



HAL
open science

Investigations phytochimiques de la graine de *Camelina sativa* par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) et résonance magnétique nucléaire (RMN)

Déborah Brancourt

► To cite this version:

Déborah Brancourt. Investigations phytochimiques de la graine de *Camelina sativa* par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) et résonance magnétique nucléaire (RMN). Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01334755

HAL Id: dumas-01334755

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01334755>

Submitted on 21 Jun 2016

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

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

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 7 Janvier 2016

Par BRANCOURT Déborah

**Investigations phytochimiques de la graine de *Camelina sativa*
par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)
et résonance magnétique nucléaire (RMN)**

JURY

Président : M. MESNARD François

Membres : M. MOLINIE Roland

M. QUERO Anthony

Mme DE MOOR Anne-Laure

Thèse n°3087

REMERCIEMENTS

A Monsieur Roland Molinié, qui fut pour moi un directeur de thèse attentif et disponible. Merci pour ses précieux conseils.

A Messieurs Eric Gontier et François Mesnard, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Biologie des Plantes et Innovation (BIOPI EA3900), et à ce dernier pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.

A Madame Anne-Laure De Moor, pour avoir accepté d'assister à la présentation de ce travail.

A Monsieur Anthony Quéro, pour ses conseils, ses encouragements, et sa bonne humeur.

A Messieurs David Mathiron, Jean-Xavier Fontaine, Emmanuel Petit, pour leur contribution et leur aide précieuse.

A mes amis, en particulier Jonathan, Claire et Anthony, pour tous les moments partagés depuis plusieurs années. A Ahmed, pour son soutien infaillible.

A mon père, pour sa bienveillance, et à ma mère, pour son soutien moral irremplaçable et inconditionnel, ses multiples encouragements et sa confiance de tous les instants.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAUX	5
LISTE DES ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION GENERALE	7
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	9
INTRODUCTION	9
I) ETUDE BOTANIQUE	10
II) COMPOSITION PHYTOCHIMIQUE DE LA GRAINE DE CAMELINE	13
II-1) COMPOSITION EN POLYPHENOLS	14
II-1-1) Caractérisation biochimique des polyphénols	14
II-1-2) Principales classes de polyphénols.....	15
II-1-2-1) Flavonoïdes	15
II-1-2-1-1) Définition.....	15
II-1-2-1-2) Structure.....	16
II-1-2-1-3) Méthodes d'analyse	16
II-1-2-1-4) Composition quantitative chez <i>Camelina sativa</i>	17
II-1-2-1-5) Activités biologiques	17
II-1-2-2) Tanins condensés	19
II-1-2-2-1) Définition.....	19
II-1-2-2-2) Structure.....	19
II-1-2-2-3) Méthodes d'analyse	19
II-1-2-2-4) Composition quantitative chez <i>Camelina sativa</i>	19
II-1-2-2-5) Activités biologiques	20
II-1-2-3) Acides phénoliques	21
II-1-2-3-1) Définition.....	21
II-1-2-3-2) Structure.....	21

II-1-2-2-3) Méthodes d'analyse	22
II-1-2-3-4) Composition quantitative chez <i>Camelina sativa</i>	22
II-1-2-3-5) Activités biologiques	23
II-1-3) Propriétés pharmacologiques des polyphénols	24
II-2) COMPOSITION EN GLUCOSINOLATES.....	26
II-2-1) Définition	26
II-2-2) Structure.....	26
II-2-3) Méthodes d'analyse	27
II-2-4) Composition quantitative chez <i>Camelina sativa</i>	27
II-2-5) Activités biologiques.....	28
II-3) COMPOSITION EN ALCALOÏDES	29
II-3-1) Définition	29
II-3-2) Structure.....	29
II-3-3) Méthodes d'analyse	29
II-3-4) Composition quantitative chez <i>Camelina sativa</i>	30
II-3-5) Activités biologiques.....	30
II-4) AUTRES COMPOSES	31
II-4-1) Hydrates de carbones.....	31
II-4-2) Protéines	31
II-4-3) Inositol-phosphate	31
II-4-4) Composés inorganiques	32
II-4-5) Acides gras et tocophérols	33
II-4-6) Vitamines.....	34
III) PROPRIETES BIOLOGIQUES ET UTILISATIONS.....	35
III-1) Utilisation de l'huile.....	35
III-2) Utilisation des graines	38
III-3) Utilisation des tourteaux	38
IV) MODIFICATION DU CONTENU PHYTOCHIMIQUE.....	40
CONCLUSION.....	42

ETUDE EXPERIMENTALE	43
INTRODUCTION	43
I) MATERIELS ET METHODES	44
I-1) Matériel végétal.....	44
I-2) Produits chimiques	44
I-3) Extraction.....	44
I-4) Purification.....	44
I-5) Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)	46
I-6) Analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN)	46
II) RESULTATS	47
II-1) Identification des glucosinolates	47
II-1-1) Gluconesiliapanuculatine	47
II-1-2) Glucocamelinine	48
II-1-3) Glucoarabine	49
II-2) Identification des flavonoïdes.....	50
II-2-1) Isorhamnétine-3-O-rutinoside.....	50
II-2-2) Kaempférol-3-O-rutinoside	51
II-2-3) Rutoside.....	52
II-2-4) Epicatéchine-7-O- β -glucopyranoside	53
II-2-5) Quercétine-5b-O-sinapyl-2"-O-apiosyl-3-O-rutinoside	57
III) DISCUSSION	61
CONCLUSION	63
CONCLUSION GENERALE	64
BIBLIOGRAPHIE	66

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure florale des Brassicacées	10
Figure 2. Organisation structurale de la plante <i>Camelina sativa</i>	12
Figure 3. Flavonoïdes aglycones retrouvés dans les cultures de Brassicacées	16
Figure 4. Acides hydroxycinnamiques retrouvés dans les cultures de Brassicacées	21
Figure 5. Structure chimique des glucosinolates décrits dans la graine de Cameline	26
Figure 6. Structure et données de ¹ H-RMN de la sinapine dans le DMSO-d ₆	29
Figure 7. Système de colonne basse pression sur résine Amberlite™ XAD16N	45
Figure 8. Spectre MS/MS du 11-méthylsulfinyl-undecylglucosinolate	47
Figure 9. Spectre MS/MS du 10-méthylsulfinyl-decylglucosinolate	48
Figure 10. Spectre MS/MS du 9-méthylsulfinyl-nonylglucosinolate	49
Figure 11. Spectre MS/MS de l'isorhamnétine-3-O-rutinoside	50
Figure 12. Spectre MS/MS du kaempférol-3-O-rutinoside	51
Figure 13. Spectre MS/MS du rutoside	52
Figure 14. Spectre MS/MS de l'épicatéchine-7-O-glucopyranoside	53
Figure 15. Spectre ¹ H-RMN de (-)-épicatéchine-7-O-β-D-glucopyranoside.....	56
Figure 16. Spectre MS/MS de la quercétine-5b-O-sinapyl-2''-O-aposyl-3-O-rutinoside	57
Figure 17. Spectre 1H-RMN de la quercétine-5b-O-sinapyl-2''-O-aposyl-3-O-rutinoside	60
Figure 18. Chromatogramme type obtenu par LC-MS.....	62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Gradient utilisé pour l'étape de purification en HPLC préparative	45
---	----

LISTE DES ABREVIATIONS

CD₃OD : méthanol deutéré

CH₃CN : acétonitrile

CH₃OH : méthanol

COSY : spectroscopie corrélée (COrelated SpectroscopY)

D₂O : oxyde de deutérium

Da : dalton

DEPT : augmentation d'intensité par transfert de polarisation sans distorsion du signal
(Distortionless Enhanced Polarization Transfer)

ESI : source électrospray (Electrospray Ionization)

FWHM : largeur à mi-hauteur (Full width at half maximum)

HCOOH : acide formique

HMBC : corrélation hétéronucléaire de liaison multiple (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

HRMS : spectrométrie de masse à haute résolution

HSQC : corrélation hétéronucléaire de simple quantum (Heteronuclear Single Quantum Correlation)

J : constante de couplage

JRES : spectroscopie *J* résolue (*J*-REsolved Spectroscopy)

KH₂PO₄ : dihydrogénophosphate de potassium

LC-MS : chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse

m/z : masse sur charge

MS/MS : spectrométrie de masse en tandem

RMN : résonance magnétique nucléaire

rpm : rotation par minute

TMSP : acide triméthylsilyle propionique

TOCSY : spectroscopie de corrélation totale (TOtal Correlation SpectroscopY)

δ_C : déplacement chimique du carbone

δ_H : déplacement chimique du proton

INTRODUCTION GENERALE

La cameline, également appelée « Sésame d'Allemagne », « Faux lin » ou « Or de plaisir », est issue de la famille des Brassicaceae, anciennement nommée Crucifères, importante famille de plantes dicotylédones. Connue pour être une source riche en acides gras essentiels, tels que les acides linoléiques, α -linoléiques (Ω -3), cette plante, proposant de nombreuses utilisations, n'est pourtant actuellement pas cultivée à grande échelle. La culture de la cameline mérite toutefois une attention particulière, en raison de son faible impact sur l'environnement et de l'applicabilité universelle de ses sous-produits, et pourrait également constituer une alternative pour les usages non alimentaires [1, 2].

Les graines oléagineuses, connues pour leurs propriétés anti-oxydantes et lipophiles grâce à la présence de tocophérols, assurent la production de composés phénoliques, essentiellement polaires, tels que les dérivés hydroxylés d'acides benzoïques et cinnamiques, la coumarine, les composés flavonoïdes et les lignines. Les tourteaux de cameline, obtenus grâce à l'extraction d'huile à partir des graines, constituent des sous-produits particulièrement riches en protéines, utilisés dans l'alimentation animale ou comme agents fertilisants [3, 4, 5, 6].

Les métabolites secondaires des végétaux sont principalement répartis en trois classes : les terpènes, les composés phénoliques, les alcaloïdes. Il est à noter que la distribution des polyphénols au sein de la cameline n'est pas uniforme. Ceux-ci forment un grand groupe de composés phytochimiques très répandus dans le règne végétal. Selon leur structure, ils peuvent être classés en phénols simples, acides phénoliques, flavonoïdes et dérivés d'acides hydroxycinnamiques. Potentiellement protecteurs contre le cancer et les maladies cardiaques, en raison de propriétés anti-oxydantes et de leur ubiquité dans une large gamme d'aliments d'origine végétale couramment consommés, ils sont source de composés bénéfiques pour la santé humaine, et sont associés également aux caractéristiques de saveur et de couleur des fruits et légumes [7, 8]. Chaque organe ou extrait d'organe de plante est depuis toujours utilisé pour traiter maladies et autres dérèglements de l'organisme humain et animal. L'industrie pharmaceutique doit son

développement aux progrès liés à la caractérisation et la purification de composés chimiques physiologiquement actifs à partir de plantes, champignons et bactéries [7].

Cette étude vise donc à identifier le profil de différents composants phytochimiques issus des graines de cameline, notamment en caractérisant plus finement le contenu phénolique grâce aux analyses LC-MS et RMN. Le contexte botanique sera d'abord rappelé, avant d'étudier la composition phytochimique et les propriétés et utilisations de l'huile, des graines et des tourteaux à travers la description des principales classes de composés. Une étude expérimentale permettant d'analyser plus précisément le contenu en glucosinolates et flavonoïdes sera ensuite détaillée.

Introduction

Les composés produits par les plantes sont divisés en métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires sont des molécules de base de la cellule, nécessaires à la vie de la plante, tandis que les métabolites secondaires ne sont pas nécessaires à la reproduction et au maintien des cellules vivantes. Leur rôle est de permettre une médiation entre la plante et l'environnement afin de se protéger contre l'infection microbienne, le stress hydrique, lumineux, etc [9, 7]. Ces substances phytochimiques sont caractéristiques de chaque espèce végétale et sont classées par leurs voies de biosynthèse : les terpènes (isoprénoïdes), les composés phénoliques (phénylpropanoïdes et polyphénols), et les alcaloïdes. On y trouve également d'autres classes, telles que les glucosinolates, ou encore des composés azotés, qui concernent uniquement quelques familles de plantes [9, 7]. Les polyphénols, grande famille d'antioxydants regroupant plus de six mille molécules, sont dispersés dans tout le règne végétal. Il est à noter également que l'alimentation en fournit environ 1 g par jour [3].

De nombreux composés s'accumulent au sein des graines de cameline, tels que les terpénoïdes présents dans la fraction d'huile, les tanins, les flavonoïdes et autres polyphénols, ainsi que des glucosinolates. Elles présentent également des teneurs élevées en acides gras polyinsaturés, des antioxydants lipophiles tels que les tocophérols, mais aussi des protéines et vitamines [3].

I) Etude botanique

Le genre *Camelina* appartient à famille des Brassicacées, composée de 350 genres, tels que la Cameline, Crambe, Sinapis, Thlaspi et Brassica, et environ 3500 espèces [8, 9]. Les fleurs des Brassicacées sont organisées de manière très spécifique: la corolle est formée de quatre pétales disposés en croix, les feuilles sont le plus souvent alternées et exemptes de stipule, le calice est généralement formé de quatre sépales et l'androcée compte le plus souvent six étamines tétradynames. Deux carpelles composent le gynécée, et le fruit est appelé silique ou silicule. La cartographie génétique du génome de *Camelina sativa* indique une structure polyploïde ou dupliquée [10].

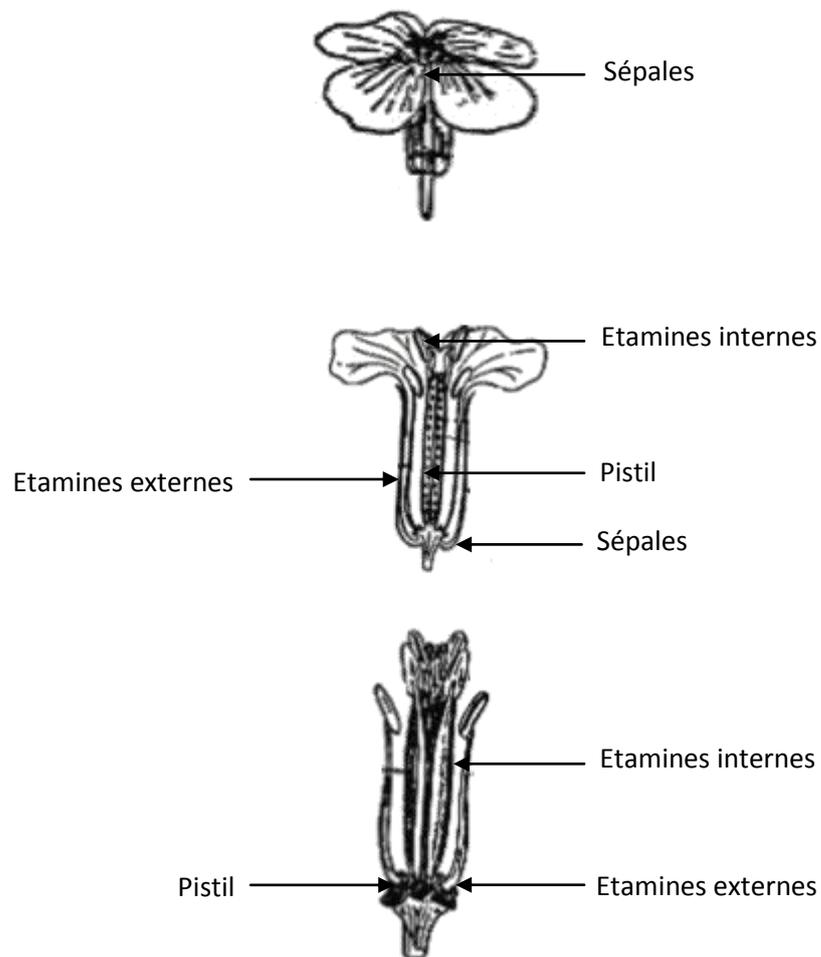


Figure 1. Structure florale des Brassicacées [10]

La cameline est parfois aussi appelée: cameline faux-lin, cameline ciliée, faux-lin de l'Ouest, lin bâtard, petit lin, sésame bâtard, sésame d'Allemagne. Sa systématique et sa position taxonomique peuvent être répertoriées de la façon suivante [11] :

- Règne : végétal
- Sous-règne : Trachéobiontes, correspondant aux plantes vasculaires
- Sous-embranchement : Spermatophytes, plantes à graines
- Embranchement : Magnoliophytes, plantes à fleurs
- Classe : Magnoliopsides, dicotylédones
- Sous-classe : Dilléniidées
- Ordre : Capparales
- Famille : Brassicacées
- Genre : *Camelina Crantz*, Camelines
- Espèce : *Camelina sativa* (L.) Crantz, cameline cultivée.

La cameline est une plante herbacée annuelle, de récentes études indiquent toutefois un potentiel commercial plus important pour les cultures d'été [2, 11]. Elle se caractérise par un cycle de croissance relativement court d'environ 110 jours, la plante peut émerger dans les 7 à 10 premiers jours si les conditions sont optimales [11, 12]. La cameline peut atteindre une hauteur de 70 à 100 cm. Elle est composée de feuilles basilaires, non lobées et déjà flétries au moment de la floraison, formant une rosette qui deviendra la base d'une tige dressée munie de nombreuses feuilles. Les feuilles situées sur la tige sont alternes, lancéolées et sessiles. Elles atteignent parfois une longueur de 8 cm et une largeur de 10 mm. La tige devient ligneuse à mesure que la plante arrive à maturité [11, 12]. Quatre pétales spatulés forment la corolle. Les fleurs jaune pâle, d'un diamètre de 5 mm, sans bractées, comportent trois paires d'étamines [2]. Piriformes, les fruits mesurent environ 8 mm. Chaque silique peut abriter jusqu'à 25 graines jaune orangé [11, 2]. Les graines, très petites, renferment environ 40% d'huile et 30% de protéines [11]. L'auto-pollinisation est le mode de fécondation prédominant [2, 13].

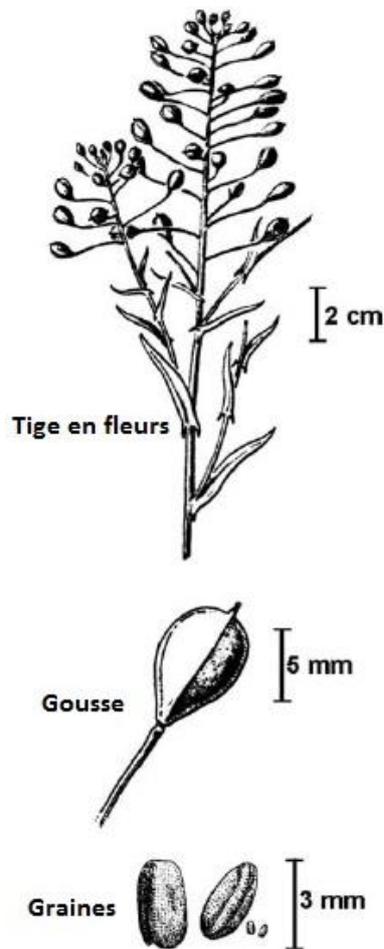


Figure 2. Organisation structurale de la plante *Camelina sativa* [11]

Cultivée au Néolithique dans le nord de l'Europe et le sud de l'Asie, la culture de la cameline est à son apogée à l'Âge de fer. A cette époque elle est utilisée dans l'alimentation humaine, avec le lin et les céréales. Sa culture connaît un déclin à partir du Moyen-Âge puis suscite de nouveau l'intérêt dans les années 1990 [7, 11, 12, 13]. Résistante et sobre, la cameline s'accommode des climats froids et semi-arides. La répartition géographique de la cameline à l'état naturel se limite essentiellement aux prairies, aux champs de céréales, de lin ou de luzerne, ou aux bordures de route [11, 14].

II) Composition phytochimique

Les graines peuvent contenir jusqu'à 40% d'huile, riche en acides gras polyinsaturés oméga-3 et oméga-6, ainsi qu'en antioxydants liposolubles, tels que les tocophérols. D'autres classes de composés caractérisent la graine de cameline, parmi lesquelles la grande famille des polyphénols, comprenant notamment les flavonoïdes, tanins condensés et acides phénoliques, mais également des glucosinolates, alcaloïdes et d'autres composés tels que protéines. L'extraction mécanique de l'huile donne une farine de graines, les tourteaux, composée majoritairement de protéines, mais également de constituants phytochimiques comme les glucosinolates, les flavonols, les acides phénoliques. Alors que la composition de l'huile et son usage ont été décrits dans de nombreuses études, les graines et la farine de graines n'ont pas encore été précisément étudiées pour leur utilisation potentielle dans l'alimentation animale ou humaine [7].

II-1) Composition en polyphénols

II-1-1) Caractérisation biochimique des polyphénols

Les composés phénoliques sont produits dans les plantes sous forme de métabolites secondaires, par l'intermédiaire de la voie de l'acide shikimique. La phénylalanine ammonia-lyase (PAL) est l'enzyme clé qui catalyse la biosynthèse des composés phénoliques à partir de la phénylalanine, acide aminé aromatique [8, 17]. Permettant notamment aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets et les agents pathogènes, les polyphénols constituent des moyens de défense contre les stress biotiques et abiotiques. Leurs propriétés permettent également à l'industrie agro-alimentaire de les utiliser comme agents de conservation, additifs, colorants ou arômes [8].

De faible poids moléculaire, les composés phénoliques sont de formes variées, allant des composés aromatiques simples aux tanins complexes et dérivés de polyphénols. Leur structure chimique de base est constituée d'au moins un noyau aromatique, sur lequel sont attachés un ou plusieurs groupes hydroxyles. Leur classification s'effectue en deux catégories, en fonction du nombre et de la disposition de leurs atomes de carbone. Les flavonoïdes regroupent les flavonols (dérivés du kaempférol, de la quercétine, la myricétine et ou de l'isorhamnéthine), les flavones, les anthocyanidines, les flavanones, les isoflavones. Les tannins condensés ou proanthocyanidines (constitués d'unités flavan-3-ols) sont parfois classés dans le groupe des flavonoïdes au sens large. Les composés non-flavonoïdes rassemblent les acides phénoliques, les hydroxycinnamates, les stilbènes... Ils sont généralement conjugués à des sucres et des acides organiques [8].

Les composés phénoliques peuvent également être répartis en fonction de leur dérivé : les acides phénoliques dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque (avec une structure de base en C6-C1), fréquemment à l'état libre mais aussi combinés à des esters ou glycosides (acide gallique); et les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique (en C6-C3) tels que l'acide coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique, souvent estérifiés [16].

II-1-2) Principales classes de polyphénols

II-1-2-1) Flavonoïdes

II-1-2-1-1) Définition

Les flavonoïdes constituent un groupe de dérivés naturels de benzo- γ -pyrane et sont essentiels à la photosynthèse. Selon le degré d'oxydation du noyau pyrane central, ils peuvent être subdivisés en plusieurs classes de flavonoïdes et composés apparentés : flavones, flavanones, flavonols, isoflavones, flavanes, flavanols, et anthocyanes. Le noyau pyrane peut être ouvert pour former la classe des chalcones, et se reformer en un cycle furane pour obtenir les aurones [16].

Les flavonols constituent la sous-classe la plus importante de flavonoïdes. La quercétine, le kaempférol et l'isorhamnétine sont les principaux flavonols présents chez les Brassicacées [16]. Les flavonols peuvent être libres, sans oses accrochés, mais sont généralement liés par une liaison O-glycoside. Plus de 80 oses différents, monosaccharides, disaccharides, trisaccharides ou même tétrasaccharides, peuvent être liés en différentes positions, mais principalement en position 3. De ce fait, par exemple, 179 formes différentes de glycosides de la quercétine ont été décrites jusqu'à présent [17].

Les anthocyanes constituent une autre sous-classe très importante de flavonoïdes. Les anthocyanes libres, sans oses accrochés, sont appelés anthocyanidines, principalement représentés par la delphinidine, la pétonidine, la péconidine, la pélanidine, la malvidine et la cyanidine, celle-ci étant la plus commune chez les Brassicacées [8, 22, 23]. Ils sont cependant, comme les flavonols, le plus souvent présents sous forme liée à des oses [17].

II-1-2-1-2) Structure

Ces composés polyphénoliques sont composés de deux cycles aromatiques reliés par trois carbones : C6-C3-C6. Ils sont le plus souvent conjugués au glucose, ou à différents acides hydroxycinnamiques, en position 3, mais les substitutions peuvent également se produire aux positions 5, 7, 4', 3' [8, 18].

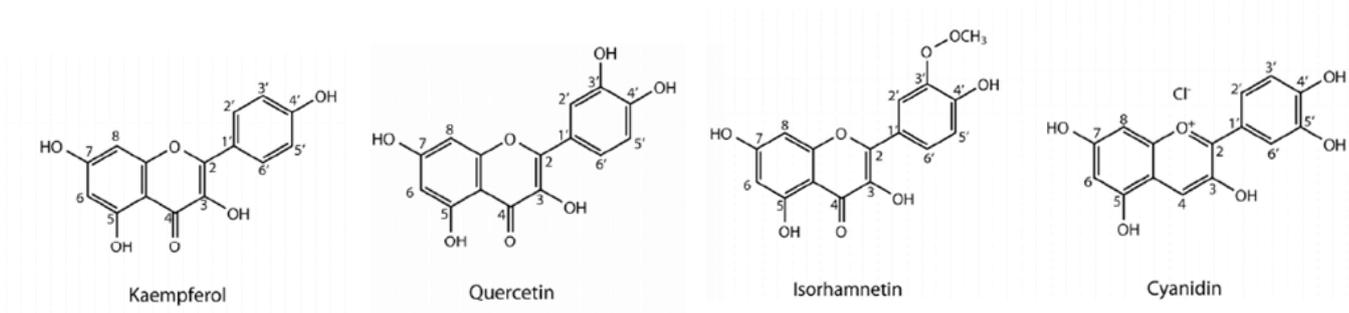


Figure 3. Flavonoïdes aglycones retrouvés dans les cultures de Brassicacées. [8]

II-1-2-1-3) Méthodes d'analyse

L'imprécision des méthodes d'analyse provient essentiellement des techniques de préparation des échantillons, ne permettant pas l'extraction maximale des composants, ou favorisant la perte des composés d'intérêt par dégradation ou altération chimique ou physique. La meilleure méthode de préparation des échantillons semble débiter par des échantillons secs, afin de les broyer en poudre aussi fine et uniforme que possible, avec apport minimal de chaleur [17, 30]. Une hydrolyse acide peut être utilisée afin de déterminer les concentrations en flavonols et anthocyanes dans les plantes. Les génines sont solubles dans les solvants organiques peu polaires, tandis que les hétérosides le sont dans l'eau et les alcools [32, 33]. L'extraction, généralement appliquée pour éliminer les composés non phénoliques, s'effectue de manière optimale à l'aide de mélange d'eau et de méthanol ou éthanol dont la proportion peut varier [1]. Le choix du solvant est en effet essentiel, puisque les capacités d'extraction diffèrent selon le solvant utilisé. L'étape de purification est nécessaire afin d'empêcher l'encrassement de la colonne et les interférences avec les différents analytes [3]. La séparation est généralement réalisée par

chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), et la détection est effectuée à 367 nm [16].

II-1-2-1-4) Composition quantitative chez *Camelina sativa*

De nombreux flavonoïdes sont synthétisés et utilisés par les feuilles, tiges, racines, et fleurs de cameline. Dans les graines matures, les dérivés de la quercétine représentent les principaux flavonoïdes de la graine de cameline [7, 8, 9]. Agissant en puissants antimicrobiens, ces flavonoïdes sont présents en grande quantité dans le tourteau, par rapport aux acides hydroxycinnamiques, hormis la catéchine présente à un faible pourcentage. Ils contribuent ainsi à l'activité antioxydante, en particulier en ce qui concerne les glycosides de quercétine [9, 20, 21]. Des concentrations supérieures de catéchine et quercétine sont retrouvées dans le tourteau par rapport à la graine. Quant à l'huile, de faibles quantités de flavonoïdes y sont détectées [3]. Sur la base de mesures spectrométriques, la quantité totale de flavonoïdes dans un extrait de graines a déjà été évaluée à 143 mg/g. Enfin, à partir de méthodes spectrométriques et chromatographiques, les flavonoïdes suivants ont été récemment identifiés dans la graine de cameline, sur un total de 1,61% de flavonoïdes et composés phénoliques : quercétine-2''-O-apiosyl-3-O-rutinoside (0,27%), flavone di-glucoside (0,11%), quercétine-3-O-rutinoside ou rutine (0,52%), isorhamnétine-O-rutinoside (0,08%), kaempférol-O-rutinoside (0,07%), quercétine-O-sinapyl-2''-O-apiosyl-3-O-rutinoside (0,05%) dont les positions de l'acide sinapique et de l'apiose ne sont pas encore confirmées. Ces résultats ont été obtenus après purification par HPLC et analyses par LC-MS puis RMN [7].

II-1-2-1-5) Activités biologiques

Présents à des concentrations élevées dans l'épiderme des feuilles et des fruits, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires impliqués dans divers processus, tels que la protection UV, la pigmentation, la stimulation de nodules fixateurs d'azote, la reproduction des plantes, l'absorption des minéraux et la résistance aux agents pathogènes [16]. Ils peuvent inhiber, et parfois induire, une grande variété de systèmes enzymatiques de mammifères; certaines de ces enzymes sont impliquées dans des voies qui régulent la division et la prolifération cellulaire, l'agrégation plaquettaire en modifiant le métabolisme

de l'acide arachidonique, et les réponses immunitaires, grâce à des propriétés antiallergiques en inhibant des enzymes favorisant la libération d'histamine [16]. En exerçant une activité « vitaminique P », les flavonoïdes renforcent la résistance vasculaire et leurs propriétés veinotoniques et vasculoprotectrices sont largement développées dans le secteur pharmaceutique. Enfin, de nombreux flavonoïdes fournissent des propriétés antioxydantes naturelles aux plantes et aliments [7, 20]. Une alimentation riche en flavonoïdes présente de nombreux avantages notamment dans la prévention de maladies cardio-vasculaires [16].

Les flavonols sont impliqués dans une vaste gamme de fonctions biologiques. La quercétine, représentant majeur de la sous-classe des flavonols, possède la capacité d'inhiber l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) en piégeant des radicaux libres et en agissant comme chélateur d'ions de métaux de transition. Par conséquent, ce composé peut faciliter la prévention de certaines maladies, comme le cancer, l'athérosclérose et l'inflammation chronique en retardant le processus de dégradation oxydative, grâce à ses effets antioxydants, antiagrégants et vasodilatateur. Le rutoside est un diglycoside de la quercétine, le quercétol 3-O-rutinoside, connu pour ses propriétés vasoconstrictrices utilisées dans la composition de plusieurs spécialités pharmaceutiques. Il fait en effet l'objet d'une monographie à la Pharmacopée européenne et son usage pharmaceutique est principalement reconnu dans les indications suivantes : manifestations fonctionnelles de l'insuffisance veinolymphatique et traitement symptomatique des troubles fonctionnels de la fragilité capillaire. Les dérivés en 3-methoxy-quercétine quant à eux sont connus pour inhiber l'acétylcholinestérase (AChE) et le kaempférol est un puissant antioxydant [3, 8, 9, 20, 21].

II-1-2-2) Tanins condensés

II-1-2-2-1) Définition

Les tanins condensés, également appelés proanthocyanidines, représentent l'une des classes de polyphénols hydrosolubles la plus répandue au sein du règne végétal [16].

II-1-2-2-2) Structure

Les tanins condensés sont des polymères, avec une structure de base de type flavan-3-ol, flavan-3,4-diol, ou un mélange des deux. Les flavan-3-ols sont souvent appelés catéchines, molécules possédant deux atomes de carbone asymétriques dans les positions C-2 et C-3. Les flavan-3,4-diols appartiennent à une classe de composés appelés leucoanthocyanes, comportant des carbones asymétriques en position C-2, C-3 et C-4 [12].

II-1-2-2-3) Méthodes d'analyse

L'analyse des tanins condensés et composés monomères s'effectue généralement à partir d'une extraction d'échantillons à 70% d'acétone, une évaporation à sec et dissolution dans du méthanol. Le réactif utilisé est composé de chlorure d'hydrogène et de vanilline. Celui-ci est spécifique des flavanols et dihydrochalcones. Les proanthocyanidines peuvent être analysées par spectrophotométrie-UV, basée sur l'hydrolyse acide et l'apparition d'une coloration. Le temps de réaction est de 20 minutes à l'obscurité et l'absorbance peut être lue à 500 nm ou 540 nm selon les études [15, 18].

II-1-2-2-4) Composition quantitative chez *Camelina sativa*

Dans les tourteaux, la quantité moyenne de tanins condensés varie de 1,0 à 2,4 mg/g, environ 30-60% de moins que dans les graines, mais plus élevée que dans la graine de soja ou de tournesol. Le contenu total est cependant relativement faible, par conséquent l'effet

antinutritionnel des tanins est négligeable. Outre la variation attribuée à l'origine des graines et au lieu de culture, les divers cultivars présentent de grandes différences concernant la teneur en tanins condensés en fonction des saisons, les variétés cultivées en hiver contenant un plus haut taux de tanins [7, 12, 15].

II-1-2-2-5) Activités biologiques

Les tanins condensés sont considérés comme des composés indésirables dans l'alimentation humaine. Ils sont en effet capables de former des complexes solubles et insolubles avec les protéines, acides aminés essentiels, polysaccharides et autres macromolécules provenant de l'alimentation, réduisant ainsi leur biodisponibilité et la valeur nutritionnelle des aliments [8]. Cet effet de réduction de la digestibilité est étudié notamment pour l'alimentation animale [25]. Ils présentent également des propriétés astringentes, anti-inflammatoires et veinotoniques [8]. Une augmentation de la production de tanins est généralement associée à un stress de la plante. Par conséquent, leur rôle biologique au sein des plantes est supposé contribuer à la protection contre les infections causées par les insectes. Cette caractéristique serait apportée par l'hydroxyle phénolique [12].

II-1-2-3) Acides phénoliques

II-1-2-3-1) Définition

Les acides phénoliques, présents dans de nombreuses plantes et aliments végétaux, sont caractérisés par la présence d'une fonction carboxylique et d'un hydroxyle phénolique [10].

II-1-2-3-2) Structure

Il existe des acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque, constitués d'un squelette à sept carbones avec une structure en C6-C1, ou dérivés de l'acide cinnamique, en C6-C3 [10]. Les dérivés de l'acide cinnamique sont présents dans de nombreux fruits et légumes, dont les formes les plus courantes sont : les acides *p*-coumarique, sinapique et férulique, souvent conjugués avec d'autres sucres ou d'autres acides hydroxycinnamiques [3, 8, 20, 21].

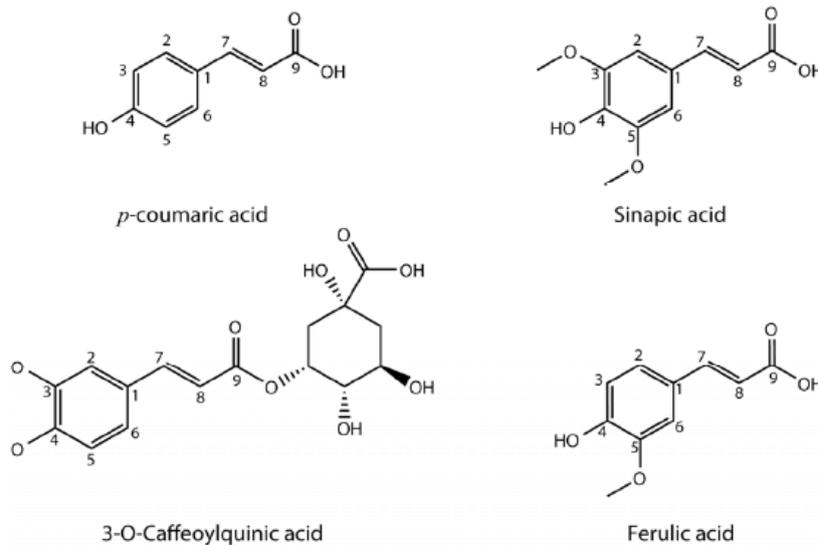


Figure 4. Acides hydroxycinnamiques retrouvés dans les cultures de Brassicacées [8].

II-1-2-2-3) Méthodes d'analyse

Les acides phénoliques sont généralement solubilisés par les hydrogencarbonates. L'extraction se réalise en milieu acide, ce qui rend possible des extractions sélectives afin de permettre par exemple une extraction flavonoïdes/acides phénoliques. L'analyse des acides phénoliques peut s'effectuer par chromatographie sur couche mince, dont le solvant est le plus souvent acide. Le réactif utilisé est composé de chlorure de vanilline. Pour la chromatographie liquide phase inverse, l'élution se réalise avec des mélanges d'eau, alcool, acides. L'extraction se fait le plus souvent au méthanol [1, 20].

II-1-2-3-4) Composition quantitative chez *Camelina sativa*

La distribution des composés phénoliques dans les plantes aux niveaux tissulaire, cellulaire et sub-cellulaire n'est pas uniforme. A partir de méthodes spectrométriques et chromatographiques, les acides phénoliques suivants ont été récemment identifiés dans la graine de cameline, sur un total de flavonoïdes et composés phénoliques de 1,61% : dérivés de l'acide chlorogénique (0,07%), acide ellagique (0,11%), acide sinapique (0,10%) [7]. Une étude analysant les composés phénoliques dans les graines, les tourteaux et l'huile de *Camelina sativa*, publiée en 2012, confirme les propriétés antioxydantes de plusieurs composés : trois acides hydroxybenzoïques (les acides protocatéchique, p-hydroxybenzoïque et salicylique), ainsi qu'un acide hydroxycinnamique (l'acide sinapique) [3]. Même si des études moins récentes ne détectent aucun acide hydroxybenzoïque, toutes s'accordent à détecter la présence d'acide sinapique, l'un des principaux composants antioxydants du tourteau [26]. Seul l'acide sinapique semble conserver dans l'huile en quantités relativement abondantes, tandis que les pourcentages d'acides salicylique, protocatéchique et p-hydroxybenzoïque sont beaucoup plus faibles. Par ailleurs, la quantité de ces acides phénoliques augmente de manière significative dans le tourteau par rapport à la graine, ceux-ci semblant être libérés par traitement thermique [3]. L'acide ellagique, autre antioxydant important retrouvé dans la graine de cameline, est un polyphénol composé de quatre groupements OH, lui procurant un fort potentiel de piégeage des radicaux. Egalement transféré dans l'huile, cet acide, semblant être libéré lors de la torréfaction, est présent en quantité plus importante dans le tourteau que dans la graine [3]. Les dérivés 4-

vinyl de l'acide hydroxycinnamique, possédant eux aussi des propriétés antioxydantes importantes, peuvent être formés par décarboxylation enzymatique ou thermique. La température optimale pour celle-ci est comprise entre 110°C et 130°C, or la plupart des études utilisent une température plus basse, environ 90°C. Hautement volatils, ces composés sont retrouvés en plus faibles quantités dans le tourteau que dans les graines [20, 21]. Par ailleurs, aucun des dérivés de l'acide hydroxycinnamique n'est détecté dans l'huile [3].

II-1-2-3-5) Activités biologiques

Les acides phénoliques ont un rôle essentiel dans les mécanismes de défense et contribuent également à l'activité antioxydante de la cameline. Piégeurs de radicaux libres, ils joueraient donc un rôle dans la prévention de maladies chroniques cardiovasculaires et dégénératives liées à un stress oxydatif [23].

II-1-3) Propriétés pharmacologiques des polyphénols

Les composés phénoliques possèdent donc des fonctions multiples. Outre leur rôle dans la pollinisation en attirant les insectes, ils contribuent également au système de défense naturelle contre les insectes, les champignons, les virus et les bactéries et peuvent agir comme régulateurs d'hormones végétales [16]. Leurs effets positifs sur la santé sont aussi de plus en plus décrits dans la littérature. Connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antiallergiques et vasculaires, le rôle antioxydant des composés phénoliques reste le plus cité. Etroitement lié à la structure chimique des flavonoïdes et polyphénols, cette propriété se renforce avec l'augmentation du nombre de groupements hydroxyles [20, 18]. Les plantes riches en antioxydants intéressent de plus en plus l'industrie pharmaceutique, mais également l'industrie alimentaire, notamment dans le but de remplacer les antioxydants synthétiques, utilisés pour contrôler le rancissement par oxydation des lipides dans les aliments, principale cause de détérioration de la qualité [16].

Les composés phénoliques peuvent également jouer un rôle important dans la neutralisation de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). Les DRO interviennent dans les mécanismes de défense contre les infections, mais la production excessive de radicaux libres et ions oxygénés peut endommager les tissus. Ainsi, un déséquilibre au sein des membranes cellulaires ou intracellulaires des molécules peut provoquer la peroxydation des lipides. Ce stress oxydatif a été lié au développement de maladies cancéreuses, au vieillissement, à l'athérosclérose, aux processus inflammatoires et à certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. Par conséquent, des composés aux propriétés antioxydantes, tels que les polyphénols, sont considérés comme des agents protecteurs éventuels, retardant la progression de nombreuses maladies chroniques [6, 8].

Contrairement aux produits chimiques dont l'activité pharmacologique peut permettre de détruire les microbes et autres organismes pathogènes, les composés phytochimiques agissent autrement dans la prévention de maladies chroniques. Une combinaison optimale d'agents phytochimiques à partir d'une ou plusieurs espèces végétales, un apport défini ainsi que la régularité de la consommation, permettrait la prévention ou le ralentissement du développement de pathologies chroniques. Afin de

pouvoir comprendre ce processus, il est nécessaire d'obtenir un profil chimique complet des composants d'un organe de la plante grâce aux progrès constants des méthodes d'analyse [7].

II-2) Composition en glucosinolates

II-2-1) Définition

Les glucosinolates, d'abord connus en tant que glycosides d'huile de moutarde, sont des composés naturels anioniques riches en soufre, répandus dans de nombreuses plantes, en particulier au sein de la famille Brassicaceae [2, 16]. Ces métabolites secondaires sont représentés par 120 glucosinolates différents décrits jusqu'à présent. La biosynthèse des glucosinolates s'effectue en 3 étapes principales : d'abord par condensation avec l'acétyl-CoA, une isomérisation, puis une oxydation et décarboxylation [12].

II-2-2) Structure

La classification des glucosinolates s'effectue généralement par leur précurseur et le type de variation de la chaîne latérale. Les composés dérivés de l'alanine, l'isoleucine, la méthionine ou la valine sont appelés glucosinolates aliphatiques. Ceux dérivés de la phénylalanine ou de la tyrosine sont appelés glucosinolates aromatiques, et les dérivés du tryptophane (Trp) sont les glucosinolates indoles [12]. Trois principaux glucosinolates sont décrits dans les graines de cameline. La glucocamelinine, ou 10-méthyl-sulfinyl-décyle glucosinolate, est le glucosinolate prédominant. Les autres glucosinolates retrouvés sont le 9-méthyl-sulfinyl-nonyl glucosinolate et le 11-méthyl-sulfinyl-undécyl glucosinolate [2, 7, 15].

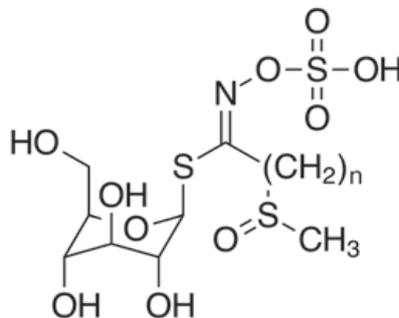


Figure 5. Structure chimique des glucosinolates décrits dans la graine de Cameline [7].

n = 9 : Glucoarabine (9-methylsulfinyl-nonyl-glucosinolate)

n = 10 : Glucocamelinine (10-methylsulfinyl-decyl-glucosinolate)

n = 11 : 11-methylsulfinyl-undecyl-glucosinolate

II-2-3) Méthodes d'analyse

L'extraction des glucosinolates et désulfoglucosinolates s'effectue généralement avec 70% de méthanol (v/v), à 75°C pendant 10 min, cette étape étant reproduite 2 fois. L'extrait brut obtenu est déposé sur une colonne Séphadex, qui est ensuite lavée avec de l'eau et un tampon d'acétate de sodium. Une séparation analytique peut être effectuée par HPLC à l'aide d'eau et 20% d'acétonitrile. Les désulfoglucosinolates sont détectés à 229 nm, tandis que les glucosinolates le sont à 237 nm [15, 16].

II-2-4) Composition quantitative chez *Camelina sativa*

Trois sulfinyles-glucosinolates sont décrits dans les graines et tourteaux de cameline. La glucocamelinine (10-méthyl-sulfinyl-décyle glucosinolate, GSL-2, 10-MSG) représente 62 à 72% du total en glucosinolates [2, 7, 15]. D'autres études l'évaluent plutôt à un taux de 50 à 60% [12]. Les autres glucosinolates retrouvés sont le 9-méthyl-sulfinyl-nonyl glucosinolate (9-MSG) et le 11-méthyl-sulfinyl-undécyl glucosinolate (11-MSG). Dans la plupart des publications, la teneur en 11-MSG est analysée comme plus élevée que celle en 9-MSG. Le contenu en glucosinolates totaux dans le tourteau varie généralement de 14,5 à 23,4 $\mu\text{mol/g}$, tandis que dans la graine il se situe entre 9 à 19 $\mu\text{mol/g}$ [25]. Le 10-méthyl-sulfinyl-décyle glucosinolate, ainsi que le 9-méthyl-sulfinyl-nonyl glucosinolate, sont également présents dans d'autres espèces, telles que *Arabis alpina*, *Capsella bursa-pastoris*, tandis que le 11-méthyl-sulfinyl-undécyl glucosinolate semble spécifique de la cameline [28].

La teneur en glucosinolates dans les tourteaux de cameline est relativement faible ou modérée par rapport à d'autres graines oléagineuses de la famille des Brassicaceae, en raison de la production potentiellement exclusive d'isothiocyanates non volatiles par l'hydrolyse enzymatique des glucosinolates de la cameline. Il est à noter également que les graines ne contiennent pas de progoitrine, qui forme la goitrine, un composé toxique. La formation d'homologues de la goitrine est peu probable, les génines des glucosinolates de la cameline ne contenant pas de groupements OH [2]. La teneur en glucosinolates dépend principalement de l'origine de la graine. Une interaction considérable semble agir entre le

génotype de la plante et l'emplacement dans lequel la culture évolue en ce qui concerne la teneur en glucosinolates [2, 7].

II-2-5) Activités biologiques

La cameline est caractérisée par la présence de substances mineures qui affectent la valeur de ses sous-produits. Ainsi, les glucosinolates sont des métabolites secondaires, dont les produits de dégradation sont connus pour présenter des propriétés anti-nutritives et effets toxiques chez les êtres humains et les animaux, à doses élevées. Cependant, à des doses sub-toxiques, ils peuvent avoir un rôle chimioprotecteur contre des agents cancérigènes, en bloquant le développement des tumeurs.

Les glucosinolates, localisés dans la vacuole, sont présents dans toutes les parties de la plante et véhiculent divers signaux aux insectes. Ce système de défense implique les thioglucosidases, communément appelées myrosinases. L'enzyme myrosinase libère du glucose en présence d'eau. La partie restante de la molécule est rapidement convertie en un thiocyanate, un isothiocyanate, ou un nitrile; ce sont les substances actives qui servent de défenses chimiques pour la plante. Les glucosinolates sont des molécules biologiquement inactives, contrairement à leurs produits de dégradation connus pour leurs effets biologiques variés. La toxicité des glucosinolates est donc généralement attribuée à ces molécules provenant du clivage enzymatique par la myrosinase. Elles peuvent par exemple rivaliser avec l'iode en inhibant son absorption par la compétition avec le symport de sodium/iodure. Ainsi, l'un des symptômes les plus courants de l'exposition aux glucosinolates est l'altération de la fonction thyroïdienne, entraînant son hypertrophie. De plus, l'irritation de la muqueuse gastro-intestinale, suivie d'une nécrose locale, une hépatotoxicité et néphrotoxicité ont été observées, généralement attribuées à la présence de nitriles [7, 12].

II-3) Composition en alcaloïdes

II-3-1) Définition

La sinapine est l'alcaloïde le plus présent au sein des graines oléagineuses de la famille des Brassicacées, et a été isolé pour la première fois dans la graine de moutarde noire [12].

II-3-2) Structure

La sinapine est également appelée sinapoylcholine, ou 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-cinnamoyl-choline [12].

II-3-3) Méthodes d'analyse

L'extraction de la sinapine est généralement réalisée avec 70% de méthanol. Après centrifugation et dilution, le mélange est passé sur une colonne afin d'obtenir une phase mobile constituée d'acide heptanesulfonique-1 sel de sodium, de dihydrogénophosphate de sodium, et 0,01 M de dibutylamine, dans un mélange acétonitrile/eau (02/08) à pH 2,0. L'absorbance peut être lue à 325 nm [25]. L'analyse est souvent effectuée par résonance magnétique nucléaire (RMN) et spectrométrie de masse (MS), obtenant ainsi la fragmentation suivante : m/z 310; 251; 207; 199; 175; 147 et 91 [3].

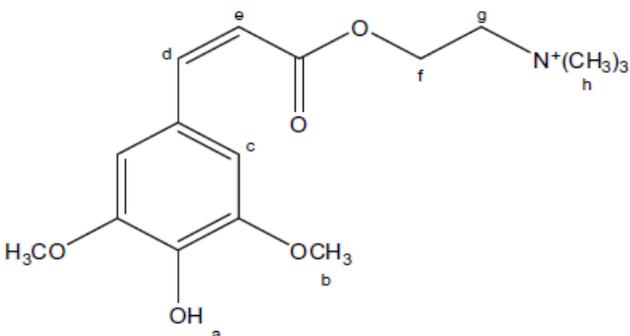
	Position	δ (ppm)
	a	9.04 (1H, b)
	b	3.80 (6H, s)
	c	7.03 (2H, s)
	d	7.60 (1H, d) $^3J_{de} = 15.9$ Hz
	e	6.55 (1H, d) $^3J_{de} = 15.9$ Hz
	f	4.57 (2H, m)
	g	3.72 (2H, m)
	h	3.17 (9H, s)

Figure 6. Structure et données de ^1H -RMN de la sinapine dans le DMSO- d_6 [3].

II-3-4) Composition quantitative chez *Camelina sativa*

L'acide sinapique ainsi que la sinapine sont présents en quantités considérables dans le tourteau de cameline [7, 20]. Le contenu en sinapine varie de 1,7 à 4,2 mg/g, cette variation dépendant essentiellement du lieu de culture. En raison de la compression et de l'accumulation de sinapine dans les résidus, la concentration est plus élevée dans le tourteau que dans la graine ou l'huile. Cependant, les graines et tourteaux d'autres plantes issues de la famille des Brassicacées présentent un taux de sinapine significativement plus élevé, comme le colza ou la moutarde (entre 7 et 13 mg/g) [3, 8, 12, 15, 20, 21].

II-3-5) Activités biologiques

Dérivée de l'acide sinapique et considérée comme un puissant antioxydant, la sinapine est l'ester phénolique le plus présent dans les graines de Brassicacées [25]. Les deux produits issus de l'hydrolyse de la sinapine semblent présenter une importance métabolique non négligeable dans les plantes, l'acide sinapique contribue en effet à la biosynthèse de la lignine et des flavonoïdes, et la choline intervient dans la méthylation biologique nécessaire à la synthèse de la membrane [12]. Récemment, l'utilisation de la sinapine comme composé aux propriétés anti-tumorales a été suggérée en raison de ses effets de radioprotection. La capacité d'une plante à accumuler la sinapine dans la graine est corrélée à sa taille, plus les graines sont grosses, plus elles accumuleront de sinapine [12].

II-4) Autres composés

II-4-1) Hydrates de carbones

Les hydrates de carbone retrouvés dans les tourteaux de cameline sont représentés par des mono-, di-, tri-, et tétra-saccharides. Les monosaccharides et disaccharides sont faciles à digérer par le corps humain et lui fournissent de l'énergie facilement métabolisable. Leur teneur est toutefois relativement faible, le saccharose s'élevant à environ 5,5%, concentration deux fois plus élevée que dans la graine de lin (2,8%), mais inférieure à celle de la graine de colza (6,8%). Le mucilage constitue la partie la plus importante, formant un gel par addition d'eau, et trouvant son utilité comme agent d'adhésivité ou gomme. Certains polysaccharides solubles peuvent contribuer à l'apport calorique, tandis que la fibre insoluble et les précurseurs phénoliques de lignine sont connus pour avoir des effets bénéfiques sur les processus gastro-intestinaux notamment [7, 12].

II-4-2) Protéines

La composition en acides aminés a été étudiée dans quelques études. La graine de cameline possède au minimum dix-huit acides aminés, dont neuf sont qualifiés d'essentiels : l'acide glutamique, l'acide aspartique, l'arginine, la leucine, la glycine, la valine, la proline, la sérine, l'alanine, la lysine, la thréonine, la phénylalanine, l'isoleucine, la tyrosine, l'histidine, la cystéine, la méthionine, le tryptophane. Aucun peptide allergène n'a été détecté [7]. De manière plus générale, les graines oléagineuses des Brassicacées comportent deux classes de protéines prédominantes : les globulines de type légumine (12S ou cruciférine) et les albumines de type napine (2S), qui représentent respectivement 60 et 20% du total de protéines contenues dans les graines matures [12].

II-4-3) Inositol-phosphate

L'acide phytique, ou inositol-héxaphosphate (IP6), présent au sein de la graine de cameline à environ 25-30 mg/g de matière sèche, est responsable de différents effets anti-nutritifs dans l'alimentation animale et humaine, en formant des complexes insolubles avec

des minéraux tel que le fer, le zinc, le magnésium et le calcium. Ces effets néfastes seraient dus aux propriétés de chélation de l'acide phytique, l'interaction avec des protéines ou la formation de complexes avec des enzymes digestives. Ses produits de dégradation sont l'inositol-pentaphosphate, le tétraphosphate et triphosphate. Aux effets anti-nutritifs s'ajoutent des propriétés hypocholestérolémiantes et antioxydantes. Les inositol-phosphates représentent la principale source de phosphore (P) dans les graines, 60 à 90% du phosphore sont en effet présents sous forme d'acide phytique [12]. Outre l'inositol phosphate IP6, majoritaire dans les graines et tourteaux de cameline, un faible taux d'inositol-pentaphosphate (IP5) a également été décrit (0,7-1,5 mg/g) [25].

II-4-4) Composés inorganiques

La présence de métaux lourds au sein des tourteaux de cameline est évaluée à 179,4 mg de cadmium par kg, 3,3 mg de nickel par kg et 68,8 mg de zinc par kg. Quant aux graines, elles contiennent respectivement 125,4 mg/kg, 2,4mg/kg et 49,9 mg/kg de cadmium, nickel et zinc. Le cadmium et le nickel ne sont pas essentiels au développement des organismes. A faible concentration, ils peuvent être fortement phytotoxiques et dangereux pour l'Homme. Le zinc quant à lui appartient au groupe des métaux lourds essentiels et est nécessaire à l'activité de plus de 200 enzymes. La teneur en zinc dans la graine de cameline est comparable à celle d'autres graines oléagineuses, telles que le colza, les graines de lin, de tournesol, de moutarde, de carthame et de soja [25].

Les teneurs en minéraux présents dans les graines et tourteaux de cameline représentent environ 1% pour le calcium, 0,5% pour le magnésium, 0,06% pour le sodium, 1,6% pour le potassium, 0,04% pour le chlore, 1,4% pour le phosphore, 0,2% pour le soufre, 0,03% pour le fer, 0,01% pour le cuivre, 0,004% pour le manganèse, et 0,0002% pour le nickel [7].

II-4-5) Acides gras et tocophérols

La teneur en acides gras et tocophérols s'évalue par l'analyse d'échantillons d'huile. Une étude datant de 2002 étudiant les effets des conditions de croissance sur les acides gras et les tocophérols dans l'huile de *Camelina sativa* a analysé 3 cultivars provenant d'une collection de 7 cultivars d'été, d'origines géographiques diverses telles que l'Europe centrale et l'Europe du Nord [12]. Ainsi, ont été déterminées les teneurs moyennes en acide oléique (14,9% du total en acides gras), acide linoléique (15,2%), acide α -linoléique (36,8%), acide gondoïque (15,5%), et acide érucique (2,8%) [12]. L'huile de cameline est connue pour être fortement insaturée. En effet, son contenu en acides gras polyinsaturés (AGPI) s'élève à environ 50%. Cette huile est qualitativement et quantitativement différente des autres huiles végétales. La présence d'acide gondoïque est également caractéristique de l'huile de cameline, bien que son rôle dans le métabolisme humain soit encore inconnu. La teneur en acide érucique est quant à elle inférieure à 5%, limite autorisée dans les huiles végétales destinées à la consommation humaine, en raison d'une possible altération du tissu cardiaque [12].

Les tocophérols sont quant à eux évalués à 28,07 ppm pour l' α -tocophérol, 742 ppm pour le γ -tocophérol, 20,47 ppm pour le δ -tocophérol et 14,94 ppm pour le plastochromanol-8. Ni le β -tocophérol ni les tocotriénols n'ont pu être détectés. Ainsi, la teneur moyenne en tocophérols totaux est définie à environ 806 ppm, ou 760 mg de tocophérols/kg d'huile de cameline, taux supérieur à celui d'autres huiles telles que les huiles de lin ou de colza. Ce sont des antioxydants naturels importants pour la stabilité à l'oxydation d'huiles végétales [12, 24]. Des différences qualitatives importantes sont toutefois à prendre en compte entre les différents échantillons d'huile au cours de l'évaluation de la concentration en acides gras et tocophérols. Ces variations s'expliquent principalement par les conditions climatiques et la composition du sol [1].

II-4-6) Vitamines

Les graines de cameline contiennent des quantités non négligeables de plusieurs vitamines. Mis à part la vitamine E connue pour être présente dans l'huile, les graines représentent une source importante de vitamines B, telles que la thiamine (B1), la niacine (B3), et l'acide pantothénique (B5) [1, 12].

III) Propriétés biologiques et utilisations

La biomasse végétale est de plus en plus valorisée pour des usages alimentaires, mais également non alimentaires. Les progrès en matière de caractérisation biochimique et physiologique des aliments d'origine végétale permettent une avancée considérable dans la recherche nutritionnelle, notamment dans le but d'empêcher ou retarder le développement de maladies chroniques chez les êtres humains et les animaux. Tandis que la composition chimique des différents produits de culture (semences, tourteaux, huile, feuilles, etc.) est fréquemment étudiée, le processus d'évaluation de chaque composé, isolé ou en mélange, pour l'analyse de leur fonction biologique dans la nutrition et la santé est depuis peu approfondi [2].

III-1) Utilisation de l'huile

La cameline bénéficie d'une très bonne adaptation au climat européen [2]. En application industrielle alimentaire ou non-alimentaire, sa culture est donc de plus en plus exploitée. En plus d'être appropriée à la consommation humaine, son utilisation présente un aspect économique intéressant [15, 26].

Caractérisée par un haut taux d'acides gras essentiels et d'oméga-3, l'huile de cameline contient cependant moins de triglycérides et de cholestérol que les graines [25]. La composition en acides gras est en effet qualitativement et quantitativement différente, avec une fraction insaponifiable non négligeable. Elle contient également des composés volatiles et semi-volatiles responsables de la saveur et de l'arôme, dont la concentration diminue avec l'augmentation de la durée de stockage, et l'élévation de température. L'huile brute est constituée d'environ 45% d'acides gras polyinsaturés, 35% d'acides gras monoinsaturés, 10% d'acides gras saturés, et jusqu'à 10% d'acides gras libres, tocophérols, stérols, terpènes et autres composés volatiles [7]. De couleur jaune d'or, l'huile de cameline est caractérisée par un léger arôme de noisette et peut être employée en cuisine en assaisonnement et pour la cuisson, mais est à éviter pour la friture. C'est l'importante quantité d'acides gras oméga-3 polyinsaturés qui constitue la base de l'utilisation de l'huile de cameline dans les domaines de l'alimentation et la cosmétique, pourtant sous-exploitée jusqu'ici [7]. En effet, produite à

partir des graines de cameline, elle est en partie utilisée comme huile comestible, et contribuerait ainsi à la réduction de triglycérides et mauvais cholestérol, mais également comme remède en médecine traditionnelle pour le traitement de l'estomac et ulcères duodénaux, ou en application par voie topique pour le traitement des brûlures, plaies et inflammations. L'huile de cameline peut aussi être employée pour la production de savons, ainsi qu'en tant que carburant de moteurs à l'huile végétale [2, 12].

De nombreuses recherches en matière de nutrition et de santé humaine confirment l'existence d'une corrélation entre le régime alimentaire et l'augmentation de la fréquence des maladies dans les pays industrialisés. La faible teneur en acides gras ω -3 dans le régime alimentaire est source importante de déficience nutritionnelle. Par conséquent, l'huile de cameline, qui constitue un excellent apport à la fois en acides gras polyinsaturés essentiels et en acides gras ω -3, peut augmenter la valeur biologique de l'alimentation par l'amélioration de l'équilibre n-6/n-3. Du point de vue nutritionnel, il est néanmoins important de noter que le profil d'acides gras dans l'huile de cameline peut varier [1, 3]. Les acides gras polyinsaturés majoritaires dans l'huile de cameline regroupent les acides α -linoléique, linoléique, oléique, 11Z-eicosénoïque, érucique, cis-11,14-eicosadiénoïque, eicosatriénoïque. Les acides palmitique, stéarique et arachidique sont les principaux acides gras saturés composant l'huile. En quantité plus minime, l'huile contient les acides 13Z, 16Z-docosadiénoïque, 10Z-heptadécénoïque, palmitoléique, nervonique, heptadecanoïque, hénéiosanoïque, béhénique, tricosanoïque et lignocérique [7].

Le profil d'acides gras recherché dépend essentiellement de l'utilisation de l'huile. Pour un lubrifiant, on recherchera des graines à teneur élevée en acides gras hydroxylés. Pour une huile alimentaire, des graines à teneur élevée en acide α -linoléique devront être analysées, dans le but d'améliorer la valeur nutritive de l'huile. En revanche, pour une meilleure stabilité oxydative de l'huile, des concentrations plus faibles en acide α -linoléique et autres acides gras insaturés seront recherchées. Également, cette stabilité peut être améliorée par augmentation de la concentration en composés antioxydants tels que le γ -tocophérol. La teneur en tocophérols est relativement faible par rapport aux huiles d'autres plantes, telles que le soja. Les principaux tocophérols présents dans l'huile de cameline sont les α -tocophérol, γ -tocophérol, δ -tocophérol et, en plus faibles quantités, le β -tocophérol.

De faibles quantités d'acides gras libres, environ 0,1 à 0,8%, ont été identifiées [7]. La quantité en composés insaponifiables (stérols et terpénoïdes non volatiles) varie entre 0,5 et 0,8% en poids d'huile de cameline : β -sitostérol, campestérol, cholestérol, brassiciastérol, γ -sitostérol, sitostanol, δ -5-avenostérol, δ -7-avenostérol, 14-methylergost-8-en-3-ol, stigmastérol, stigmasta-5,24-dienol, obtusifoliol, cycloarténol, 24-méthylèncycloartanol, α -1-sitostérol, 14-méthylfécostérol, 6-méthylcholest-5-en-ol, gramistérol + α -amyrin, β -amyrin, citrostadienol [7]. Des composés terpéniques non cycliques, tels que le squalène, phytol, squalane sont également décrits [7].

En matière de performance agronomique, c'est plutôt l'accroissement de la taille de la graine, mais aussi l'amélioration de la résistance de la plante aux conditions climatiques et aux herbicides qui seront étudiés [13, 27]. Les rendements en huile de cameline sont comparables à ceux d'autres plantes, telles que le colza, le soja, ou le tournesol. Peu de traitements sont encore nécessaires pour l'utilisation de coproduits afin de rendre la cameline économiquement viable [7]. En Amérique du Nord où elle représente une culture émergente, elle est surtout utilisée comme carburant biodiesel [7]. En effet, sa popularité croissante en tant que source de biocarburant valorise l'utilisation non alimentaire de cette plante grâce à l'obtention de sous-produits lors de l'extraction chimique de l'huile. Depuis plusieurs années, de nombreuses initiatives nationales et internationales ont vu le jour afin d'identifier de nouvelles sources d'énergie renouvelable, pour deux raisons principales : l'épuisement des énergies fossiles, comme le charbon, le pétrole brut, et le gaz naturel, et les émissions croissantes de gaz à effet de serre [12]. Le charbon fournit environ 28% de notre énergie. Le pétrole brut quant à lui fournit près de 20% de la consommation mondiale. Le délai d'épuisement de l'énergie fossile est estimé à 50 ans pour le pétrole, 70 ans pour le gaz naturel et 170 ans pour le charbon [12]. Le dioxyde de carbone (CO₂), le méthane (CH₄), l'eau sous forme de gaz (H₂O) et l'ozone (O₃) sont les composants du gaz à effet de serre. Les émissions de gaz à effet de serre augmentent d'environ 1,6% par an depuis plus de 30 ans. À l'heure actuelle, les deux principales sources d'émissions de CO₂ sont la combustion du charbon utilisé pour la production d'électricité et le pétrole utilisé pour le transport moteur [12]. C'est l'évolution des procédés catalytiques et de chauffage qui a permis le développement de son utilisation comme biodiesel. Ce carburant, semblable à celui obtenu

grâce à l'huile de soja, doit sa stabilité à son pourcentage élevé en esters méthyliques d'acides gras polyinsaturés et à l'ajout d'additifs antioxydants [7].

III-2) Utilisation des graines

Les graines de cameline contiennent des fibres, des protéines et des acides aminés essentiels tels que l'arginine, la lysine, la méthionine, la thréonine. Des composés volatiles et semi-volatiles y sont également identifiés, ainsi qu'une teneur non négligeable de métaux lourds, le cadmium, le nickel, le zinc qui assurent le bon fonctionnement des enzymes et protéines [5, 14, 15]. Ainsi, durant le Néolithique, les graines de cameline étaient utilisées pour la consommation humaine, en particulier dans la composition du porridge et du pain. Les fouilles archéologiques de la période de 500 ans avant JC à 300 ans après JC ont en effet pu révéler la part importante de la graine dans l'alimentation humaine. De plus, la culture ne nécessite pas ou peu d'application de pesticides ou herbicides, atouts considérables dans le domaine agrotechnique [13, 15].

III-3) Utilisation des tourteaux

Les tourteaux sont des résidus issus du traitement des graines de cameline après extraction de l'huile par pressoir mécanique, à l'aide de solvants tels que l'hexane, ou avec des technologies plus récentes, dites alternatives ou « vertes », grâce à l'emploi du dioxyde de carbone supercritique. Ce fluide présente l'avantage d'être un solvant totalement neutre, non toxique, non polluant, non inflammable et peu coûteux [7]. Ils se composent d'environ 10% d'huile résiduelle, 45% de protéines, jusqu'à 15% d'hydrate de carbone, 5% de minéraux, environ 0,2% d'acides nucléiques et un minimum de 10% de composants phytochimiques, tels que des glucosinolates, flavonoïdes, composés phénoliques et terpénoïdes [12]. Ils représentent donc des sous-produits qu'il est important de valoriser d'un point de vue économique en tant que source de protéines alimentaires. Cependant, selon la littérature ancienne, les régimes alimentaires à base de graines et tourteaux de cameline causeraient des effets indésirables. La directive de l'Union Européenne datant du mois d'Avril 1999 fixe donc des conditions strictes pour l'utilisation des tourteaux de cameline dans l'alimentation des animaux, du fait de la présence de substances indésirables

[31]. En effet, si les graines de cameline contiennent des acides aminés essentiels à haute valeur biologique, la présence de ces composés spécifiques antinutritionnels représente un facteur limitant pour l'exploitation des tourteaux comme aliment, en particulier pour la volaille [13, 15]. La teneur en glucosinolates en serait la cause, ceux-ci ne présentant pas d'effets toxiques pour les mammifères, mais certains de leurs produits issus du métabolisme enzymatique ont démontré une certaine toxicité [2]. L'intoxication suite à la consommation de plantes contenant des glucosinolates a été décrite chez plusieurs espèces d'animaux de ferme, les porcs étant les plus sensibles aux effets indésirables provoqués par les produits de dégradation des glucosinolates. Une réduction de la fertilité ainsi qu'un dysfonctionnement de la thyroïde ont été rapportés [12]. Auparavant considérée comme « impureté botanique » du fait de la présence de glucosinolates, une directive approuvée par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) en 2009 puis en 2013 confirme l'autorisation de l'utilisation des tourteaux de cameline dans l'alimentation animale, fixant toutefois un taux maximal à ne pas dépasser [12]. Outre les glucosinolates, la sinapine, l'acide phytique et les tanins condensés limitent également l'utilisation de la cameline dans l'alimentation animale, même si leur toxicité n'a pas été démontrée [12].

D'autres études affirment pourtant que les tourteaux conviennent à l'alimentation des ruminants, la ration devant toutefois être ajustée à chaque espèce animale, et la composition caractéristique en glucosinolates ferait de la cameline un atout fonctionnel dans l'utilisation nutraceutique [7]. L'alimentation à base de graines et tourteaux de cameline est en effet jugée intéressante du fait du ratio important en protéines à haute valeur énergétique, similaire au colza, mais également en terme de source de vitamines, oméga-3, acides gras, et autres substances biochimiques antioxydantes, telles que les composés phénoliques, tocophérols, acide sinapique, sinapine, flavonols [1, 2, 3, 13, 20, 24, 29]. Outre leur utilisation agricole comme fourrage, les tourteaux peuvent être utilisés comme combustible pour le chauffage, et offriraient un effet protecteur sur la santé humaine en raison de leur contenu remarquable en substances bioactives telles que les glucosinolates, vitamines et composés antioxydants [7, 3, 15, 20].

IV) Modification du contenu phytochimique

La biosynthèse et la concentration des composés phytochimiques dans les plantes dépend essentiellement de facteurs génétiques et environnementaux. En effet, les métabolites secondaires sont très sensibles aux changements de conditions environnementales. Le contenu phénolique peut notamment être affecté par le stress biotiques (attaques d'insectes, infections par un pathogène...), abiotiques (lumière, température, apport en nutriments, disponibilité de l'eau, radiations ultraviolettes...), ainsi que par les conditions de stockage, les traitements post-récolte, les conditions édaphiques telles que l'influence de la fertilisation et de la culture (apports en azote, en soufre...). La phénylalanine ammonia-lyase (PAL), l'enzyme clé catalysant la biosynthèse des composés phénoliques, est en effet sensible aux stress biotiques et abiotiques [8, 12, 20].

Influence de la température :

Certains composés antioxydants tels que l'acide ascorbique et les caroténoïdes sont très sensibles à la chaleur et sont détruits au cours des différentes étapes de traitement. Certaines études ont montré un plus haut taux de composés phénoliques libéré à partir des graines, lorsque l'huile est extraite à des températures et pressions élevées. Une température élevée peut en effet accélérer la libération des acides phénoliques, ce qui pourrait expliquer les concentrations de polyphénols plus élevées dans le tourteau [3, 8].

Influence du stockage :

Il est important de préciser que généralement, plus le stockage est long, plus la teneur en composés phénoliques diminue, en particulier pour les glucosides de flavonols [8].

Influence des méthodes de fertilisation et conditions de culture :

L'azote est l'un des éléments nutritifs les plus importants dans le contrôle de la qualité et du rendement. En outre, il module la biosynthèse de métabolites secondaires. Le soufre, quant à lui, est un macronutriment retrouvé dans certains acides aminés comme la cystéine et la méthionine, essentiels à la biosynthèse des glucosinolates par exemple, ainsi que dans une grande variété de métabolites secondaires [12]. Les endroits riches en soufre favorisent donc la production de glucosinolates [25]. Notons cependant que les émissions de dioxyde

de soufre en Europe diminuent de façon significative depuis ces dernières années [2]. En matière de stress biotiques, la maîtrise de l'attaque des insectes permet de limiter l'élévation du taux de polyphénols [8].

Influence des variations génétiques :

L'hybridation de *Camelina sativa* avec d'autres espèces du genre *Camelina*, telles que *Camelina microcarpa* et *Camelina alyssum*, peut influencer sur la composition phytochimique. Il semblerait que d'autres espèces issues de la famille des Brassicaceae, telles que l'Arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*), la Bourse à Pasteur (*Capsella bursa-pastoris*), la Neslie en panicule (*Neslia paniculata*), ou d'autres espèces du genre *Erysimum*, puissent également s'hybrider avec *Camelina sativa*. Toutefois, tous ces croisements nécessitent une intervention humaine consistant en une fusion de protoplastes [4, 11].

Influence des stades et conditions de croissance :

Une étude destinée à évaluer la relation entre les conditions de croissance et la qualité de l'huile, en mettant l'accent sur la composition en acides gras et tocophérols, a révélé une grande variation de la composition de l'huile de cameline, déterminée par des facteurs incontrôlables tels que la qualité du sol ou les conditions climatiques et météorologiques, due à des conditions de croissance différentes et variations entre les cultivars [1].

Influence de la composition en protéines :

Au printemps, les graines présentent une teneur plus élevée en protéines qu'en automne grâce notamment à une meilleure absorption d'azote lors des saisons plus chaudes [12].

Conclusion

La teneur importante en acides gras essentiels et oméga-3 constitue la base de l'utilisation de l'huile de cameline dans les domaines de l'alimentation et de la santé, en contribuant notamment à la réduction de triglycérides ou par voie topique pour le traitement des inflammations. Son efficacité a également été prouvée en tant que carburant de moteurs à l'huile végétale [2, 12].

L'ensemble des données bibliographiques obtenues détermine la présence de plusieurs catégories de composés phytochimiques aux propriétés biologiques incontestables, utiles dans de nombreux domaines. Pourtant, la culture de la cameline ne suscite véritablement l'intérêt de nombreuses industries que depuis les années 1990. En effet, les polyphénols apportent à la plante des moyens de défense contre les stress biotiques et abiotiques, mais présentent également des caractéristiques leur permettant d'être utilisés dans les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques. Les dérivés de la quercétine agissent de multiples façons, grâce à leurs propriétés antimicrobiennes, antimutagènes, veinotoniques, anti-inflammatoires, antiallergiques et antioxydantes, étroitement liées à leur structure chimique. Un apport en flavonoïdes présente de nombreux avantages notamment dans la prévention de maladies cardio-vasculaires et neurodégénératives, puisque ces agents protecteurs éventuels ont montré leur capacité à retarder la progression de nombreuses maladies chroniques. La cameline est également caractérisée par la présence de composés pouvant affecter la valeur de ses sous-produits. Ainsi, les produits de dégradation des glucosinolates sont caractérisés par leurs propriétés anti-nutritives à doses élevées. Cependant, à des doses sub-toxiques, ils peuvent avoir un rôle chimioprotecteur contre des agents cancérigènes. La détermination des substances bioactives permet une meilleure exploitation de leurs produits. Actuellement, il reste pourtant des composés non caractérisés précisément dans les graines de cameline [7, 11, 12, 13].

Introduction

Des méthodes et équipements chromatographiques et spectrophotométriques ont été utilisés et approuvés lors de plusieurs études dans l'analyse des grandes classes de composés issus de la cameline. Les composés phénoliques, flavonoïdes, et autres composés phytochimiques glycosylés sont le plus souvent caractérisés *via* chromatographie phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse, grâce à laquelle la formule chimique de composés inconnus peut être identifiée. Le couplage de méthodes d'analyses telles que la LC-MS et la RMN est également intéressant en raison des informations complémentaires qu'elles apportent [3, 7]. Un grand nombre de flavonoïdes ont ainsi été évalués comme étant composés phénoliques les plus présents au sein de *Camelina sativa*. Parmi eux, des études récentes révèlent la présence de glycosides de la quercétine, du kaempférol, leurs dérivés associés aux acides hydroxycinnamiques, ainsi que des dérivés de l'acide sinapique [7, 8]. Cette étude vise donc à identifier plusieurs composés et à caractériser plus finement la composition en flavonoïdes et glucosinolates.

I) Matériels et Méthodes

I-1) Matériel végétal

Les graines, de variété Canela, ont été fournies par le C.E.T.I.O.M. (Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains).

I-2) Produits chimiques

Les solvants sont de qualité HPLC.

I-3) Extraction

50 g de graines sont répartis dans deux bols de 50 mL et broyés à l'aide d'un broyeur à billes de calibre 25 mm (Retsch MM 400), durant 4 min. Après avoir obtenu une poudre fine et homogène, 2 g de graines sont répartis dans des tubes Falcon™. L'extraction débute en ajoutant 16 mL de méthanol. Les tubes sont ensuite agités à 950 rpm pendant 10 min à 70°C, puis 8 mL de chloroforme sont introduits. Le mélange est à nouveau agité à 950 rpm pendant 5 min à 70°C, avant d'ajouter 16 mL d'eau ultra pure. Après agitation au vortex pendant 20 secondes, les tubes sont centrifugés durant 10 min à 5000 rpm, afin de séparer les phases aqueuse et organique. La phase supérieure aqueuse est alors récupérée. L'extrait brut sera utilisé pour la suite des expérimentations.

I-4) Purification

L'extrait brut (1L) est d'abord évaporé puis repris dans 1L d'eau UHQ. Cette solution est ensuite placée sur une résine Amberlite™ XAD16N (Figure 7). La résine est alors rincée avec 500 mL d'eau UHQ afin d'éliminer les impuretés.



Figure 7. Système de colonne basse pression sur résine Amberlite™ XAD16N

La résine est ensuite rincée avec 500 mL d'éthanol pour éluer les composés d'intérêt. La fraction obtenue lors de cette étape est conservée puis lyophilisée pour obtenir une poudre qui correspond à l'extrait brut pré-purifié. L'extrait pré-purifié est repris à une concentration de 10 g.L⁻¹. L'échantillon est filtré sur 0,2 µm puis injecté (3 mL) sur un ensemble de type LC-8A Shimadzu équipé d'un passeur d'échantillon SIL-10AF. L'élution s'effectue à un débit de 17 mL/min sur une colonne C18 Supelcosil LC-ABZ+ (5 µm, 250 x 21,2 mm). Le gradient d'élution fait intervenir deux éluants : l'éluant A (H₂O + 0,1% CH₃COOH) et l'éluant B (CH₃CN) (Tableau 1). Les composés sont détectés à 280 nm et ont été collectés à partir d'un collecteur de fraction FRC-10A. L'ensemble de l'appareillage est piloté à partir du logiciel LC Solutions.

Tableau 1. Gradient utilisé pour l'étape de purification en HPLC préparative

Temps (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
20	82	18
35	82	18
55	70	30
80	50	50
80	100	0
90	100	0

I-5) Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

Les analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution sont effectuées sur un système H-Class ACQUITY UPLC (Waters-Micromass, Manchester, Royaume-Uni), couplé à un appareil SYNAPT G2-Si Q-TOF (Waters-Micromass, Manchester, Royaume-Uni) équipé d'une source électrospray. L'élution est réalisée avec un gradient de $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pour la phase mobile, à l'aide d'un mélange de deux solvants, le solvant A ($\text{H}_2\text{O} + \text{HCOOH}$ à 0.01%) et le solvant B (CH_3OH), selon les proportions suivantes (A: B) : 90:10 (t = 0 min), 40: 60 (t = 4 min), 40:60 (t = 5 min), 0: 100 (t = 6 min) 0: 100 (t = 8 min), 90:10 (t = 9 min), 90:10 (t = 13 min). Les échantillons ($1\mu\text{L}$ de volume d'injection) sont déposés sur une colonne (Phenomenex, Torrance, CA, Etats-Unis) Kinetex C18 ($1,3 \mu\text{m}$, $50 \times 2,1 \text{ mm}$). L'élution est effectuée à une température de 50°C . Les données ESI-HRMS et MS/MS sont enregistrées en mode négatif. La gamme de masse varie de 50 à 1150 Da et les spectres sont enregistrés à $0,2 \text{ s}/\text{scan}$, avec une résolution de 20000 (FWHM) pour la sensibilité. L'acquisition et le traitement de données sont réalisés à l'aide du logiciel MassLynx 4.1.

I-6) Analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les analyses RMN sont réalisées sur 2 fractions purifiées par HPLC préparative, à partir de 3,2 mg de l'échantillon contenant l'épicatéchine-7-O- β -glucopyranoside et 1,3 mg de l'échantillon contenant la quercétine-5b-O-sinapyl-2''-O-apiosyl-3-O-rutinoside. Ces composés sont dissous dans $600 \mu\text{L}$ d'un mélange méthanol/eau (50/50). Le pH est ajusté à une valeur de 6. Après évaporation, $60 \mu\text{L}$ de solution tampon sont ajoutés : 50% de méthanol deutéré et 50% d'un mélange $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{D}_2\text{O}$ contenant un acide triméthylsilyle propionique. Les échantillons sont transférés dans des tubes RMN de $1,7 \text{ mm}$. Les spectres sont obtenus à 300 K sur un spectromètre Bruker Avance III 600 fonctionnant à 600.17 MHz pour ^1H , utilisant une sonde TXI 5 mm avec z-gradients. Le logiciel Topspin v3.2 (Bruker) est utilisé. Des spectres 2D ^1H JRES, 1D DEPT, 2D COSY, 2D TOCSY, 2D HMBC, 2D HSQC sont réalisés, et le nombre de scans est adapté à la quantité d'échantillons.

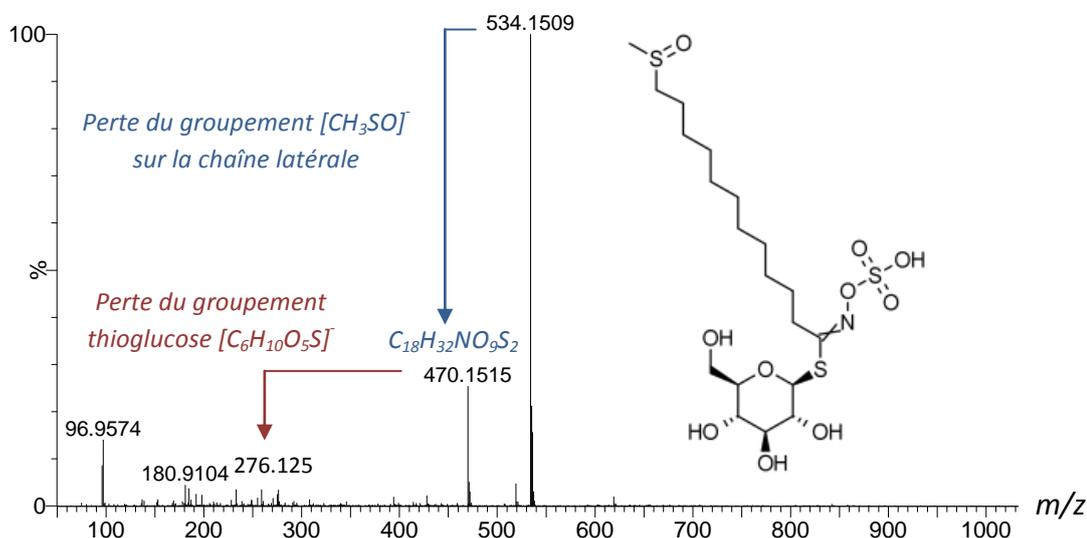
II) Résultats

Afin de caractériser les composés secondaires des graines de *Camelina sativa*, la partie polaire de l'extrait est d'abord analysée par LC-MS. Ces analyses réalisées en mode négatif permettent de répertorier les composés majoritaires. La démarche expérimentale réalisée pour l'élucidation structurale de ces composés se base dans un premier temps sur la masse exacte et les fragmentations obtenues lors des analyses LC-MS-MS. Ces données sont confrontées à celles décrites dans la littérature.

II-1) Identification des glucosinolates

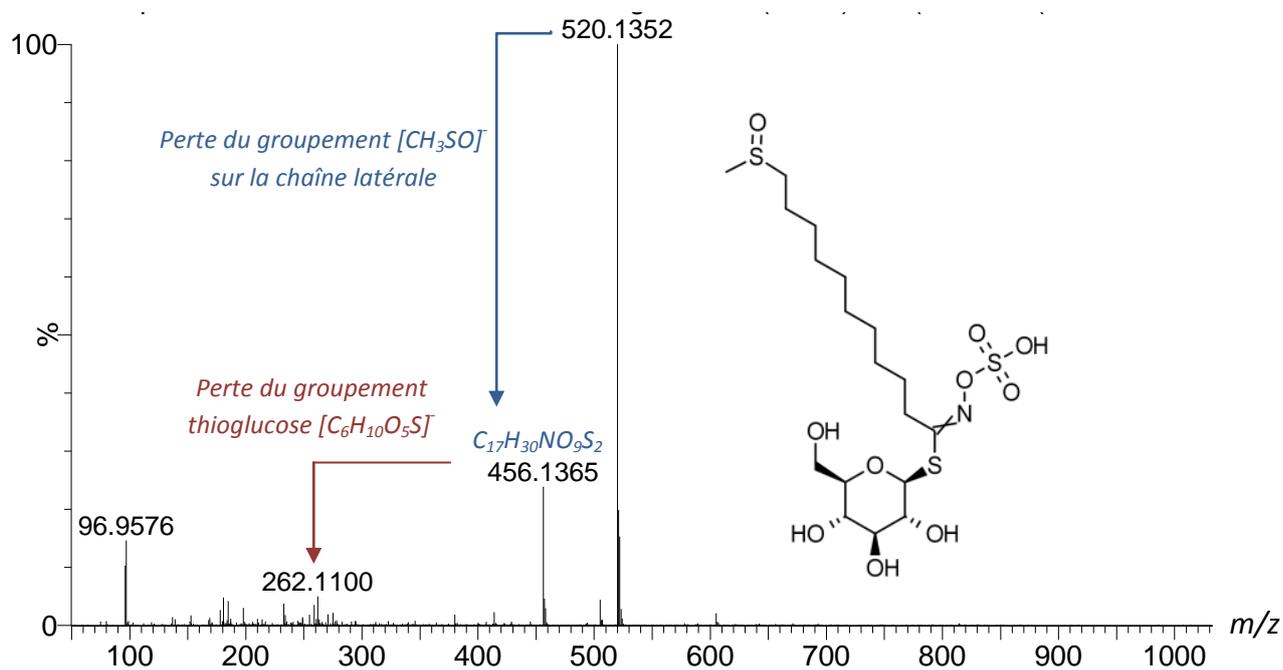
II-1-1) Gluconesiliapanuculatine

Ainsi, les analyses LC-MS permettent de répertorier un composé avec une masse exacte de 534,151 m/z (Figure 8). Ce composé correspond, d'après la littérature, à un glucosinolate : le 11-méthylsulfinyl-undecylglucosinolate (gluconesiliapanuculatine) [7, 34]. Pour confirmer l'identité de ce composé, une fragmentation de l'ion moléculaire est réalisée par MS-MS. Cette fragmentation permet de générer plusieurs fragments dont l'ion avec la masse exacte de 96,957 m/z . Cet ion correspond à l'ion hydrogènesulfate $[\text{HSO}_4]^-$. La fragmentation permet également de générer un ion avec la masse exacte de 470,151 m/z . Cet ion correspond à la perte du groupe $[\text{CH}_3\text{SO}]^-$ sur la chaîne latérale du glucosinolate. Enfin, les analyses MS-MS permettent de générer un autre ion de masse exacte 276,125 m/z . Cet ion est issu de la perte du groupement thioglucose $[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5\text{S}]^-$.



II-1-2) Glucocamelinine

Les analyses LC-MS permettent de répertorier un composé avec une masse exacte de 520,135 m/z (Figure 9). Ce composé correspond, d'après la littérature, à un glucosinolate : le 10-methylsulfinyl-decylglucosinolate (glucocamelinine) [7, 34]. Pour confirmer l'identité de ce composé, une fragmentation de l'ion moléculaire est réalisée par MS-MS. Cette fragmentation permet de générer plusieurs fragments dont l'ion avec la masse exacte de 96,957 m/z . Cet ion correspond à l'ion hydrogénosulfate $[\text{HSO}_4]^-$. La fragmentation permet également de générer un ion avec la masse exacte de 456,136 m/z . Cet ion correspond à la perte du groupe $[\text{CH}_3\text{SO}]^-$ sur la chaîne latérale du glucosinolate. Enfin, les analyses MS-MS permettent de générer un autre ion de masse exacte 262,110 m/z . Cet ion est issu de la perte du groupement thioglucose $[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5\text{S}]^-$.



II-1-3) Glucoarabine

Les analyses LC-MS permettent de répertorier un composé avec une masse exacte de 506,117 m/z (Figure 10). Ce composé correspond, d'après la littérature, à un glucosinolate : le 9-methylsulfinyl-nonylglucosinolate (glucoarabine) [7, 34]. Pour confirmer l'identité de ce composé, une fragmentation de l'ion moléculaire est réalisée par MS-MS. Cette fragmentation permet de générer plusieurs fragments dont l'ion avec la masse exacte de 96,957 m/z . Cet ion correspond à l'ion hydrogénosulfate $[\text{HSO}_4]^-$. La fragmentation permet également de générer un ion avec la masse exacte de 442,118 m/z . Cet ion correspond à la perte du groupe $[\text{CH}_3\text{SO}]^-$ sur la chaîne latérale du glucosinolate. Enfin, les analyses MS-MS permettent de générer un autre ion de masse exacte 248,093 m/z . Cet ion est issu de la perte du groupement thioglucose $[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5\text{S}]^-$.

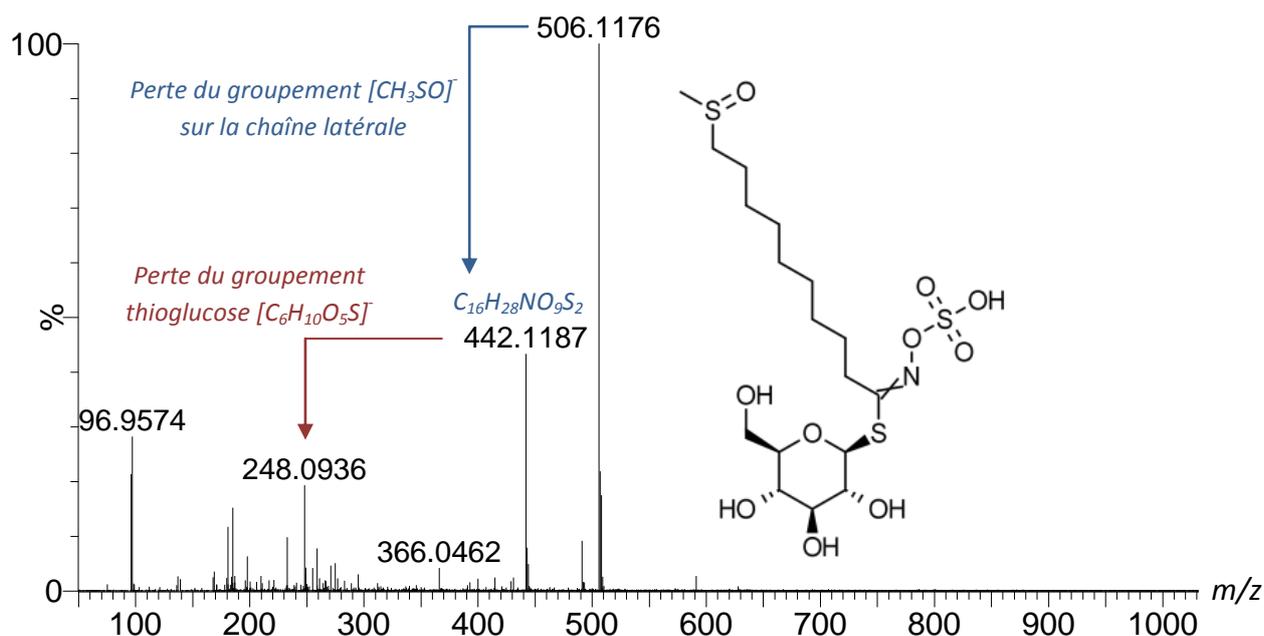


Figure 10. Spectre MS/MS du 9-methylsulfinyl-nonylglucosinolate (Glucoarabine)

II-2) Identification des flavonoïdes

II-2-1) Isorhamnétine-3-O-rutinoside

Les analyses LC-MS permettent de répertorier un composé avec une masse exacte de 623,162 m/z (Figure 11). Ce composé correspond, d'après la littérature, à un flavonoïde : l'isorhamnétine-3-O-rutinoside (narcissoside) [7, 35, 36, 37]. Pour confirmer l'identité de ce composé, une fragmentation de l'ion moléculaire est réalisée par MS-MS. Cette fragmentation permet de générer plusieurs fragments dont l'ion avec la masse exacte de 315,049 m/z . Cet ion correspond à la perte des groupements rhamnose et glucose.

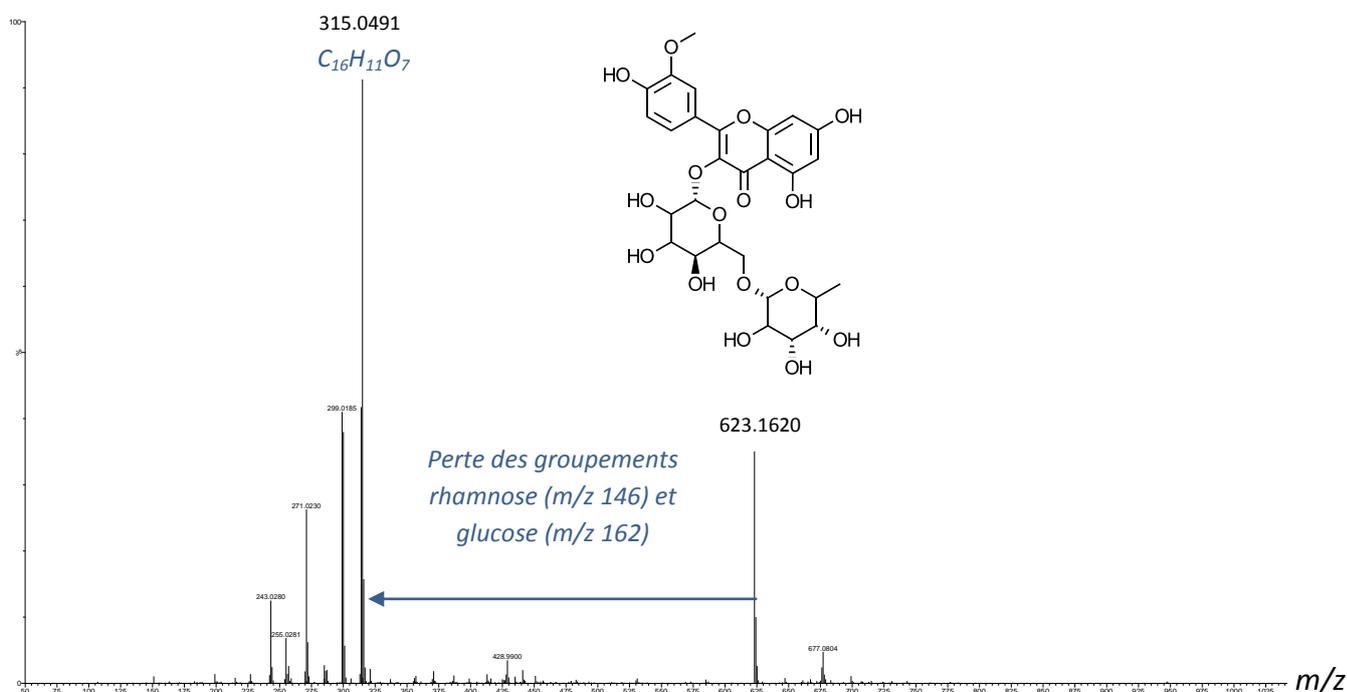


Figure 11. Spectre MS/MS de l'isorhamnétine-3-O-rutinoside (Narcissoside)

II-2-2) Kaempférol-3-O-rutinoside

Les analyses LC-MS permettent de répertorier un composé avec une masse exacte de 593,151 m/z (Figure 12). Ce composé correspond, d'après la littérature, à un flavonoïde : le kaempférol-3-O-rutinoside [7, 38]. Pour confirmer l'identité de ce composé, une fragmentation de l'ion moléculaire est réalisée par MS-MS. Cette fragmentation permet de générer plusieurs fragments dont l'ion avec la masse exacte de 285,038 m/z . Cet ion correspond à la perte des groupements rhamnose et glucose.

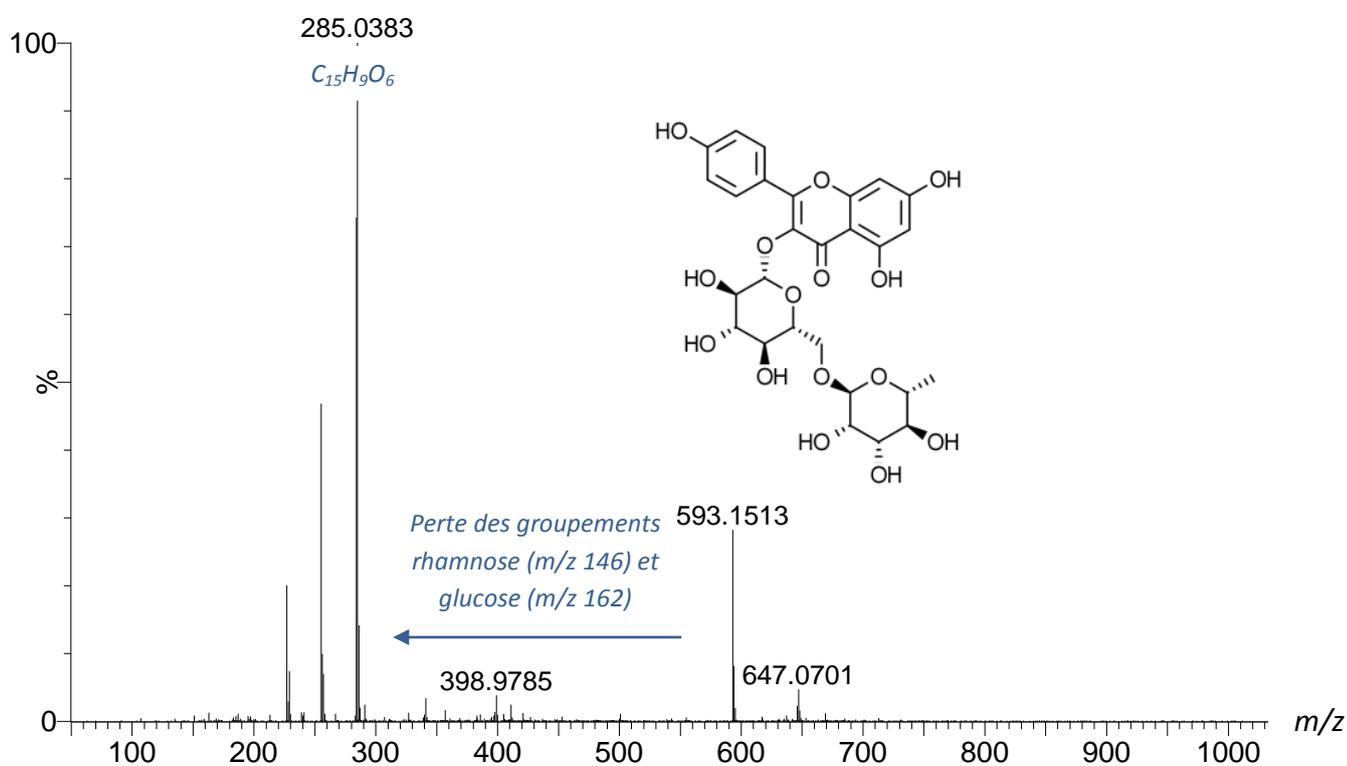
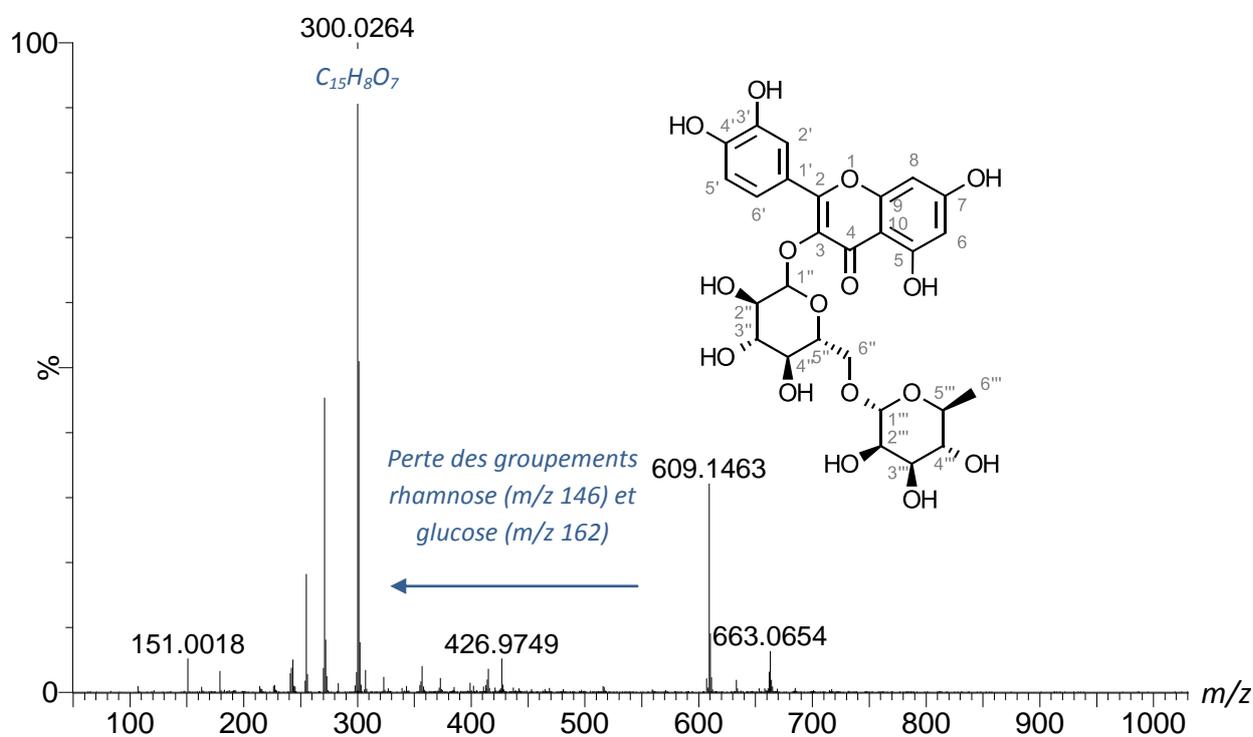


Figure 12. Spectre MS/MS du kaempférol-3-O-rutinoside

II-2-3) Rutoside

Les analyses LC-MS permettent de répertorier un composé avec une masse exacte de 609,146 m/z (Figure 13). Ce composé correspond, d'après la littérature, à un flavonoïde : le rutoside [7, 39]. Pour confirmer l'identité de ce composé, une fragmentation de l'ion moléculaire est réalisée par MS-MS. Cette fragmentation permet de générer plusieurs fragments dont l'ion avec la masse exacte de 300,026 m/z . Cet ion correspond à la quercétine, suite à la perte des groupements rhamnose et glucose.



II-2-4) Épicatéchine-7-O- β -glucopyranoside

Les analyses LC-MS permettent de répertorier un composé avec une masse exacte de 451,125 m/z (Figure 14). Ce composé correspond, d'après la littérature, à un flavonoïde, avec une structure de base de type flavanone, catéchine ou épicatechine [7, 40, 41, 42]. Pour confirmer l'identité de ce composé, une fragmentation de l'ion moléculaire est réalisée par MS-MS. Cette fragmentation permet de générer plusieurs fragments dont l'ion avec la masse exacte de 289,071 m/z . Cet ion correspond à la perte d'un hexose, plus précisément un groupement glucopyranoside. La fragmentation permet également de générer deux ions avec les masses exactes de 245,080 m/z et 137,022 m/z , respectivement compatibles avec les formules chimiques suivantes : $C_{14}H_{13}O_4$ et $C_7H_5O_3$. Ce schéma de fragmentation correspond à la configuration décrite pour la catéchine-7-O-glucopyranoside ou l'épicatéchine-7-O-glucopyranoside ($C_{21}H_{23}O_{11}$) [7, 43]. Les informations obtenues par LC-MS ne permettent pas de déterminer précisément la structure de ce composé. Toutefois, grâce à l'étape de purification et d'isolement, le degré de pureté obtenu pour ce produit est suffisant pour une identification par RMN.

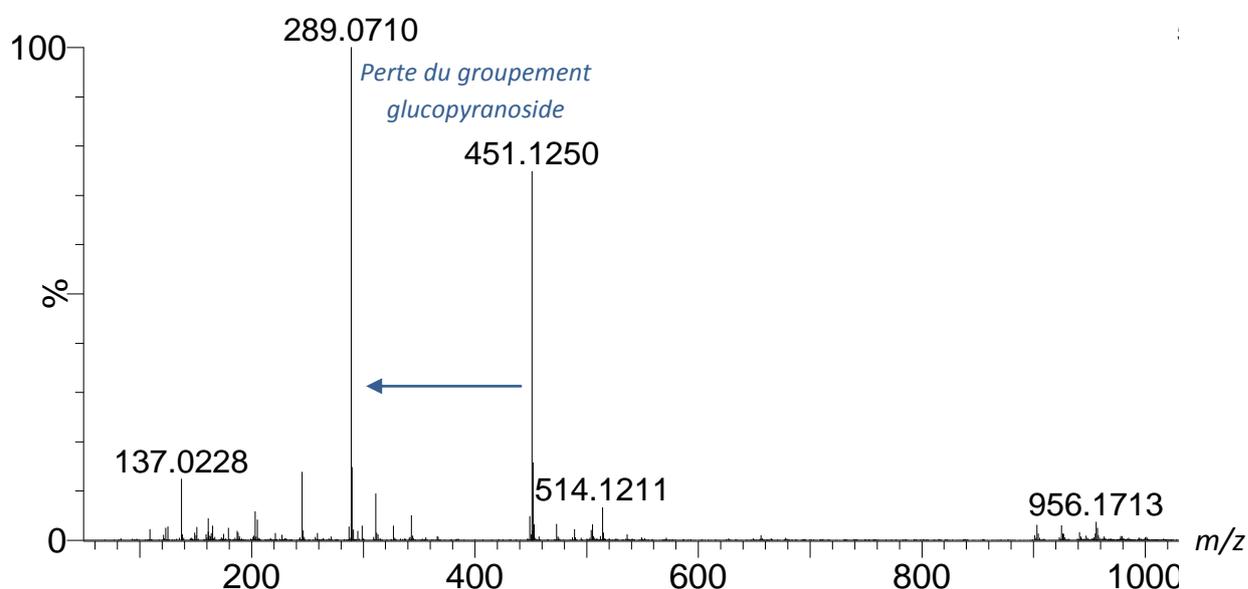


Figure 14. Spectre MS/MS de l'épicatéchine-7-O-glucopyranoside

Les signaux observés lors de l'analyse ^1H -RMN mettent en évidence 16 protons visibles, ainsi que 21 atomes de carbone distingués sur la séquence DEPT du ^{13}C (9 pics négatifs, correspondant aux groupes CH_2 , et 12 positifs, pour les groupes CH et CH_3). Les déplacements chimiques de chaque carbone de la molécule ont pu être associés aux protons, grâce aux informations de l'HSQC [44].

Neuf d'entre eux semblent appartenir à la génine. La nomenclature habituellement utilisée pour le squelette des flavonoïdes met en évidence 3 cycles A, B, C. Les protons δ 7,03 (d, $J = 1,7$ Hz, H-2'), δ 6,89 (d, $J = 8,2$ Hz, H-5'), δ 6,88 (dd, $J = 8,2$ Hz et $1,7$ Hz, H-6') sont rattachés à un cycle B d'une structure de base de type 2-phényl-3-chromanol caractéristique des flavan-3-ols, dont les relations sont confirmées grâce aux corrélations HMBC, COSY et TOCSY. L'analyse du spectre TOCSY établit également une corrélation entre un proton δ 4,86 (d, $J = 1,3$ Hz, H-2) et les protons H-2' et H-6', ce qui permet d'identifier une liaison en position 2 entre le cycle B et un hétérocycle C substitué en 3 par un hydroxyle. Quatre protons sont rattachés à cet hétérocycle central : δ 4,86 (d, $J = 1,3$ Hz, H-2), δ 4,26 (ddd, $J = 1,3$ Hz, $2,3$ Hz, $4,5$ Hz, H-3), δ 2,91 (dd, $J = 4,5$ Hz et $17,2$ Hz, H-4), δ 2,77 (dd, $J = 2,3$ Hz et $17,2$ Hz, H-4), dont les relations sont confirmées par les corrélations HMBC, COSY et TOCSY. Le cycle A est finalement déterminé grâce aux corrélations HMBC visibles entre les protons δ 6,30 (d, $J = 2,3$ Hz, H-6) et δ 6,28 (d, $J = 2,3$ Hz, H-8), ainsi qu'aux corrélations définies par le spectre TOCSY entre les protons H-8 et H-4 qui établissent une liaison entre les deux hétérocycles.

Les signaux obtenus semblent correspondre aux informations déjà décrites lors d'analyses RMN de la catéchine et de l'épicatéchine [45, 46, 47, 48], dont la structure comporte bien 5 groupements OH et 9 protons visibles ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$). En raison de l'isomérisie, ce sont les valeurs caractéristiques associées au proton H-3, δ 4,26 (ddd, $J = 1,3$ Hz, $2,3$ Hz, $4,5$ Hz, H-3), qui permettent de privilégier l'épicatéchine à la catéchine, les constantes de couplage liées à la catéchine étant plus élevées [49, 50].

La présence d'un hexose, confirmée par l'analyse MS/MS, est signalée par un proton anomérique en position 1'' (δ 4,94, d, $7,8$ Hz), relié à la génine en position 7, un pic de corrélation HMBC étant identifié entre ce proton et le carbone $\delta_{\text{C}7}$ 158,8. Les valeurs des

déplacements chimiques liées aux carbones C5, C7 et C8 étant relativement proches, c'est en couplant les informations liées aux corrélations concernant les protons H-6 et H-8, ainsi que H-1'' et H-7, que la liaison d'un hexose en position 7 se justifie. De plus, les signaux liés aux protons situés en position 4 confirment l'absence de liaison de l'hexose au groupement hydroxyle en 5, les constantes de couplage étant plus faibles pour l'épicatéchine-5-O- β -D-glucopyranoside [51, 52]. L'analyse de la JRES permet de confirmer les positions des différents atomes de l'hexose, dont les valeurs de constantes de couplage pour les protons H-3'' et H-4'' semblent davantage correspondre à celles d'un groupement glucopyranoside, qu'à un galactoside [40, 51, 52].

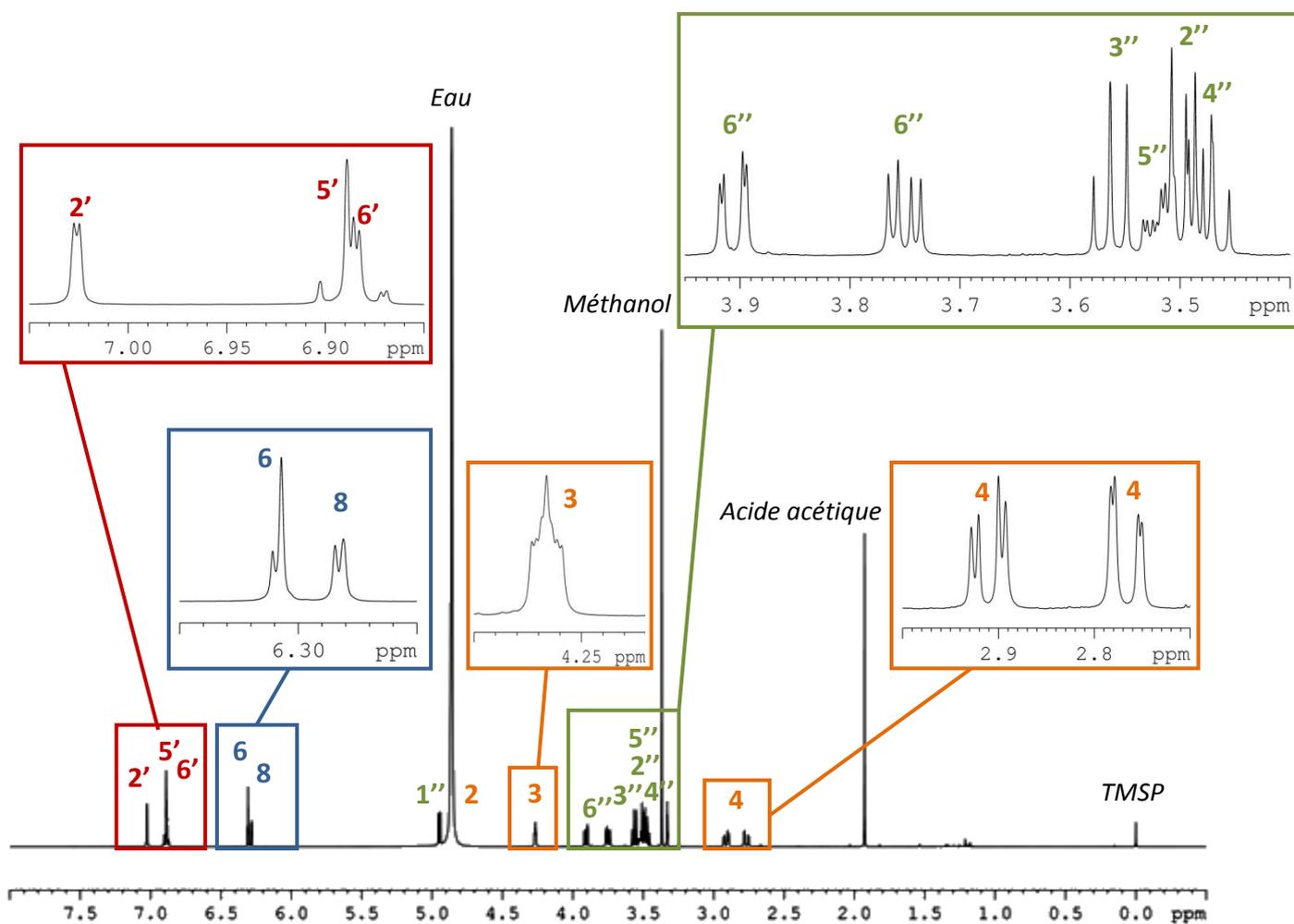
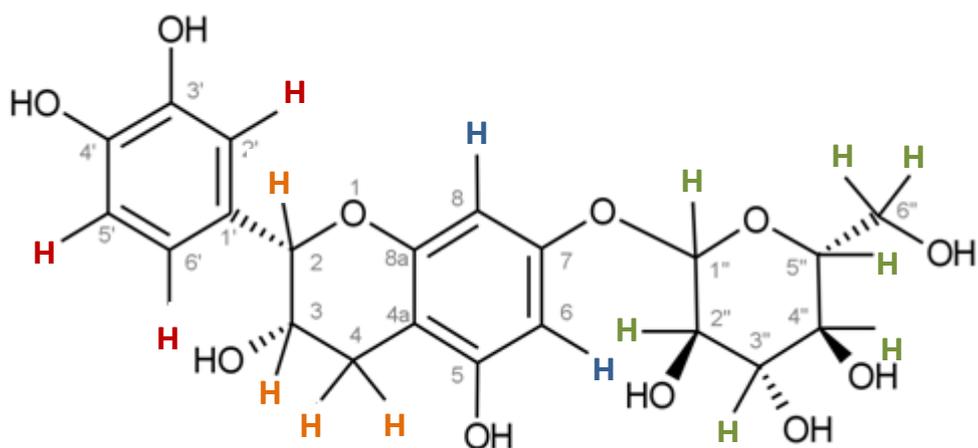
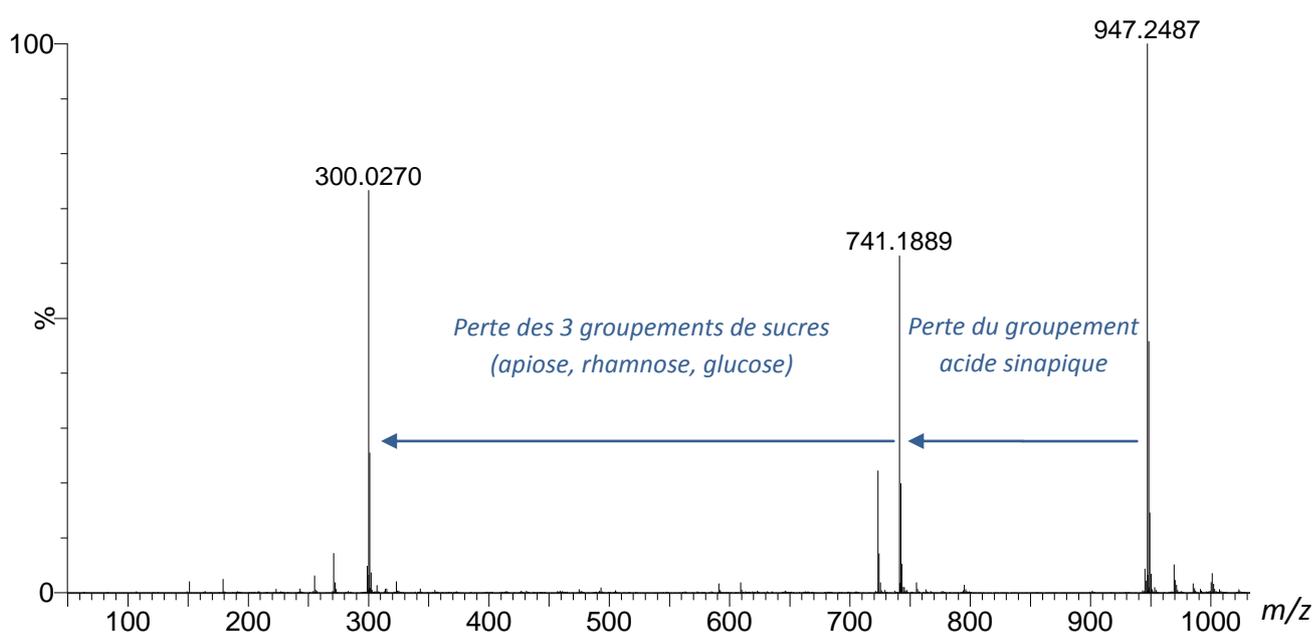


Figure 15. Spectre ^1H -RMN de (-)-épicatéchine-7-O- β -D-glucopyranoside (300 K, pH 6, $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$)

II-2-5) Quercétine-5b-O-sinapyl-2''-O-apiosyl-3-O-rutinoside

Les analyses LC-MS permettent de répertorier un composé avec une masse exacte de 947,2487 m/z (Figure 16). Ce composé correspond, d'après la littérature, à un flavonoïde [7]. Pour confirmer l'identité de ce composé, une fragmentation de l'ion moléculaire est réalisée par MS-MS. Cette fragmentation permet de générer plusieurs fragments dont l'ion avec la masse exacte de 741,188 m/z . Cet ion correspond à la quercétine-2''-O-apiosyl-3-O-rutinoside, issu de la perte d'un acide sinapique [7]. La fragmentation permet également de générer un ion de masse exacte 300,027 m/z , compatible avec la formule chimique suivante : $C_{15}H_8O_7$, correspondant à la quercétine, issu de la perte des 3 groupements de sucres. L'ordre de perte de l'apiose, du rhamnose et du glucose ne peut cependant être déterminé ici [7].

Ce schéma de fragmentation correspond à la configuration décrite pour le composé nommé provisoirement quercétine-O-sinapyl-2''-O-apiosyl-3-O-rutinoside [7], dont les positions de l'apiose et de l'acide sinapique ne sont pas précisément identifiées. Les informations obtenues par LC-MS ne permettent pas de déterminer avec précision la structure de ce composé. Toutefois, grâce à l'étape de purification, le degré de pureté obtenu pour ce produit est suffisant pour une identification par RMN.



Les signaux observés lors de l'analyse 1H-RMN mettent en évidence 36 protons visibles [44]. Cinq d'entre eux semblent appartenir à la génine. Les protons δ 6,15 (d, $J = 1,9$ Hz, H-6) et δ 5,98 (d, $J = 1,9$ Hz, H-8) sont rattachés au cycle A de la structure de base de type flavylum ; et les protons δ 7,6 (d, $J = 2,1$ Hz, H-2'), δ 6,99 (d, $J = 8,5$ Hz, H-5'), δ 7,53 (dd, $J = 2,1$ Hz, $8,5$ Hz, H-6') se rapportent au cycle B.

Les spectres RMN obtenus ont également montré la présence de deux fragments de sucre. L'interprétation des résultats des spectres HSQC, COSY et TOCSY permet de déterminer la position d'un proton anomérique à δ 5,49 (d, $J = 7,9$ Hz, H-1'') appartenant à une unité de sucre à sept protons et six atomes de carbone. Sa position est confirmée grâce aux corrélations évaluées par le spectre HMBC avec les atomes de carbone C-3 (δ 136,2) et C-2'' (δ 77,8), cet hexose en 1'' étant ainsi relié à la position 3 de l'aglycone.

La présence d'un deuxième hexose est signalée par un proton anomérique en position 1''' (δ 4,53, d, $J = 0,95$ Hz), relié à l'hexose précédent en position 6'', un pic de corrélation HMBC étant identifié entre ce carbone (δ 69,8) et le proton δ 4,53. Cette hypothèse peut être confirmée grâce aux corrélations COSY et TOCSY du proton 1''' avec les protons en 2''' (δ 3,66, dd, $J = 2,6$ Hz, $0,95$ Hz) et 5''' (δ 3,24, m). Ces signaux RMN présentent des similitudes avec ceux obtenus pour le rutoside (quercétine-3-O-rutinoside) [52, 53]. Les deux sucres étant donc potentiellement un glucose et un rhamnose, dont les signaux ici sont difficilement identifiables en raison de leur proximité.

Un troisième sucre à cinq carbones est détecté, dont les signaux sont sensiblement similaires à ceux de l'apiose [54]. L'hypothèse est confirmée par les corrélations HMBC entre le proton δ 5,53 (d, $J = 1,1$ Hz, H-1b) et les carbones δ 81,7 (C-3b) et δ 79,3 (C-2b). Il semble être relié au glucose en position 2'', du fait de la mise en évidence d'une corrélation entre le proton δ 3,79 (m, H-2'') et le carbone δ 110,7 (C-1b). En outre, les déplacements chimiques des protons en position 5b (δ 4,44, 1H, d, $J = 11,1$ Hz ; δ 4,50, 1H, d, $J = 11,1$ Hz) ainsi que le pic de corrélation HMBC (δ 170,6, C-9a) permettent de visualiser une substitution en 5b.

Comme indiqué précédemment, le spectre MS/MS de ce composé révèle un ion moléculaire à m/z 947,2487, compatible avec la formule empirique $C_{43}H_{47}O_{24}$, en accord

avec une publication récente l'identifiant comme un flavonoïde : la quercétine-O-sinapyl-2''-O-apiosyl-3-O-rutinoside, constituée d'une structure de base en rutoside, un apiose et un acide sinapique dont la position n'est pas confirmée [7].

Les derniers signaux RMN permettent en effet de mettre en évidence la présence d'un acide sinapique, grâce aux protons du cycle δ 6,45 (s, H-2a, H-6a), et ceux positionnés sur la chaîne latérale : δ 7,06 (d, J = 15,9 Hz, H-7a) et δ 5,95 (d, J = 15,9 Hz, H-8a) [55, 56]. Leur symétrie et leurs corrélations HMBC permettent de placer les groupes O-méthyl sur les atomes de carbone 3a et 5a (δ 150,6). Enfin, le pic de corrélation HMBC observé entre les protons δ 4,44 (1H, d, J = 11,1 Hz, H-5b) et δ 4,50 (1H, d, J = 11,1 Hz, H-5b), avec le carbone δ 170,6 (C-9a), permet de déterminer la position de la liaison de l'acide sinapique à l'apirose en position 5b.

La détermination de ce composé est donc en accord avec la publication [7], tout en précisant cependant la position de l'apirose et de l'acide sinapique comme indiqué ci-dessus grâce aux corrélations observées, et en adjoignant un groupement CH₂ appartenant au glucose, entre le glucose et le rhamnose, afin d'obtenir la véritable structure du rutoside : la quercétine-5b-O-sinapyl-2''-O-apiosyl-3-O-rutinoside.

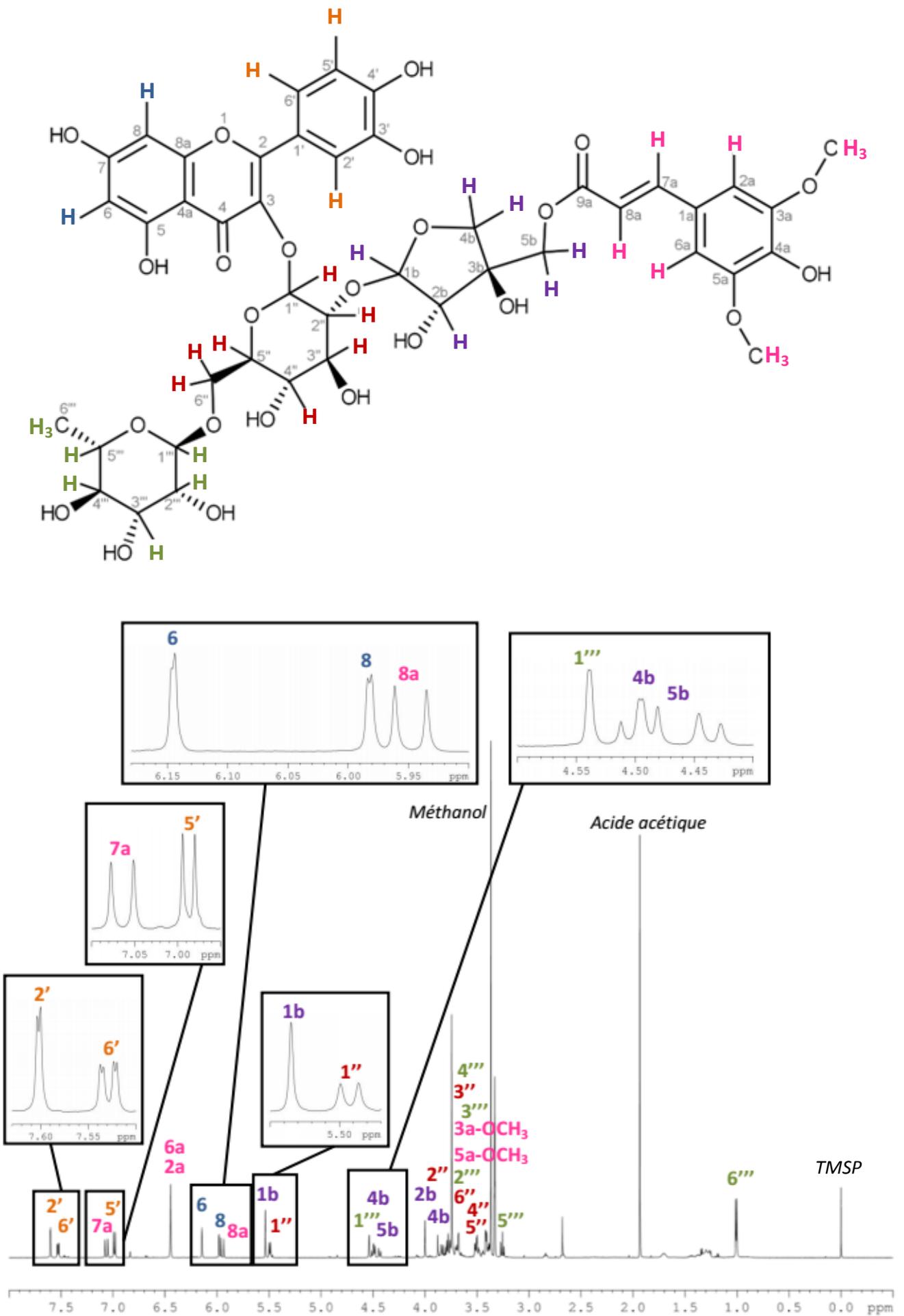


Figure 17. Spectre ¹H-RMN de la quercétine-5b-O-sinapyl-2''-O-apiosyl-3-O-rutinoside (300 K, pH 6, D₂O/CD₃OD)

III) Discussion

D'après le chromatogramme obtenu par LC-MS (Figure 18) et les résultats décrits précédemment, trois glucosinolates sont caractérisés : la gluconesiliapanuculatine (pic 6), la glucocamelinine qui représente le pic majoritaire (pic 3) et la glucoarabine (pic 2). Ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques qui détectent la glucocamelinine comme étant le glucosinolate prédominant dans la graine de cameline, représentant environ 60 % du total en glucosinolates [2, 7, 12, 15]. La composition semi-quantitative révélée par le chromatogramme obtenu par LC-MS est donc cohérente avec les résultats publiés jusqu'à présent.

Concernant les flavonoïdes, le rutoside est majoritaire (pic 4), suivi du kaempférol-3-O-rutinoside (pic 5) et de l'isorhamnétine-3-O-rutinoside (pic 8). Plusieurs études s'accordent en effet à définir les dérivés de la quercétine comme étant les principaux flavonoïdes de la graine de cameline [8, 9]. Agissant en puissants antioxydants, ces flavonoïdes sont présents en quantité non négligeable dans la graine, hormis les dérivés de la catéchine ou épicatechine caractérisés par une teneur plus faible [9, 7, 20, 21], comme le montre le pic 1 correspondant à l'épicatechine-7-O- β -glucopyranoside.

Enfin, la composition qualitative et semi-quantitative, révélée par le chromatogramme obtenu par LC-MS ainsi que par les analyses RMN, coïncide avec les rares données bibliographiques traitant de la présence d'un glycoside de la quercétine, la quercétine-5b-O-sinapyl-2''-O-apiosyl-3-O-rutinoside caractérisée par le pic 7, et apporte les précisions nécessaires à l'élucidation structurale de ce composé [7]. En effet, les flavonoïdes détectés par LC-MS ont été identifiés à des proportions correspondant à d'autres informations publiées récemment : quercétine-3-O-rutinoside ou rutine (0,52%), isorhamnétine-O-rutinoside (0,08%), kaempférol-O-rutinoside (0,07%), quercétine-5b-O-sinapyl-2''-O-apiosyl-3-O-rutinoside (0,05%), sur un total de 1,61% de flavonoïdes et composés phénoliques [7].

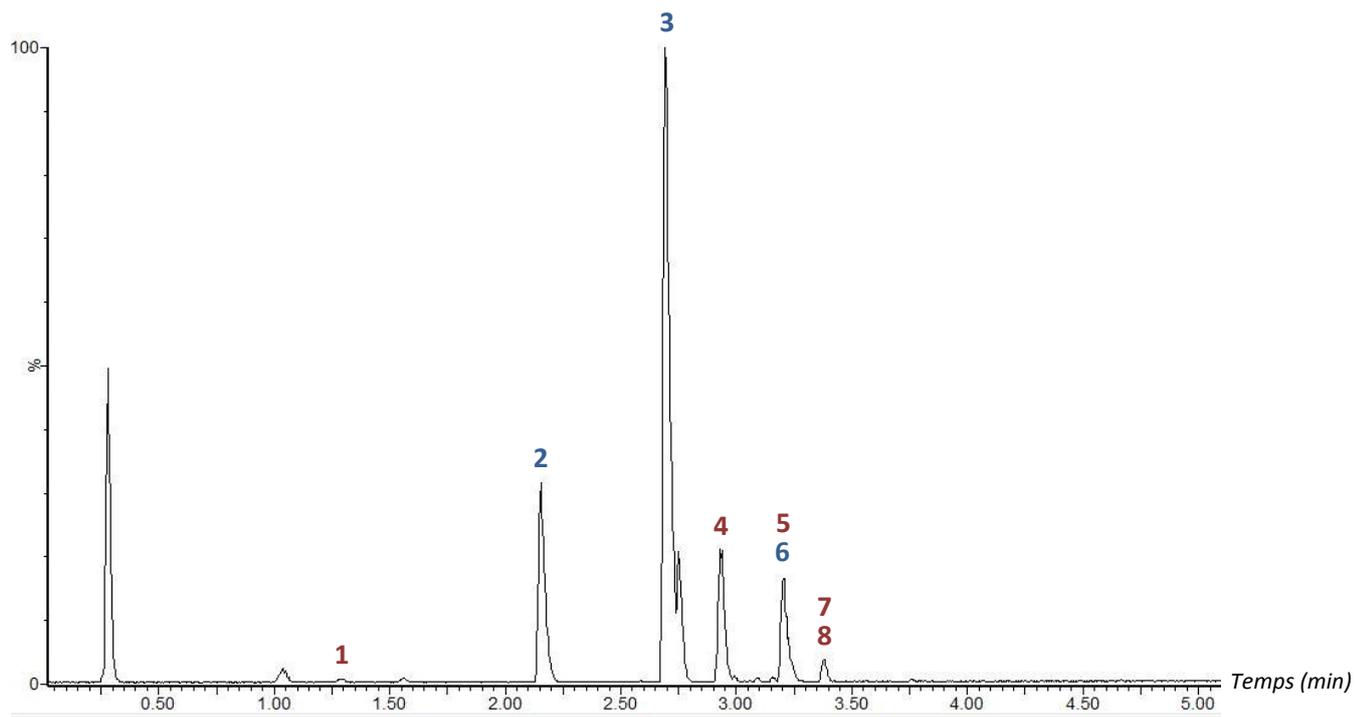


Figure 18. Chromatogramme type obtenu par LC-MS

Conclusion

L'identification basée sur la masse exacte et la fragmentation obtenue par MS/MS permet de confirmer la présence de trois glucosinolates déjà connus et décrits dans la graine de cameline : gluconesiliapanuculatine, glucocamelinine et glucoarabine.

Les données obtenues par LC-MS permettent également de détecter plusieurs flavonoïdes, tels que l'isorhamnétine-3-O-rutinoside, le kaempférol-3-O-rutinoside et le rutoside. La composition en flavonoïdes des graines de *Camelina sativa* reste jusqu'à présent peu connue. Cette étude a donc permis d'identifier plus précisément son contenu, en particulier grâce à la mise en évidence de composés majoritaires, le rutoside et la glucocamelinine, mais également à la caractérisation de deux composés : l'épicatéchine-7-O- β -glucopyranoside et la quercétine-5b-O-sinapyl-2''-O-apiosyl-3-O-rutinoside.

CONCLUSION GENERALE

Les études bibliographiques publiées jusqu'à présent mettent en évidence la présence de nombreux métabolites secondaires chez *Camelina sativa* impliqués dans diverses fonctions physiologiques. Afin d'isoler, identifier et quantifier les principaux composants de la graine de cameline, l'association de méthodes d'analyses chromatographiques, spectrophotométriques et RMN ont été validées. Le couplage de plusieurs méthodes est donc indispensable pour une caractérisation complète et précise [7]. L'identification par LC-MS permet de confirmer la présence de trois glucosinolates déjà décrits (gluconesiliapanuculatine, glucocamelinine et glucoarabine) et cinq flavonoïdes. L'isorhamnétine-3-O-rutinoside, le kaempférol-3-O-rutinoside et le rutoside ont été caractérisés dans plusieurs études, tandis que l'identification par LC-MS de l'épicatéchine-7-O- β -glucopyranoside et de la quercétine-5b-O-sinapyl-2''-O-apiosyl-3-O-rutinoside a du être complétée par une analyse par RMN afin d'apporter les précisions structurales nécessaires.

Les propriétés biologiques de ces composés sont multiples et permettent aux sous-produits issus de la cameline d'être employés dans de nombreux secteurs, malgré l'intérêt relativement récent que lui portent les industries. Les propriétés des polyphénols, en particulier des dérivés de la quercétine, présentent des propriétés antimicrobiennes, antimutagènes, veinotoniques, anti-inflammatoires, antiallergiques et antioxydantes intéressantes leur conférant un intérêt nutraceutique. Des spécialités pharmaceutiques à base de rutoside ont déjà prouvé leur efficacité, et il a été démontré qu'un apport en flavonoïdes permet de retarder la progression de nombreuses maladies chroniques [3, 7]. L'identification des substances bioactives offre la possibilité d'exploiter au mieux les sous-produits issus de la cameline. De plus, les conditions de culture, l'impact environnemental sur sa composition phytochimique et les interactions éventuelles sont de plus en plus étudiés et permettent l'amélioration de la qualité en vue d'une utilisation optimale de l'huile, des graines et des tourteaux de cameline. La culture en milieu semi-aride nécessitant un bas niveau d'intrants fait de la cameline une culture alternative à fort potentiel agronomique. Cette plante possède de nombreuses propriétés liées à la composition de son huile et de ses graines utiles en applications industrielles dans les domaines de la nutrition,

la santé, l'agriculture. L'huile, riche en oméga-3, contient 40% d'acide α -linoléique, atout important dans l'alimentation humaine. Elle est ainsi de plus en plus exploitée, notamment par la commercialisation de compléments alimentaires et cosmétiques, mais également en tant que biocarburant [3]. Riche en antioxydants naturels et nutriments essentiels, *Camelina sativa* représente donc une source accessible et peu onéreuse de polyphénols naturels. Son fort potentiel à gérer le stress oxydatif constitue un atout pour l'industrie alimentaire ou pharmaceutique, notamment dans la prévention de nombreuses maladies chroniques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. Zubr et B. Matthäus, "Effects of growth conditions on fatty acids and tocopherols in *Camelina sativa* oil", *Industrial Crops and Products*, vol. 15, pp. 155–162, 2002.
- [2] A. Schuster et W. Friedt, "Glucosinolate content and composition as parameters of quality of *Camelina* seed", *Industrial Crops and Products*, vol. 7, pp. 297–302, 1998.
- [3] P. Terpinč, T. Polak, D. Makuc, N. P. Ulrih et H. Abramovič, "The occurrence and characterisation of phenolic compounds in *Camelina sativa* seed, cake and oil", *Food Chemistry*, vol. 131, pp. 580–589, 2012.
- [4] C. M. Francis et M.C. Campbell, "New high quality oil seed crops for temperate and tropical Australia", *Rural Industries Research and Development Corporation*, 2003.
- [5] P. G. Peiretti et G. Meineri, "Fatty acids, chemical composition and organic matter digestibility of seeds and vegetative parts of false flax (*Camelina sativa* L.) after different lengths of growth", *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 133, pp. 341–350, 2007.
- [6] F. Fratianni, F. Cardinale, A. Cozzolino, T. Granese, S. Pepe, R. Riccardi, P. Spigno, R. Coppola et F. Nazzaro, "Polyphenol composition and antioxidant activity of two autochthonous Brassicaceae of the campania region, southern Italy", *Food and Nutrition Sciences*, vol. 5, pp. 66–70, 2014.
- [7] M.A. Berhow, S.F. Vaughn, B.R. Moser, D. Belenli et U. Polat, "Evaluating the phytochemical potential of *Camelina*: an emerging new crop of old world origin", *Recent Advances in Phytochemistry*, vol. 44, pp. 129–148, 2014.
- [8] M. E. Cartea, M. Francisco, P. Soengas et P. Velasco, "Phenolic compounds in *Brassica* vegetables", *Molecules*, vol. 16, pp. 251–280, 2011.
- [9] J. Onyilagha, A. Bala, R. Hallett, M. Gruber, J. Soroka et N. Westcott, "Leaf flavonoids of the cruciferous species, *Camelina sativa*, *Crambe* spp., *Thlaspi arvense* and several other genera of the family Brassicaceae", *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 31, pp. 1309–1322, 2003.
- [10] A. Smadi, "Etude de l'extrait chloroformique d'*Oudneya africana*", Université de El-Hadj Lakhdar Batna, 2006.
- [11] A. Francis et S. I. Warwick, "The biology of canadian weeds . 142 . *Camelina alyssum* (Mill.) Thell .; *C. microcarpa* Andrz . ex DC .; *C. sativa* (L.) Crantz", *Canadian Journal of Plant Science*, vol. 89, pp. 791-810, 2009.
- [12] R. Russo, "Biochemical characterization of flour from seeds of *Camelina sativa* L. (Crantz) after chemical extraction of oil", Université de Milan, 2012.
- [13] J. Zubr, "Oil-seed crop: *Camelina sativa*", *Industrial Crops and Products*, vol. 6, pp. 113–119, 1997.

- [14] A. Sampath, "Chemical characterization of *Camelina* seed oil", Université du New Jersey, 2009.
- [15] R. Tsao, "Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols", *Nutrients*, vol. 2, pp. 1231–1246, 2010.
- [16] M. Škerget, P. Kotnik, M. Hadolin, A. R. Hraš, M. Simonič et Ž. Knez, "Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities", *Food Chemistry*, vol. 89, pp. 191–198, 2005.
- [17] A. Castañeda-Ovando, M. D. L. Pacheco-Hernández, M. E. Páez-Hernández, J. A. Rodríguez et C. A. Galán-Vidal, "Chemical studies of anthocyanins: a review", *Food Chemistry*, vol. 113, pp. 859–871, 2009.
- [18] P. Arapitsas, P. J. R. Sjöberg et C. Turner, "Characterisation of anthocyanins in red cabbage using high resolution liquid chromatography coupled with photodiode array detection and electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry", *Food Chemistry*, vol. 109, pp. 219–226, 2008.
- [19] Z. Y. Ju et L. R. Howard, "Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin", *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, pp. 5207–5213, 2003.
- [20] J. Brzozowska et P. Hanower, "Sur les composés phénoliques des végétaux et leur rapport avec un déficit hydrique chez des cotonniers", *Annales de l'Université d'Abidjan*, tome 12, 1976.
- [21] U. Roessner, C. Wagner, J. Kopka, R. N. Trethewey et L. Willmitzer, "Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry", *The Plant Journal*, vol. 23, pp. 131–142, 2000.
- [22] J. Lisec, N. Schauer, J. Kopka, L. Willmitzer et A. R. Fernie, "Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants", *Nat. Protoc.*, vol. 1, pp. 387–396, 2006.
- [23] P. Terpinc, B. Čeh, N. P. Ulrih et H. Abramovič, "Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts", *Industrial Crops and Products*, vol. 39, pp. 210–217, 2012.
- [24] P. Terpinc, T. Polak, N. Šegatin, A. Hanzlowsky, N. P. Ulrih et H. Abramovič, "Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids", *Food Chemistry*, vol. 128, pp. 62–69, 2011.
- [25] B. Matthäus et J. Zubr, "Variability of specific components in *Camelina sativa* oilseed cakes", vol. 12, pp. 9–18, 2000.
- [26] H. Abramovič, B. Butinar et V. Nikolič, "Changes occurring in phenolic content, tocopherol composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil during storage", *Food Chemistry*, vol. 104, pp. 903–909, 2007.
- [27] M. A. Berhow, U. Polat, J. A. Glinski, M. Glensk, S. F. Vaughn, T. Isbell, I. Ayala-Diaz, L. Marek et C. Gardner, "Optimized analysis and quantification of glucosinolates from *Camelina sativa*

- seeds by reverse-phase liquid chromatography”, *Industry Crops and Products*, vol. 43, pp. 119–125, 2013.
- [28] M. E. Daxenbichler, G.F. Spencer, D.G. Carlson, G.B. Rose, A.M. Brinker et R.G. Powell, “Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants”, *Phytochemistry*, vol. 30, pp. 2623–2638, 1991.
- [29] J. Zubr et R. Matzen, “Mixed vegetable and diesel oil as fuel”, *Biomass for Energy and the Environment*, vol.10, pp. 1644-1653, 1996.
- [30] J. Zubr, “Qualitative variation of *Camelina sativa* seed from different locations”, *Industrial Crops and Products*, vol. 17, pp. 161–169, 2003.
- [31] “Council directive 1999/29/EC of 22 April 1999 on the undesirable substances and products in animal nutrition”, *Official Journal of the European Communities*, 1999.
- [32] M. Naczek et F. Shahidi, “Extraction and analysis of phenolics in food”, *J. Chromatogr. A*, vol. 1054, pp. 95–111, 2004.
- [33] D. Yuan, “Analysis of oilseed glucosinolates and their fate during pressing or dehulling”, *Université de Saskatchewan*, 2014.
- [34] I. Krasteva et S. Nikolov, “Flavonoids in *Astragalus corniculatus*”, *Quim. Nova*, vol. 31, pp. 59–60, 2008.
- [35] Z. Güvenhalp, H. Ozbek, T. Unsalar, C. Kazaz et L.O. Demirezer, “Iridoid, flavonoid and phenylethanoid glycosides from *Wiedemannia orientalis*”, *Turk J Chem*, vol. 30, pp. 391–400, 2006.
- [36] D. Gutzeit, V. Wray, P. Winterhalter et G. Jerz, “Preparative isolation and purification of flavonoids and protocatechuic acid from sea buckthorn juice concentrate (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) by high-speed counter-current chromatography”, *Chromatographia*, vol. 65, pp. 1–7, 2007.
- [37] L. Farias et A.S.L. Mendez, “LC/ESI-MS method applied to characterization of flavonoids glycosides in *B. forficata* subsp. *pruinosa*”, *Quim. Nova*, vol. 37, pp. 483–486, 2014.
- [38] A. Brito, J. E. Ramirez, C. Areche, B. Sepúlveda et M. J. Simirgiotis, “HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile”, *Molecules*, vol. 19, pp. 17400–17421, 2014.
- [39] X.-Q. Chen, K. Zan, J. Yang, M.-X. Lai et Q. Wang, “A novel flavanone from *Ilex hainanensis* Merr.”, *Natural Product Research*, vol. 23, pp. 442–447, 2009.
- [40] Y. Zhao, X. Li, X. Zeng, S. Huang, S. Hou et X. Lai, “Characterization of phenolic constituents in *Lithocarpus polystachyus*”, *Anal. Methods*, 2014.
- [41] S. Kreuz, E. Joubert, K.-H. Waldmann et W. Ternes, “Aspalathin, a flavonoid in *Aspalathus linearis* (rooibos), is absorbed by pig intestine as a C-glycoside”, *Nutrition Research*, vol. 28, pp. 690–701, 2008.

- [42] A. Benavides, P. Montoro, C. Bassarello, S. Piacente et C. Pizza, "Catechin derivatives in *Jatropha macrantha* stems: characterisation and LC/ESI/MS/MS quali-quantitative analysis", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 40, pp. 639–647, 2006.
- [43] J. L. Donovan, D. L. Luthria, P. Stremple et A. L. Waterhouse, "Analysis of catechin, epicatechin and their 3'- and 4'-O-methylated analogs, a comparison of sensitive methods", *J. Chromatogr. B*, vol. 726, pp. 277–283, 1999.
- [44] A. Quéro, R. Molinié, D. Mathiron, B. Thiombiano, J-X. Fontaine, D. Brancourt, H. Demailly, G. Mongelard, S. Pilard, B. Thomasset et F. Mesnard, "Metabolite profiling of *Camelina sativa* seeds in development", *Journal of Natural Products*, 2016 (en soumission).
- [45] R. Marek, A. De Groot, R. Dommissé, G. Lemiére et M. Potacek, "(+)-catechin: benzoyl protection of OH groups and NMR study of products", *Chem. Papers*, vol. 51, pp. 107–110, 1997.
- [46] C-B. Cui, Y. Tezuka, T. Kikuchi, H. Nakano, T. Tamaoki et J-H. Park, "Constituents of a fern, *Davallia mariesii* Moore. IV. Isolation and structures of a novel norcarotane sesquiterpene glycoside, a chromone glucuronide, and two epicatechin glycosides", *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 40, pp. 2035–2040, 1992.
- [47] L.Y. Foo et J.J. Karchesy, "Polyphenolic glycosides from douglas fir inner bark", *Phytochemistry*, vol. 28, pp. 1237–1240, 1989.
- [48] M. Jung, J. Choi, H-S. Chae, J. Y. Cho, Y-D. Kim, K. M. Htwe, W-S. Lee, Y-W. Chin, J. Kim et K. D. Yoon, "Flavonoids from *Symplocos racemosa*", *Molecules*, vol. 20, pp. 358–365, 2015.
- [49] C. Cren-Olivé, J. Wieruszkeski, E. Maes et C. Rolando, "Catechin and epicatechin deprotonation followed by ¹³C NMR", *Tetrahedron Letters*, vol. 43, pp. 4545–4549, 2002.
- [50] S.H. Qi, D.G. Wu, Y.B. Ma et X.D. Luo, "A novel flavane from *Carapa guianensis*", *Acta Botanica Sinica*, vol. 45, pp. 1129–1133, 2003.
- [51] T. Hatano, H. Miyatake, M. Natsume, N. Osakabe, T. Takisawa, H. Ito et T. Yoshida, "Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects", *Phytochemistry*, vol. 59, pp. 749–758, 2002.
- [52] Z. Guvenalp, N. Kilic, C. Kazaz, Y. Kaya et L.O. Demirezer, "Chemical constituents of *Galium tortumense*", *Turkish J. Chem.*, vol. 30, pp. 515–523, 2006.
- [53] F. Fathiazad, A. Delazar, R. Amiri et S.D. Sarker, "Extraction of flavonoids and quantification of rutin from waste tobacco leaves", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 3, pp. 222–227, 2006.
- [54] M. Andersen, M. Jordheim, R. Byamukama, A. Mbabazi, G. Ogweng, I. Skaar et B. Kiremire, "Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae)", *Phytochemistry*, vol. 71, pp. 1558–1563, 2010.
- [55] L-X. Duan, B-M. Feng, F. Chen, J-Y. Liu, F. Li, Y-Q. Wang et Y-H. Pei, "Sinapic acid derivatives from the seeds of *Raphanus nussatirus* L.," *J. Asian Nat. Prod. Res.*, vol. 9, pp. 557–561, 2007.

- [56] S-K. Chung, T. Osawa et S. Kawakishi, "Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*)", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 61, pp. 118–123, 1997.

Résumé

Camelina sativa est une plante oléagineuse de la famille des Brassicacées possédant de nombreuses caractéristiques agronomiques qui en font une culture alternative attrayante. Elle suscite en effet un intérêt en raison d'une demande croissante pour des cultures oléagineuses à bas niveaux d'intrants, aptes à permettre l'exploitation de leurs produits dérivés dans l'alimentation animale et humaine. Ses propriétés en tant que biocarburant mais également dans le domaine de la nutraceutique sont depuis peu de plus en plus étudiées et développées, grâce à son potentiel économique avantageux ainsi qu'à sa composition phytochimique. La teneur importante en acides gras oméga-3 de l'huile, ainsi que les propriétés biologiques des différents composants de la graine sont particulièrement intéressantes. Cette étude a permis de caractériser plus finement son contenu phytochimique et plus spécifiquement sa composition en flavonoïdes et glucosinolates. Des composés connus ont ainsi été retrouvés, tels le rutoside et la glucocamelinine, majoritaires, mais également d'autres composés minoritaires peu décrits jusqu'à présent à l'aide de méthodes d'analyses par LC-MS et RMN.

Mots clefs

Camelina sativa, graine, LC-MS, RMN, glucosinolates, flavonoïdes.

Abstract

Camelina Sativa is a Brassicaceae oilseed plant. With many desirable agronomic characteristics, this plant can be used as an alternative and revolutionary break crop. This low-input oilseed has gained new attention and increasing demand, and has also been promoted as a dietary supplement in human and animal nutrition. Due to the phytochemical composition and the high economic potential of this oil, multiple studies have been performed nowadays to study its role in the nutraceutical sector and as a biofuel. The high content of omega-3 fatty acids and biological properties of components of *Camelina sativa* seeds are particularly interesting. This study allowed us to characterize more precisely its phytochemical content, and in particular its composition in flavonoids and glucosinolates, to recover compounds known (rutin and glucocamelinin being the most abundant), but also to analyze other little-known minor compounds up until now, by LC-MS and NMR.

Keywords

Camelina sativa, seed, LC-MS, NMR, glucosinolates, flavonoids.