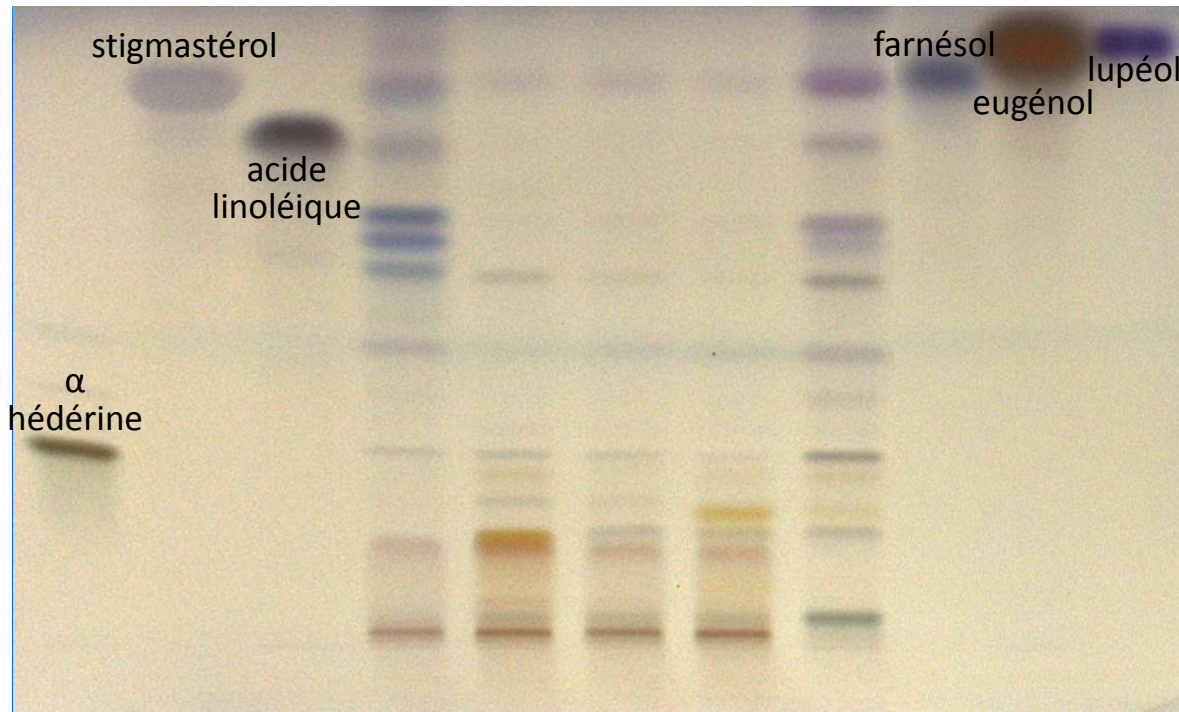
Identification de marqueurs du stade de développement de la plante

pic	bth	jp	bp	bae	fl	MW	[M-H] ⁻ , fragment ions (m/z)	tentative identification
3				x	x	170	340(2M), 169, 125	gallic acid
5	x					866	866, 577, 451, 289	proanthocyanidin trimer
11	x					866	866, 730, 577, 289	proanthocyanidin trimer
16	x					442	441, 289	galloyl catechin
17						464	463, 301	ellagic acid hexoside
19	x					434	433, 300	quercetin pentoside
23			x	x	x	600	599, 447, 285	kaempferol derivative
24		x				630	629, 505, 433, 327, 301	nd
25				x	x	448	447, 285, 255, 227	kaempferol hexoside
29			x	x	x	594	593, 285	tiliroside
30				x	x	286	285	kaempferol
31				x	x	584	583, 462, 342	tri-p-coumaroyl spermidine
32	x					573	572, 503	nd

Partie pérenne
 Partie végétative
 Partie reproductrice

* Identification des composés en rouge confirmée par comparaison à un standard.

Comparaison des organes de 'Jardin de Granville' par HPTLC



Partie plus apolaire

Révélation des composés
lipidiques
Extraits AcOEt

Plaque silice, CHCl₃/MeOH/H₂O

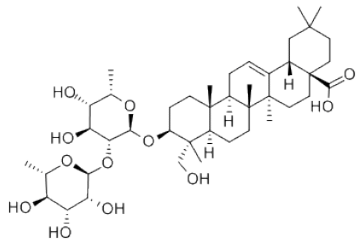
Visible + primuline + vanilline
sulfurique

- Profils différents en fonction de l'organe étudié
- Intensité des bandes plus importantes dans les fleurs
- Apparition / disparition de certains composés en fonction du stade de développement de la plante

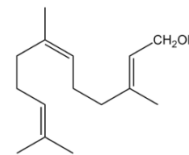
bt jp bp bae fl

'Jardin de Granville'

jp : jeunes pousses
bt : bois de taille d'hiver
bp : boutons précoces
bae : boutons avant éclosion
fl : fleurs



α -hédérine



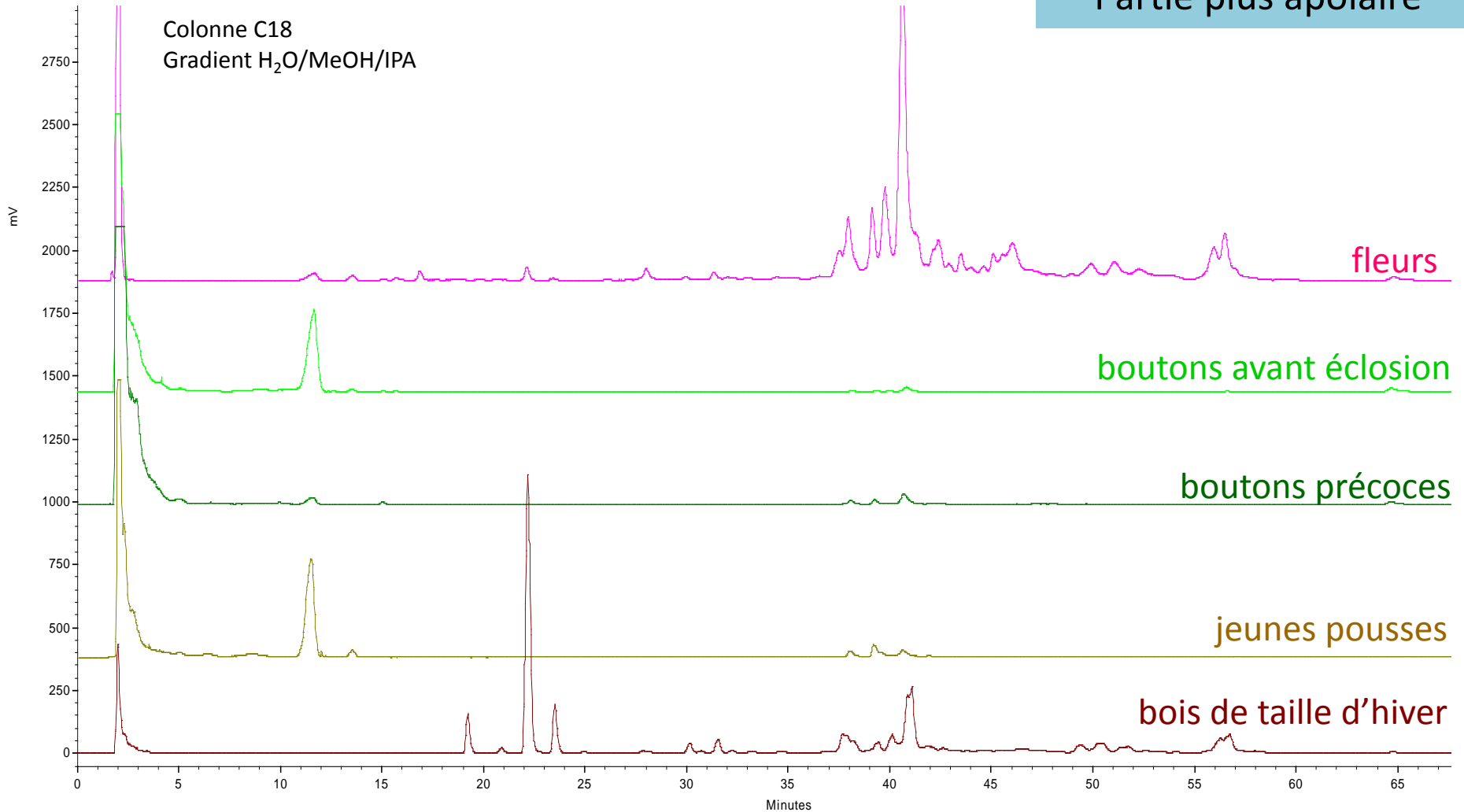
farnésol

Comparaison des organes de 'Jardin de Granville' par HPLC-DEDL

Extraits AcOEt.

Colonne C18
Gradient H₂O/MeOH/IPA

Partie plus apolaire



2

Comparaison des différentes variétés



R. Damascena

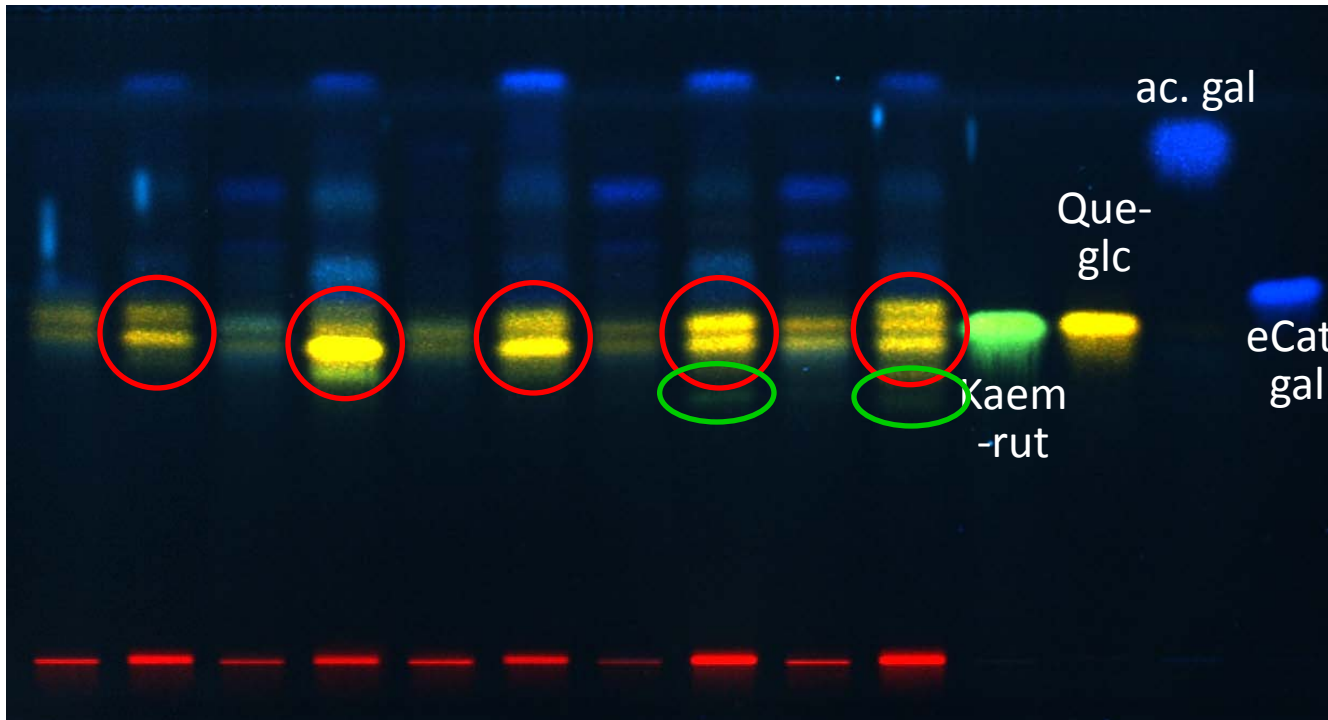
'Annapurna'

'Jardin de Granville'

'John Clare'

'Sir Cedric Morris'

Comparaison des variétés par HPTLC



Partie Polaire

Révélation des polyphénols
Extraits EtOH/H₂O

Plaque silice RP18
ACN/H₂O/HCOOH

366 nm + Neu + PEG

bt	jp	bt	jp	bt	jp	bt	jp	bt	jp
Jardin	Annap	John	R.dam	SIR C					

jp : jeunes pousses
bt : bois de taille d'hiver

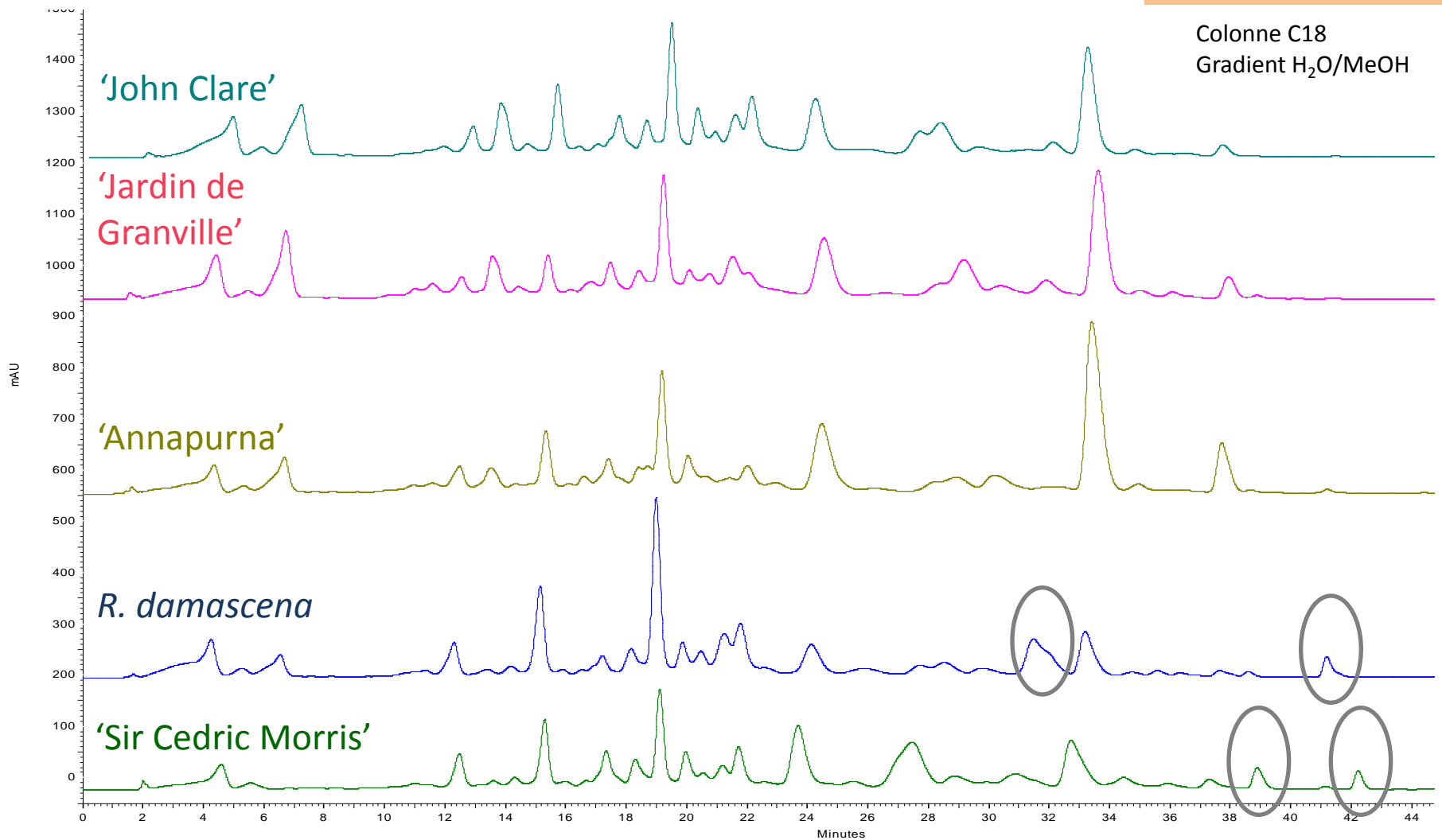
⇒ Fluorescence jaune plus intense dans les jeunes pousses

⇒ 1 bande supplémentaire chez *R. damascena* et 'Sir Cedric Morris'

Comparaison des variétés par HPLC-DAD

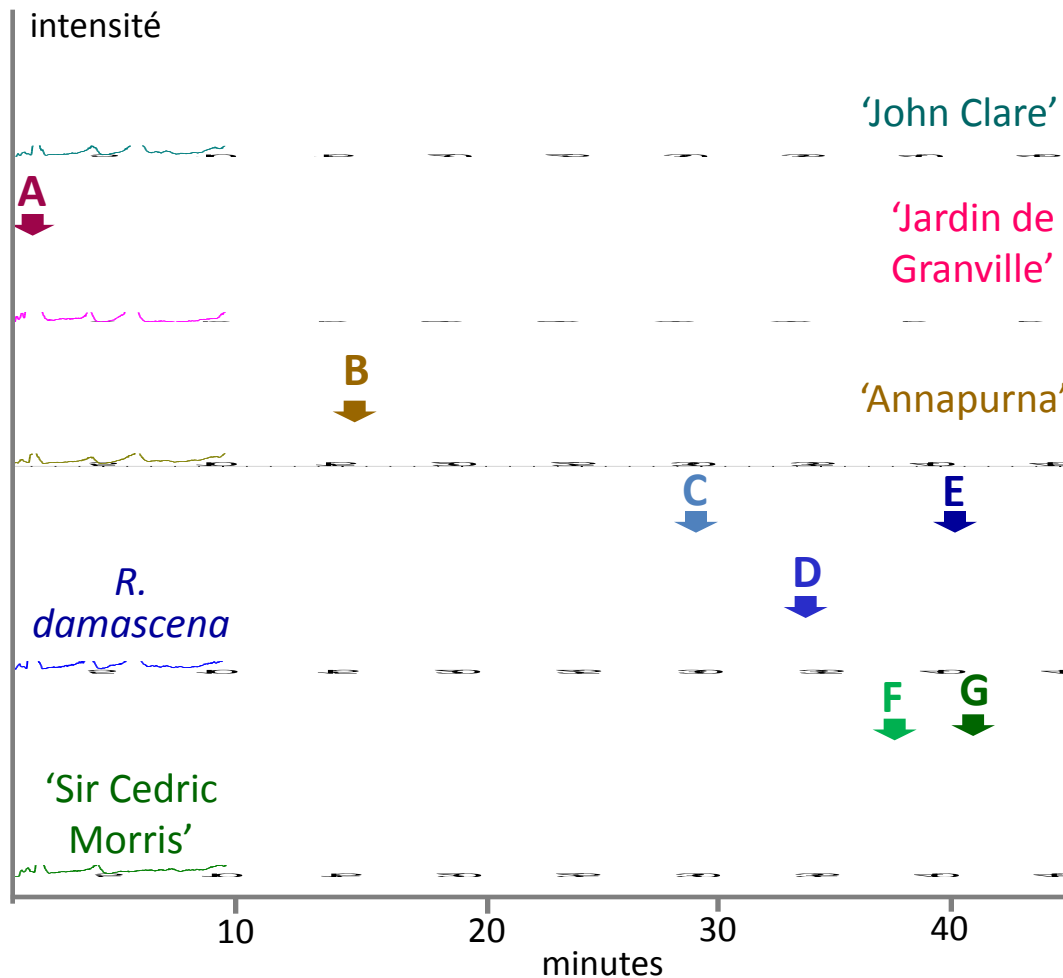
Jeunes pousses, extraits EtOH/H₂O, 270 nm

Partie Polaire



Identification de marqueurs potentiels : exemple des jeunes pousses

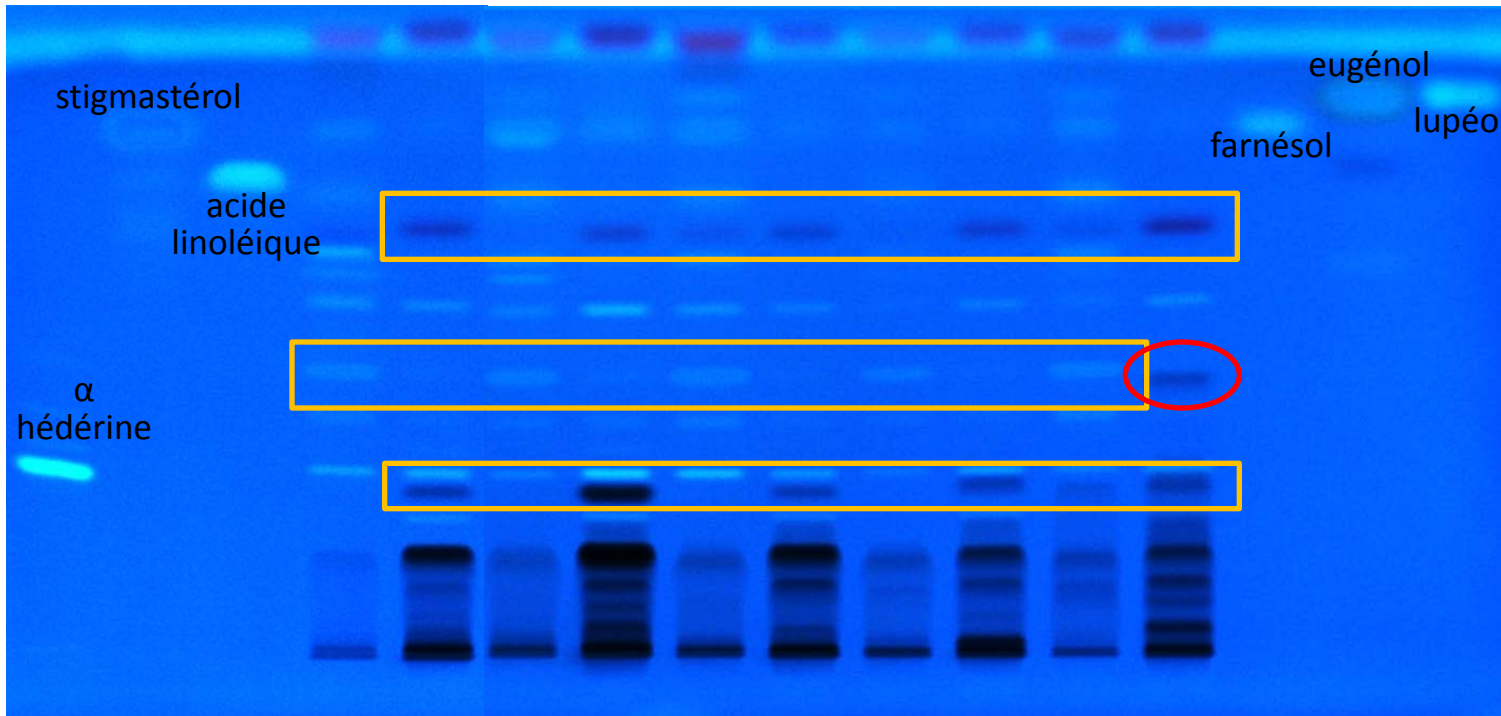
TIC des extraits EtOH/H₂O



composé	masse, fragments [M-H] ⁻	propositions d'identification
A	876, 683, 533, 383, 191	nd
B	730, 301	ellagitannin
C	608, 301	dérivé de quercétine
D	760, 457, 301	dérivé de quercétine
E	594, 285	tiliroside*
F	490, 301	dérivé de quercétine
G	474, 285	dérivé de kaempférol

* Identification confirmée par comparaison à un standard.

Comparaison des variétés par HPTLC



Partie plus apolaire

Révélation des composés lipidiques
Extraits AcOEt

Plaque silice
CHCl₃/MeOH/H₂O
366 nm + primuline

bt	jp	bt	jp	bt	jp	bt	jp	bt	jp
Jardin		Annap		John		R.dam		SIR C	

jp : jeunes pousses
bt : bois de taille d'hiver

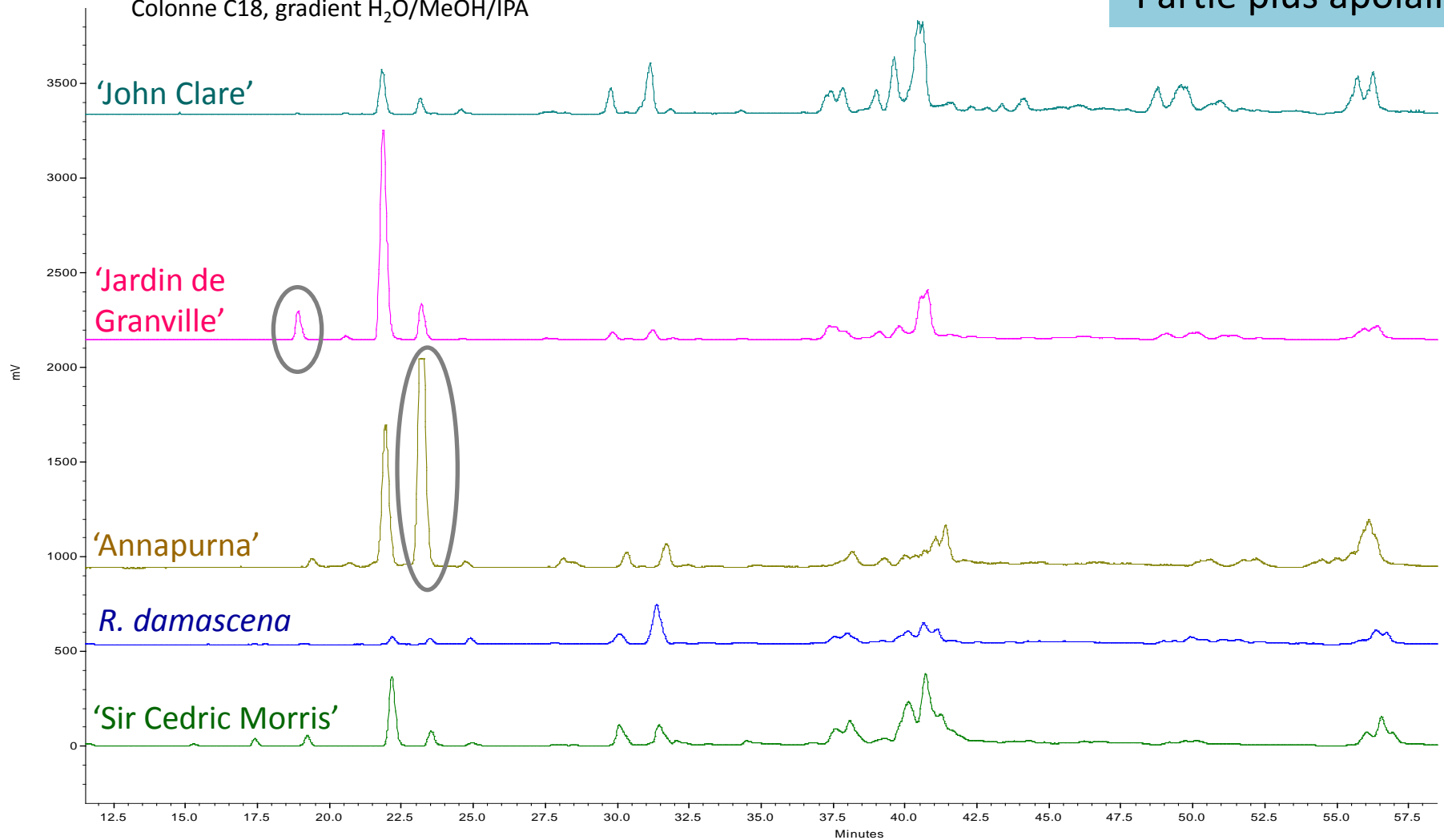
- ⇒ Présence de composés « organes spécifiques » bois de taille d'hiver et jeunes pousses présents chez les 5 variétés
- ⇒ 1 bande supplémentaire chez 'Sir Cedric Morris'

Comparaison des variétés par HPLC-DEDL

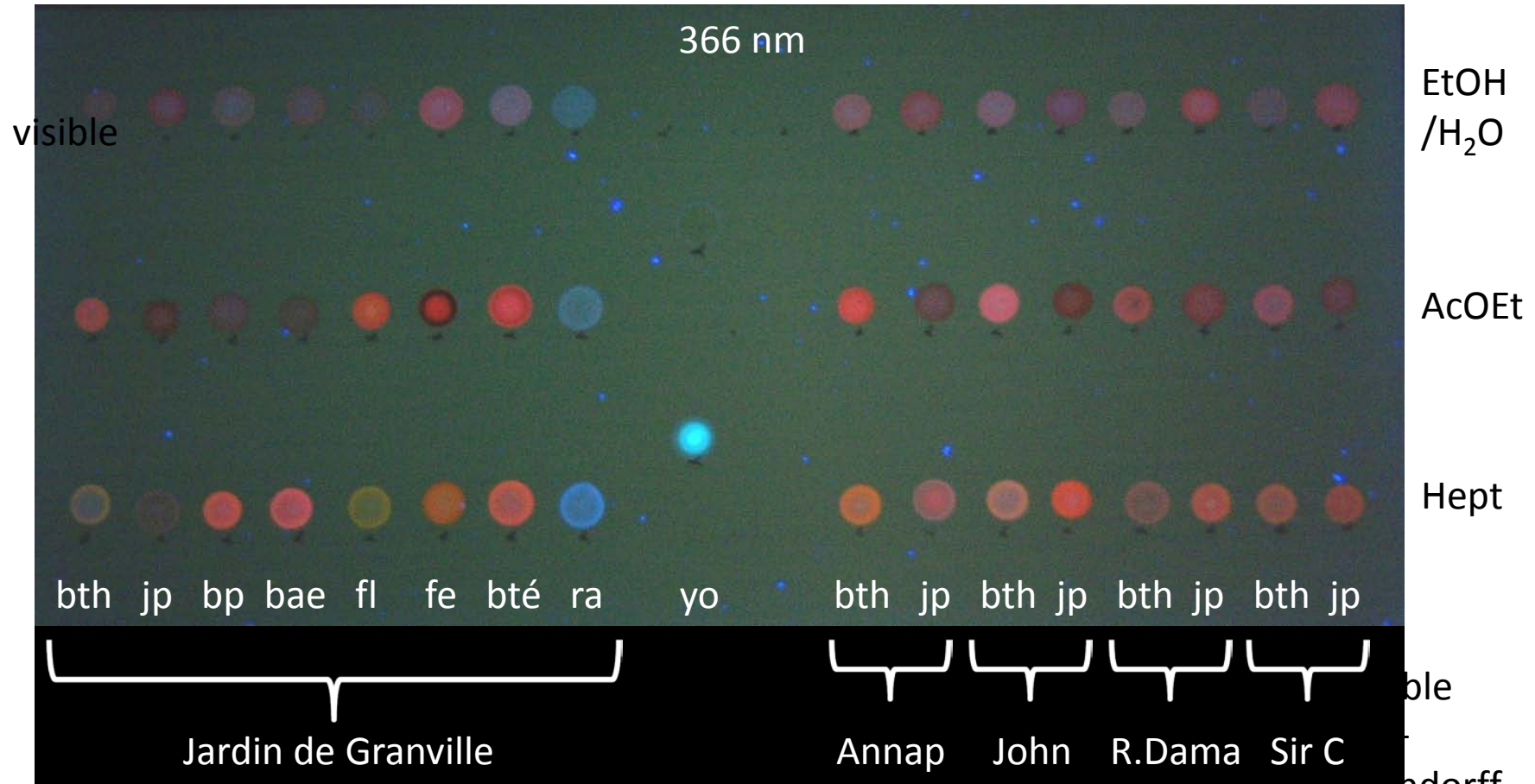
Bois de taille d'hiver, extraits AcOEt.

Colonne C18, gradient H₂O/MeOH/IPA

Partie plus apolaire



Recherche d'alcaloïdes dans les différents organes des variétés



jp : jeunes pousses
 bt : bois de taille d'hiver
 bp : boutons précoces
 bae : boutons avant éclosion
 fl : fleurs

fe : feuilles
 bté : bois de taille d'été
 ra : racines
 yo : yohimbine

Conclusion

- Développement d'un protocole d'analyse adapté au matériel végétal à étudier (conservation optimum de la récolte, conditions de stockage, méthodes d'extraction et d'analyse).
- Bonne corrélation et complémentarité entre les 2 méthodes d'analyse et les détecteurs.
- Premières analyses effectuées sur la récolte 2012 et premiers résultats :
 - niveau d'étude fin : comparaison de variétés au sein d'une même espèce : ⇒ proximité des empreintes chromatographiques, variations majeures en terme d'intensité des pics/bandes.
- Méthodes d'analyse qui permettent d'observer des différences entre organes et entre variétés.
 - ⇒ Possibilité de trouver des marqueurs phytochimiques.
 - ⇒ Mise en évidence de marqueurs potentiels, première identification.

Perspectives

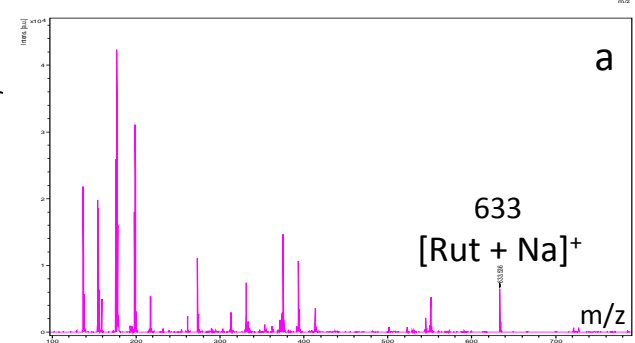
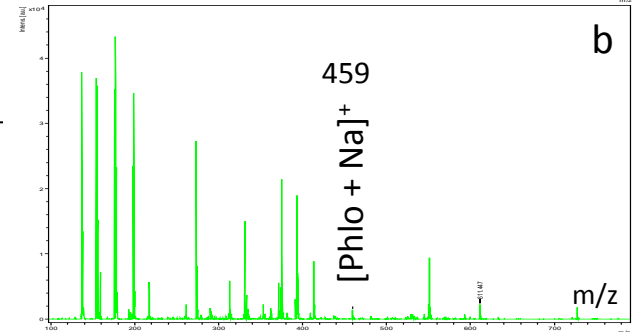
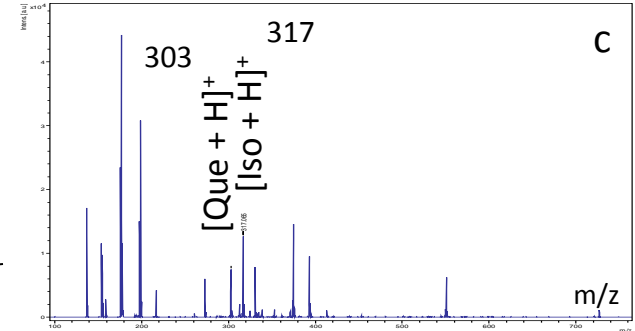
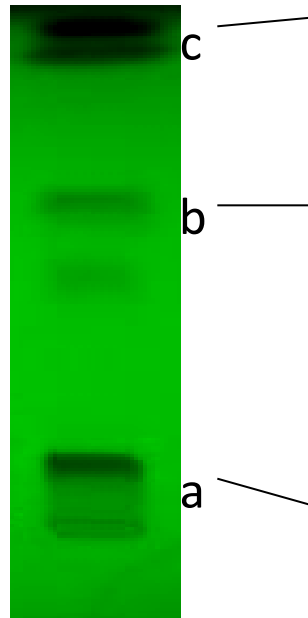
- Confirmer les premières identifications des composés différentiels : HRMS \Rightarrow masse exacte.
- Traitements statistiques des données (ACP) : mettre en évidence les différences entre organes et entre variétés. Prouver la validité des résultats.
- Mise en place d'un couplage HPTLC-MALDI-TOF dans les mois à venir.

Perspectives

Premiers essais TLC-MALDI-TOF-MS avec matrice 2.5-DHB (10^{-1} mol.L $^{-1}$)
Couplage direct

Mélange de 6 standards :

- Rutine
- Isorhamnétine-3-O-glucoside
- Phloridzine
- Catéchine
- Quercétine
- isorhamnétine



Remerciements...

- Claire Elfakir
- Emilie Destandau
- toute l'équipe



- Patrice André
- Laure Pasquier
- toute l'équipe

LVMH RECHERCHE
PARFUMS & COSMETIQUES



Merci de votre attention

- Jérôme Rateau



- Club CCM

