

Recherche de nouvelles alternatives de traitement des "déchets" de plantes invasives avec l'HPTLC-Bioautographie/HRMS

QUINTY Vanille¹, DA SILVA David², COLAS Cyril^{2,3}, PIOT Christine¹, DRAYE Micheline¹, DESTANDAU Emilie² et CHATEL Grégory^{1*}



¹ Université Savoie Mont Blanc, CNRS - EDYTEM, 73000 Chambéry, France

² Institut de Chimie Organique et Analytique - ICOA UMR7311, Orléans, France

³ Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS - Université d'Orléans, UPR 4301, Orléans, France

Email : vanille.quinty@univ-smb.fr

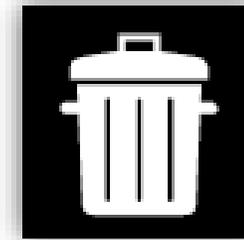
Principales causes d'érosion de la biodiversité



Invasions biologiques aux impacts négatifs multiples



Conséquences
écologiques, économiques
et/ou sanitaires négatives



Grande quantité de
déchets sans exutoire

- Dépôts sur sites
- Incinération
- Epandage

**Mais de quelle catégorie
de « Déchets » s'agit-il ?**

Exemples de Méthodes Alternatives de Traitement

Ces méthodes permettent de ne plus considérer simplement les résidus de gestion comme des « déchets » dont il faut se débarrasser, mais plutôt comme des ressources.

Recherche et développement :

- _ d'activités biologiques diverses
- _ d'agents de dépollution (absorber et accumuler les métaux lourds dans l'environnement)
- _ de filtres bio-inspirés
- _ de compléments alimentaires
- _ de colorants

VALORISATION ALIMENTAIRE

Alimentation humaine,
Invasivores

_ Confitures, sirops, alcools, miels

VALORISATION CHIMIQUE

Industries pharmaceutique,
cosmétique, nutraceutique ou
encore chimique

_ Vannerie

_ broyat, paillis ou plaquettes

_ papiers

_ les bois d'abattage, essouchage ou dévitalisation : aménagements en génie écologique (clôtures, barrières végétales), mobilier urbain (banc, nichoir, support pédagogique, etc.) ou encore des sculptures

CREATION MATIERE PREMIERE, COMBUSTIBLES

Construction, artisanat,
agriculture

UICN Comité français, Suez Recyclage et Valorisation France. (2022). 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. 136 pages.

CHATEL, G., DUWALD, R., PIOT, C., DRAYE, M. (2019). Valorisation chimique et économique des renouées asiatiques : quelle stratégie pour une gestion durable ? Revue Science Eaux & Territoires. Renouées envahissantes - Connaissances, gestions et perspectives, numéro 27, 2019, pp. 102-107, 14/06/2019.

Projet InvaVAL et Objectifs de l'étude

« Valorisation d'Espèces Végétales Exotiques Envahissantes sur le territoire Savoie Mont Blanc : stratégies de chimie verte et d'économie circulaire »

VALORISATION CHIMIQUE



- Connaître la composition phytochimique du végétal
- Comprendre les paramètres qui peuvent influencer sur cette composition



- Extraire via des « éco-procédés » les composés d'intérêt
- Cribler et évaluer les activités biologiques du végétal
- Enrichir les extraits produits en actifs

Donner des pistes de valorisation alternatives, en cherchant à réduire le coût du traitement de ces déchets, voire celui de la gestion, tout en prenant en compte les risques associés.

EVEE Sélectionnées pour l'Etude et leurs Principaux Constituants

Ambrosie à feuilles d'armoise



Terpènes

Sesquiterpènes lactones et glycosides
(*Paulitin, Isopaulitin, Artemisiifolin, Psilotachyin A, B et C*)
Triterpénoïdes (*α- amyrin acetate*)

Polyphénols

Dérivés d'**acide caféique** (*Acide chlorogénique*)
Aglycones (*Quercétine, Isorhamnétine*)

Renouée du japon

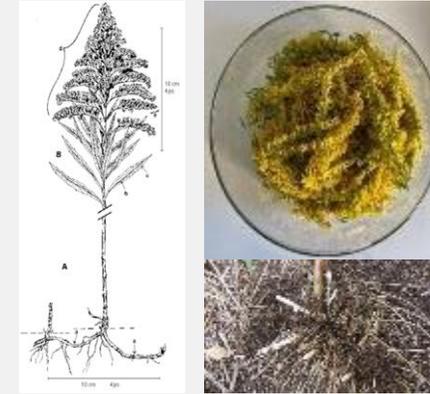


Polyphénols

Dérivés d'**acide caféique** (*Acide chlorogénique*)
Flavonol (*Quercétine, Catéchine et leurs dérivés*)
Tannins condensés (*procyanidines polymériques*)
Stilbènes (*resvératrol et dérivés type Piceid, polydatine*)

Hydrocarbures aromatiques polycycliques
Anthraquinone (*Emodine et dérivés*)

Solidage du canada



Terpènes

Sesquiterpènes (*Germacrène D*)
Monoterpènes (*alpha-pinène*)
Esters terpéniques (*bornyl-acétate*)

Polyphénols

Dérivés d'**acide caféique** (*Acide chlorogénique*)
Aglycones (*Quercétine, Isorhamnétine*)

*Procédés et
Solvants
différents*



CONTEXTE

GESTION DES
« DECHETS »

OBJECTIFS

METHODOLOGIE
ETUDE

RESULTATS

CONCLUSIONS &
PERSPECTIVES

Méthodologie de Travail Employée



Récupération de la ressource végétale sur le territoire



Reynoutria japonica



Ambrosia artemisiifolia



Solidago canadensis

Extraction et éco-extraction
du matériel végétal
(Hydrodistillation, Micro-ondes,
Ultrasons)

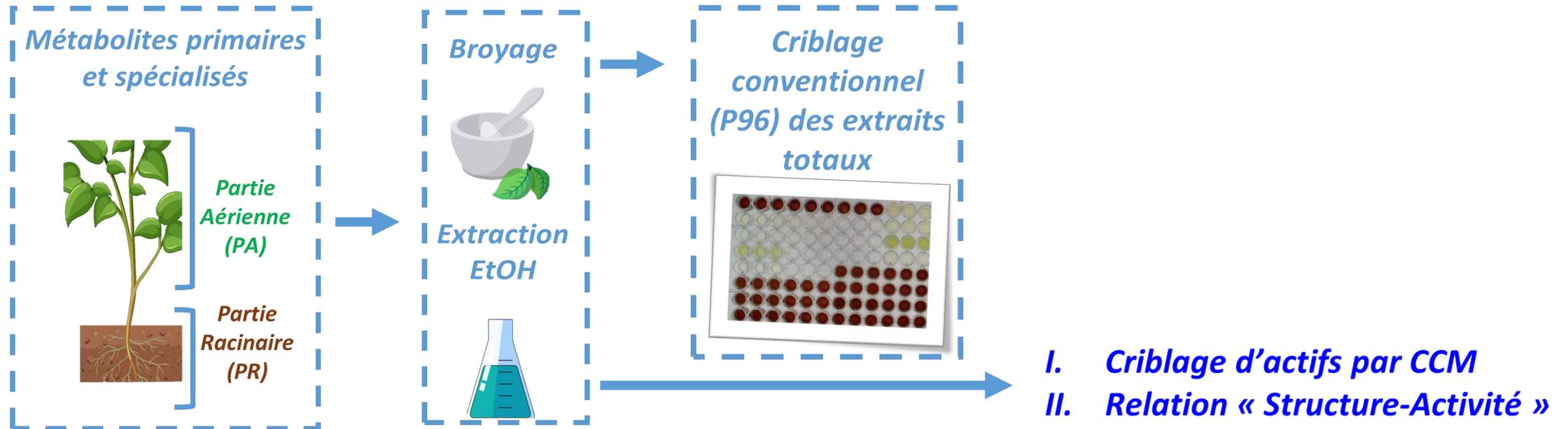
Optimisations pour
enrichir en actifs

Criblage et Evaluation
des activités biologiques
(antioxydante, anti-tyrosinase, anti-élastase,
anti-collagénase, anti-hyaluronidase, anti-lipase)

Analyses
phytochimiques
(LC, CCM, GC, MS)

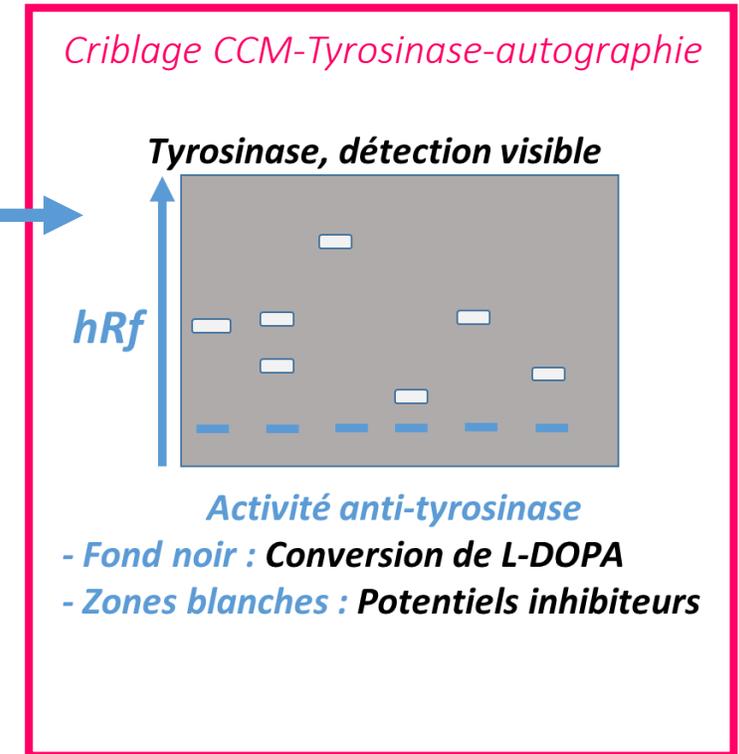
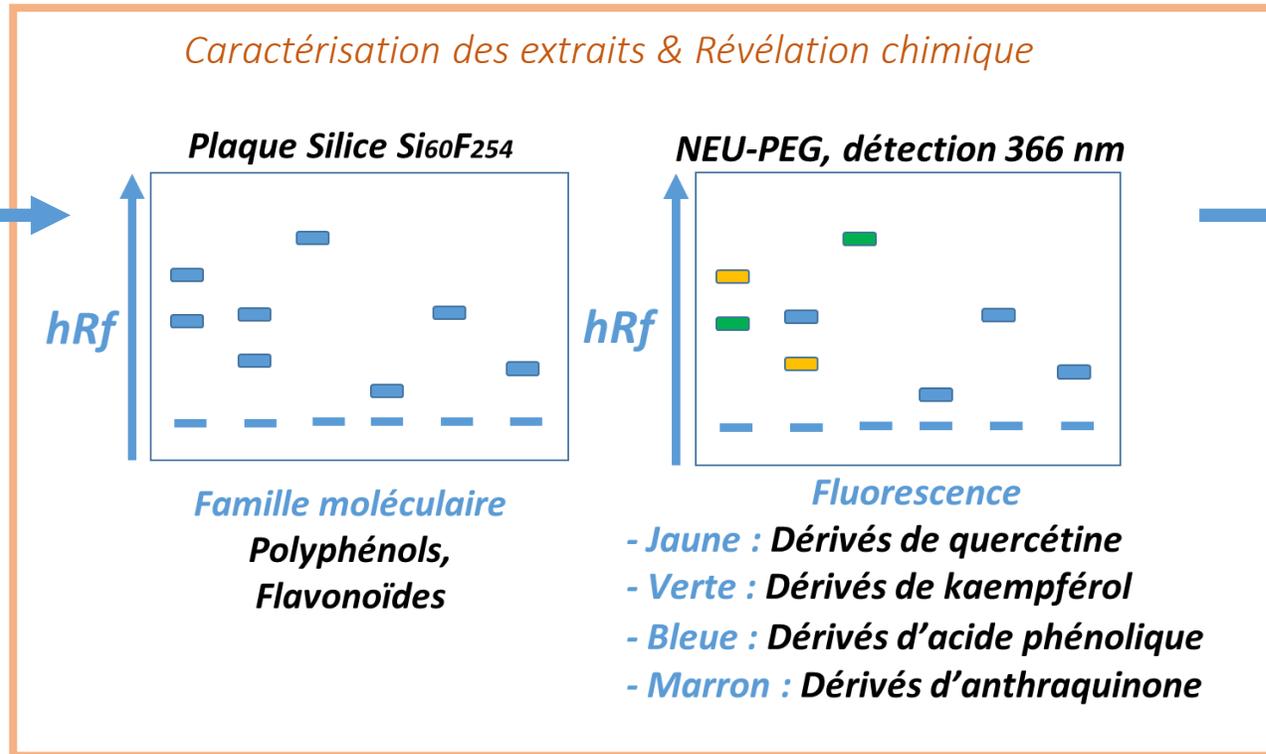
Identification, Caractérisation

Méthodologie de criblage d'actifs à visée dermatologique



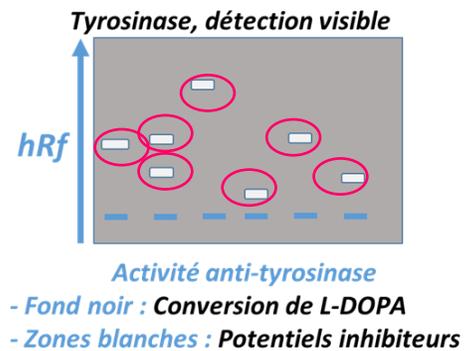
Méthodologie de criblage d'actifs à visée dermatologique

I. Criblage d'actifs par CCM



Méthodologie de criblage d'actifs à visée dermatologique

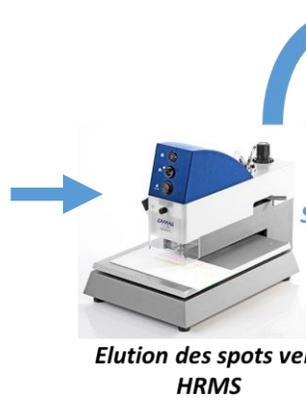
Criblage CCM-Tyrosinase-autographie



I. Criblage d'actifs par CCM

Analyse ciblée des spots blancs !

II. Relation Structure-Activité



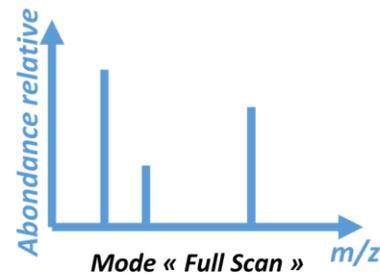
Elution des spots vers HRMS

HRMS

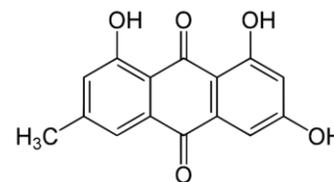
Solvant d'éluion ACN/H₂O (65/35)
Mode d'ionisation ESI négatif



Spéctre de masse Haute Résolution
-> détermination Formule Brute



Proposition de structure
-> comparaison avec la littérature



Emodine (C₁₅H₁₀O₅, Masse exacte :
389,1242 +/- 0,005 g/mol)



Valorisation en dermocosmétique

CONTEXTE

GESTION DES
« DECHETS »

OBJECTIFS

METHODOLOGIE
ETUDE

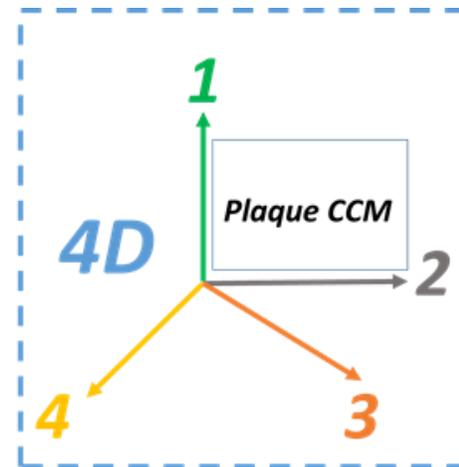
RESULTATS

CONCLUSIONS &
PERSPECTIVES

Récapitulatif : utilisation des 4 dimensions de la CCM

Couplage CCM-Bioautographie/HRMS

1D : Technique séparative (polaire-apolaire)



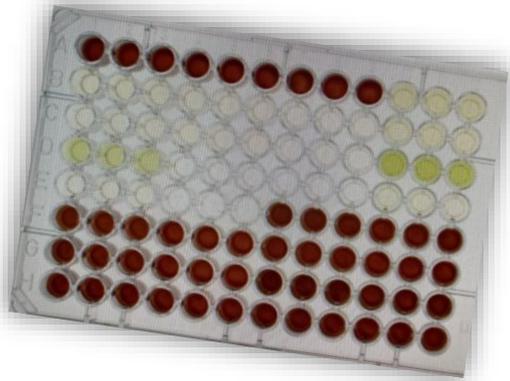
2D : Révélation Chimique

4D Spectrométrie de masse

3D : Criblage d'actifs

A. Marston. Thin-layer chromatography with biological detection in Phytochemistry. Journal of Chromatography A. Volume 1218, Issue 19, 13 May 2011, 2676-2683.
Saikat Dewanjee, Moumita Gangopadhyay, Niloy Bhattacharya, Ritu Khanra, Tarun K. Dua, Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry, Journal of Pharmaceutical Analysis. Volume 5, Issue 2, April 2015, 75-84.
Gertrud E. Morlock (2014) BACKGROUND MASS SIGNALS IN TLC/HPTLC-ESI-MS AND PRACTICAL ADVICES FOR USE OF THE TLC-MS INTERFACE, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 37:20, 2892-2914.

Criblage conventionnel : l'activité anti-tyrosinase



Quelles molécules sont responsables ?

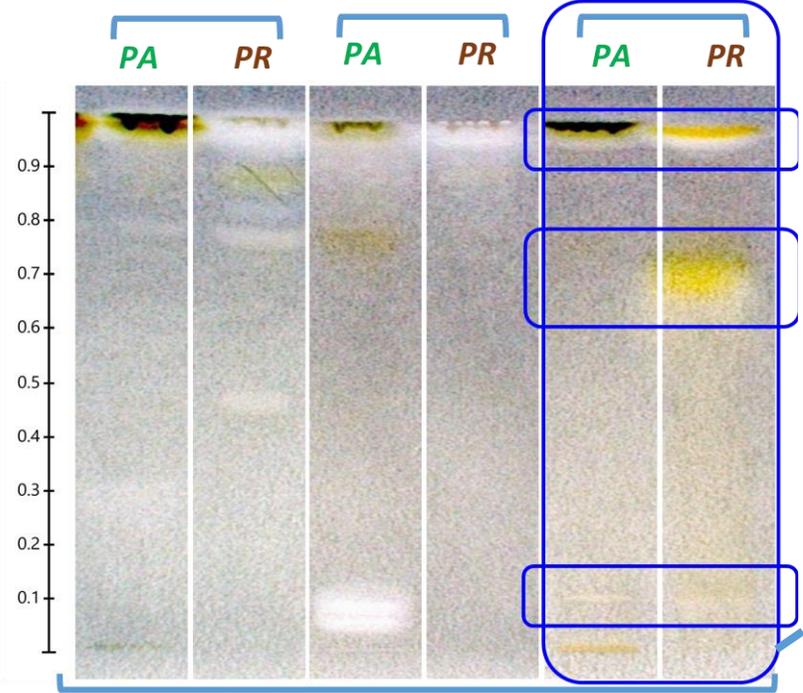
Concentration testée : 1 mg/mL	% Inhibition N=3	PA		PR		PA		PR	
		PA	PR	PA	PR	PA	PR		
		6%	8%	4%	6%	12%	17%		

Les hyperpigmentations ont pour origine, un dérèglement dans la production de mélanines, qui sont les pigments responsables de la coloration cutanée.

CCM-Tyrosinase-autographie : criblage des zones actives



Zoom sur la Renouée du japon : 3 zones d'intérêt



Tyrosinase, détection visible



Elution des spots vers HRMS

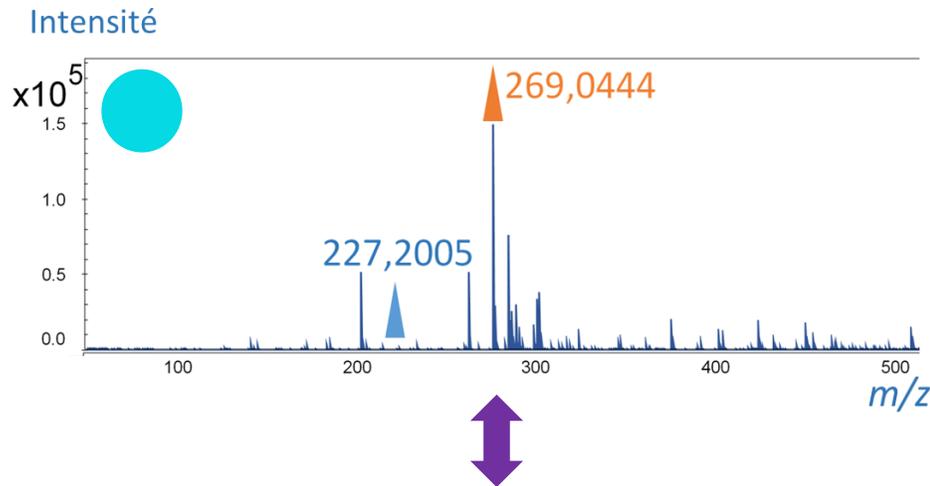
HRMS

Solvant d'éluion ACN/H₂O (65/35)
Mode d'ionisation ESI négatif

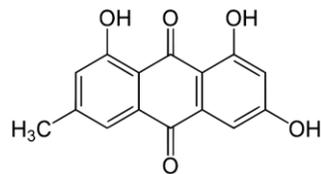


Couplage à la spectrométrie de masse : proposition de structures

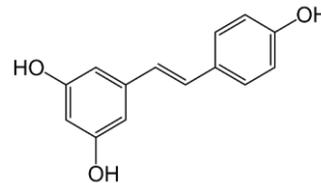
 Pas de proposition



Zone	hRf	NEU-PEG	m/z	Formule Brute	Intensité	Proposition
	1,0	Jaune-Rouge	269,0444	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	++	Emodine
			227,2005	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	+	Resvératrol

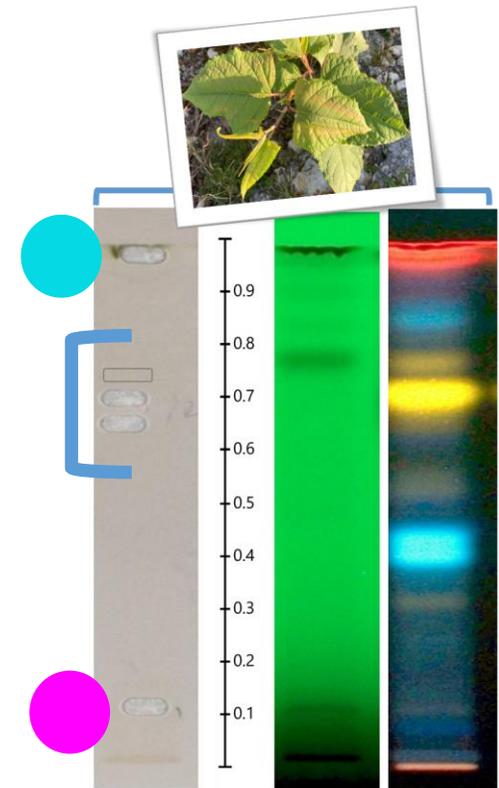


Emodine (C₁₅H₁₀O₅, Masse exacte : 389,1242 +/- 0,005 g/mol)



Resvératrol (C₁₄H₁₂O₃, Masse exacte : 227,0714 +/- 0,005 g/mol)

Partie Aérienne



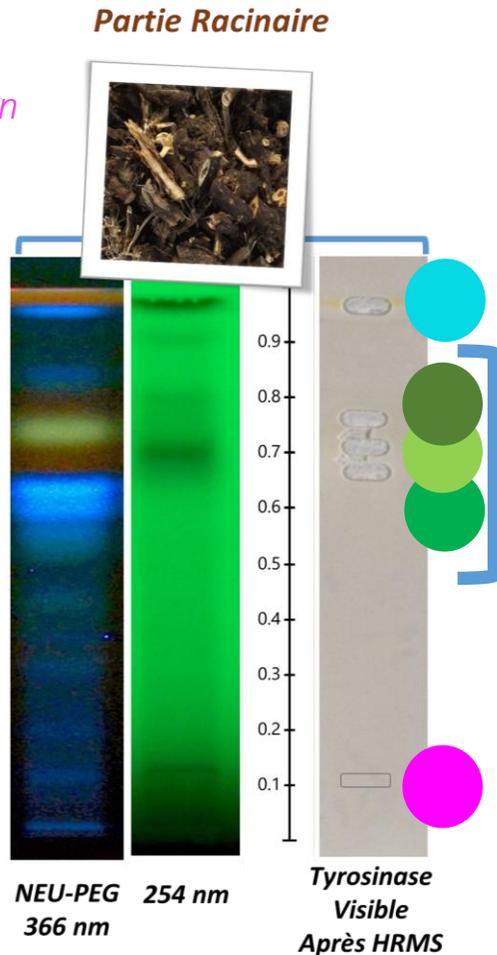
Tyrosinase
Visible
Après HRMS

254 nm

NEU-PEG
366 nm

Couplage à la spectrométrie de masse : proposition de structures

- Pas de proposition
- Même formules brutes

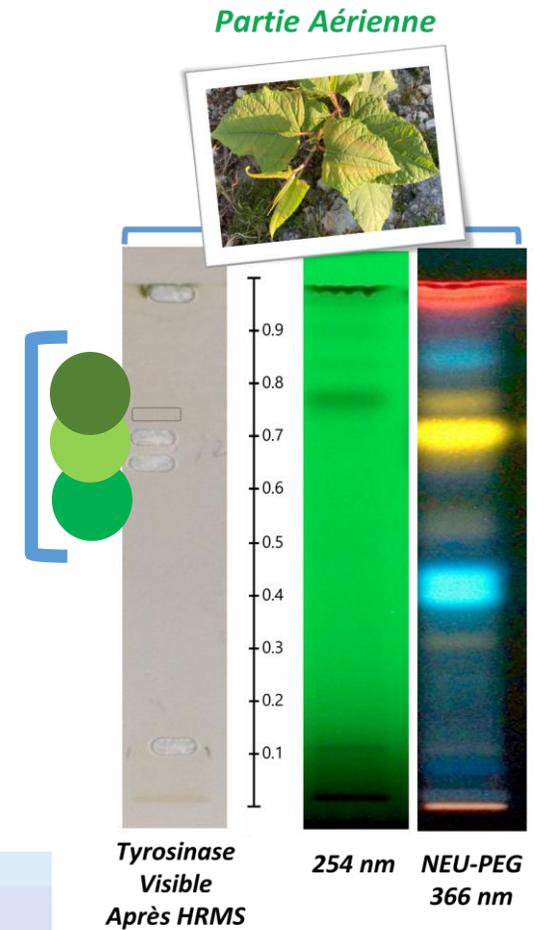


Ces composés sont-ils tous actifs ?

Zones	hRf	NEU-PEG	m/z	Formule Brute	Intensité	Proposition
●	0,75	Jaune-Marron	431,0957	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	+	Emodine glucoside, Kaempferol glucoside, Apigenin glucoside Torachrysonne glucoside
● ●	0,65-0,7	Bleu	407,1324	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₀	+	
● ●	0,65-0,7	Bleu	389,1221	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	++	Polydatine

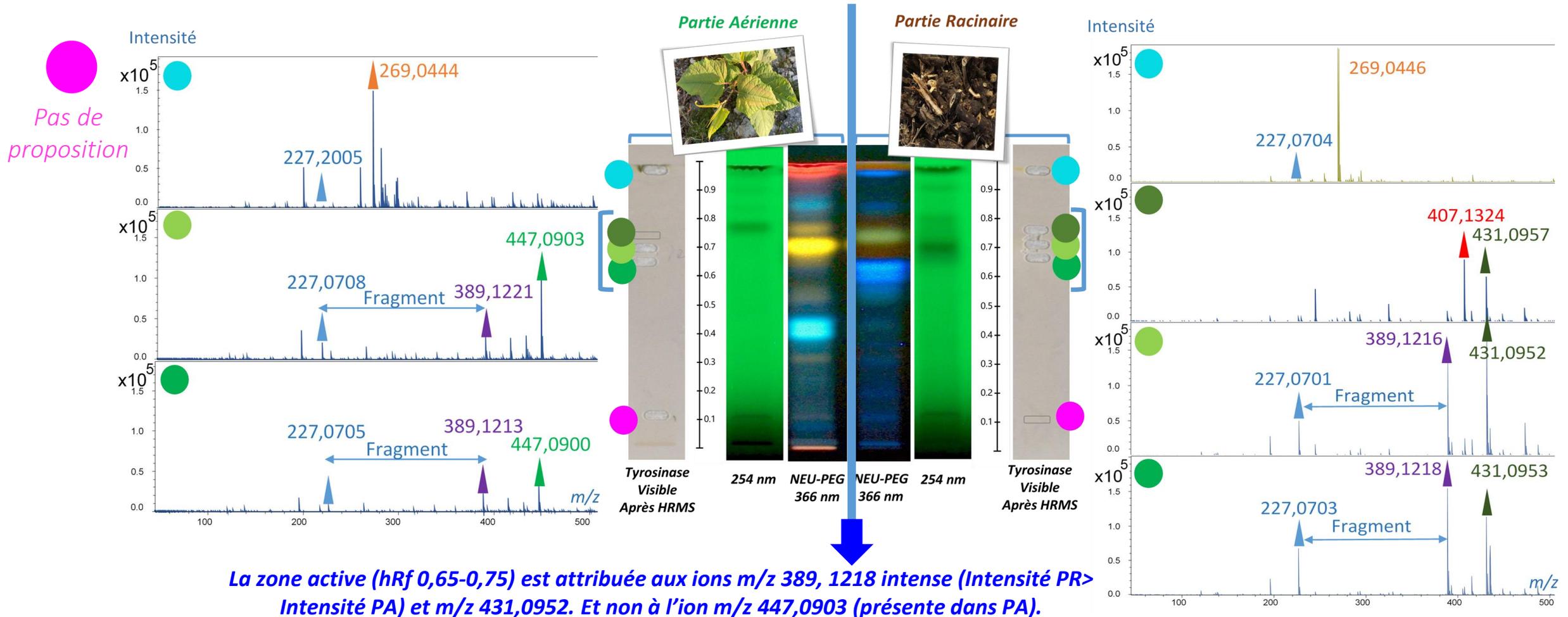
Zone hRf 0,65-0,75 de la partie aérienne

● Non évalué



Zones	hRf	NEU-PEG	m/z	Formule Brute	Intensité	Proposition
● ●	0,65-0,7	Jaune	389,1221	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	++	Polydatine
			447,0903	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	+	Quercitrin, Luteolin glucoside, Kaempferol glucoside

Comparaison entre PA et PR : attribution des m/z responsables de l'activité

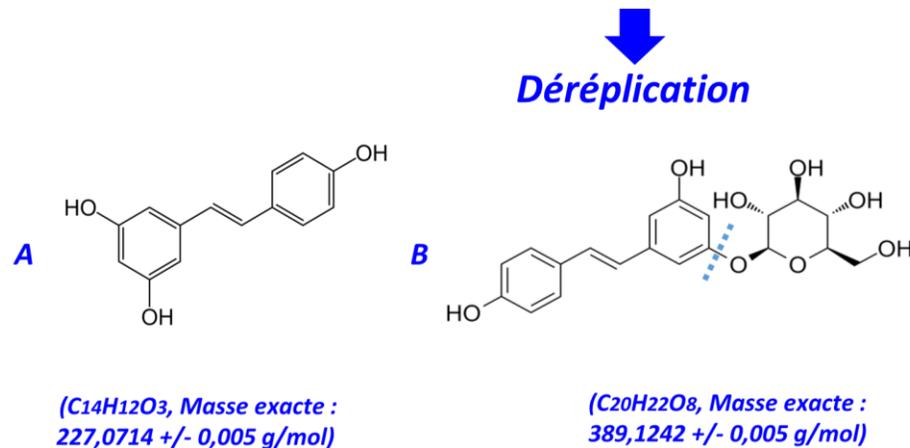
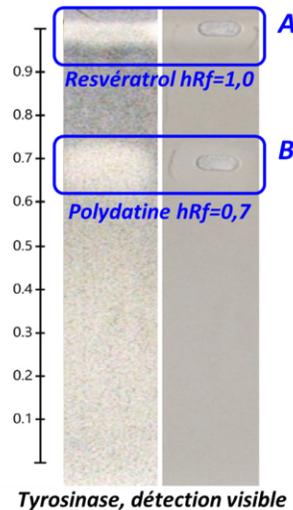


Relations « Structure-Activité »

Proposition de « structure-activité » des zones actives (PA et PR) : convolution des données CCM

Zones	hRf	NEU-PEG	m/z	Formule Brute	Intensité	Proposition
●	1,0	Jaune-Rouge	269,0444	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	++	Emodine Resvératrol
			227,2005	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	+	
●	0,75	Jaune-Marron	431,0957	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	+	Emodine glucoside, Kaempferol glucoside, Apigenin glucoside Polydatine
● ●	0,7	Bleu	389,1221	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	++	

Les propositions sont issues des différentes dimensions de la CCM soit : la couleur Neu-PEG, la polarité et l'information de masse exacte.



Parmi ces propositions, les standards de Resvératrol (A) et de Polydatine (B) ont été évalués et confirment les résultats précédents (hRf, activité et diffusion de la zone Polydatine).

Conclusions & Perspectives



- ✓ Méthodologie appliquée à l'ensemble des extraits produits
- ✓ CCM : Visuelle, Sélective, Richesse moléculaires, Déréplication
- ✓ CCM-Bioautographie : Compatibilité avec certains tests biologiques
- ✓ Identification de relations « structure-activité », et possibilité de cibler les potentiels inhibiteurs de la tyrosinase (émodyne, resvératrol et leurs dérivés glucosylés dans l'exemple de *R. japonica*).



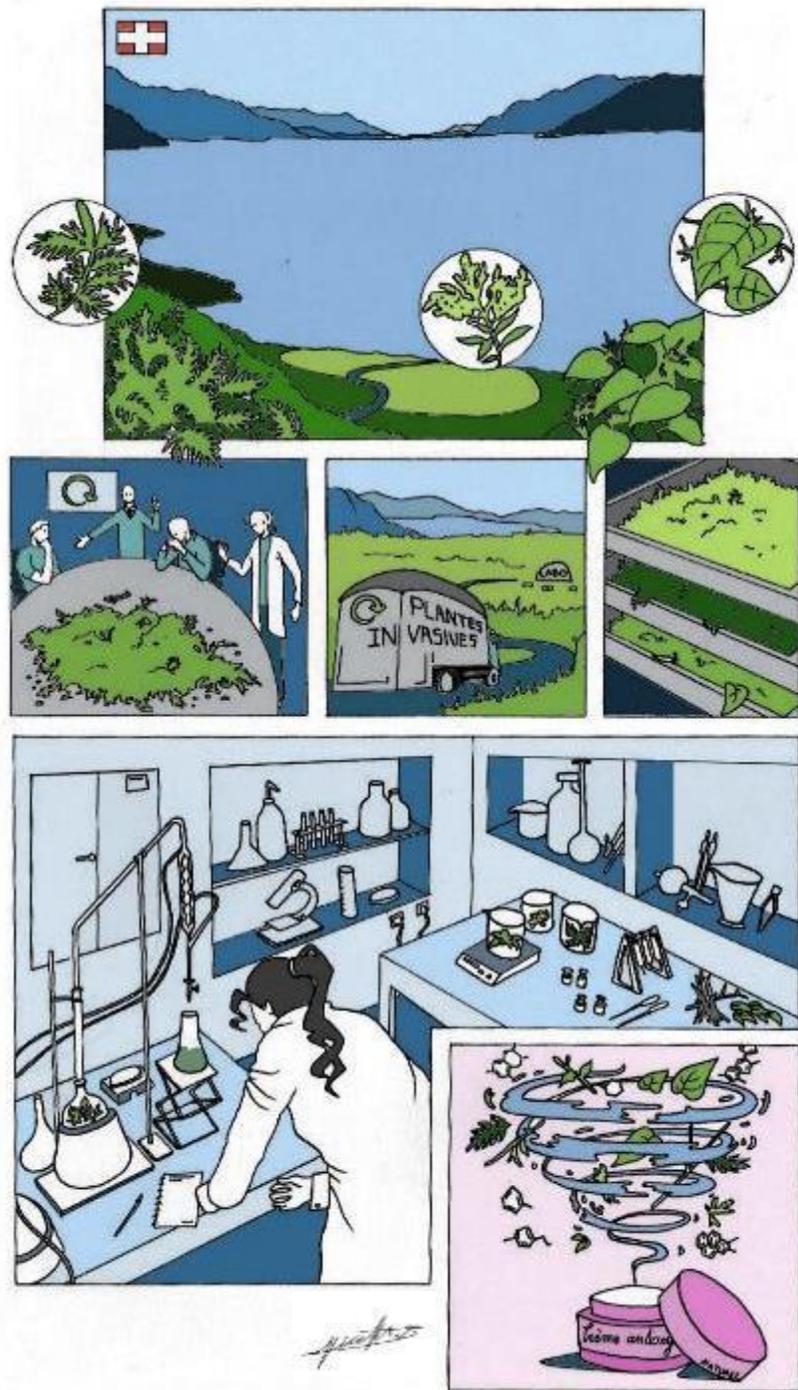
- ✓ Rapport signal sur bruit, Résolution spatiale (co-élutions, compétition ionique, interférents du support silice) peut-être dans certains cas une limitation.
- ✓ Conservation des plaques

- ✓ S'étendre à d'autres activités biologiques (tests conventionnels, CCM-Bioautographie)
- ✓ Influences des lieux, stades de croissance en fonction des activités
- ✓ MS/MS pour une identification plus fiable



Valorisation de ces ressources
Apporter des solutions aux gestionnaires du territoire





Merci à tous pour
votre attention et ce
temps d'échange !