



**HAL**  
open science

**Étude bibliographique et analytique des acides  $\beta$ -boswelliques et des guggulstérones, molécules constitutives des résines d'encens et de myrrhe, excipients d'un médicament à usage humain dans un nouveau contexte réglementaire**

Jana Machenaud

► **To cite this version:**

Jana Machenaud. Étude bibliographique et analytique des acides  $\beta$ -boswelliques et des guggulstérones, molécules constitutives des résines d'encens et de myrrhe, excipients d'un médicament à usage humain dans un nouveau contexte réglementaire . Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01614373

**HAL Id: dumas-01614373**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01614373>**

Submitted on 10 Oct 2017

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

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

Université de Bordeaux  
U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2017

N°56

Thèse pour l'obtention du

**DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement par

**Jana MACHENAUD**

DOCTEUR EN BIOLOGIE - PHYSIOLOGIE VEGETALE

Née le 20 octobre 1980 à Grenoble

Le 30 Juin 2017

**Etude bibliographique et analytique des acides  $\beta$ -boswelliques et des guggulstérones, molécules constitutives des résines d'encens et de myrrhe, excipients d'un médicament à usage humain dans un nouveau contexte réglementaire**

Directeur de thèse

Madame Chantal BOYER

Jury

|                              |  |           |
|------------------------------|--|-----------|
| Madame Chantal BOYER         | Maître de conférences                                      | Président |
| Madame Boutayna RHOURLI-FRIH | Maître de conférences                                      | Assesseur |
| Monsieur David MARGAINE      | Pharmacien Responsable<br>Laboratoire Pionneau             | Assesseur |
| Monsieur Pierre LARROQUE     | Pharmacien Responsable<br>Intérimaire Laboratoire Pionneau | Assesseur |



*Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;*

*D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.*



Je tiens à mettre en garde le lecteur sur la longueur de ce préambule. Il n'est peut-être pas très académique de s'étendre ainsi sur les remerciements que l'on adresse aux personnes qui ont, de près ou de loin, participé à l'aboutissement de mes études. C'est justement parce que toutes les personnes que je vais citer ont apporté leur contribution ; à ces années partagées que je veux leur rendre hommage et leur témoigner ma reconnaissance. C'est avec beaucoup d'émotions que je rédige ces remerciements.

Je dédie mes premiers remerciements au Laboratoire Pionneau dans lequel j'ai pu réaliser mes deux stages consécutifs. Monsieur Pionneau, je vous remercie de m'avoir fourni un sujet de thèse passionnant et d'actualité. J'ai été profondément touchée par vos encouragements et la confiance que vous m'avez accordée. Je suis heureuse du bout de chemin que nous avons fait ensemble. Vous êtes la preuve vivante que la passion des Sciences persiste bien au-delà d'une simple carrière. Veuillez recevoir mes sincères remerciements.

A tous les membres de l'équipe du Laboratoire Pionneau, je vous remercie pour votre professionnalisme, votre dynamisme et votre soutien durant ce stage de fin d'études et pour avoir fait en sorte que chaque jour travaillé ensemble soit agréable. Soyez assurés de mon profond respect.

Je tiens à remercier Nicolas et Olivier Pionneau pour leur accueil chaleureux et pour tous les échanges partagés.

David Margaine et Pierre Larroque, vous m'avez fait partager votre passion de la profession pharmaceutique et m'avez donné la possibilité d'acquérir une expérience précieuse tout au long de ce stage. Vous avez grandement contribué à la pharmacienne que je suis aujourd'hui. Je vous remercie également du temps que vous avez consacré à ma correction de thèse. Merci d'être venus me chercher à chaque fois que les transports en commun m'ont fait défaut. J'ai été plus que ravie de passer mes petits moments de pause avec vous, c'était toujours de beaux instants de partages et de rigolades.

Christophe Janot, mon binôme de paillasse, mon instructeur sur Chromeleon®. Je garde au fond de mon cœur nos franches rigolades qui m'ont fait tant de bien. Je vous remercie de tout ce temps que vous m'avez consacré, de toute l'énergie que vous avez déployée pour faire que tout fonctionne au Laboratoire. Christophe, je vous fais la promesse que mes prochaines recherches se feront sur le coquelicot. J'ai juste un dernier mot à vous dire : « magnifique ! ».

Muriel Fauquey, ces moments partagés avec vous resteront gravés dans mon cœur, j'emporte tous ces souvenirs avec moi comme un trésor. Je vous remercie de toutes vos petites intentions quotidiennes, de votre écoute qui m'ont données de la force et du courage pour avancer. J'ai adoré toutes les surprises que vous m'avez apportées au moment des repas.

Je tiens également à remercier tous les membres du jury.

A ma présidente et directrice de thèse, Madame Chantal Boyer, pour l'honneur que vous me faites de présider ma thèse. Merci pour ce temps que vous m'avez accordé malgré votre emploi du temps chargé, veuillez trouver mes sincères remerciements. Je garderai un excellent souvenir de votre positivité et de nos échanges qui ont toujours été fructueux. Je suis heureuse d'être la dernière pharmacienne que vous diplômerez.

A Madame Boutayna Rhourri-Frih, pour l'honneur que vous me faites de siéger parmi les membres du jury, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance. A une passion commune des sciences végétales.

A Monsieur David Margaine, vous m'avez fait l'honneur de bien vouloir accepter d'être membre de ce jury. Pour m'avoir guidée lors de mes deux stages, soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur Pierre Larroque, pour l'honneur que vous me faites de bien vouloir accepter d'être membre du jury. Pour votre disponibilité et votre bienveillance, soyez assuré de mes sincères remerciements.

Mes études de Pharmacie m'ont permis également de faire de belles rencontres. Je tiens à remercier Mélanie, Thomas, Florian et Jérémy, grâce à vous j'ai pu vivre une vraie vie d'étudiante. Nous avons été inséparables pendant ces quatre années. Nous avons partagé de grands moments de joie ainsi que les périodes stressantes des examens. Avec tous ces fous rires au RU, j'ai retrouvé mes 20 ans. Mélanie, ma choupette, avec qui j'ai fait mes premiers pas à l'hôpital. Nous avons travaillé main dans la main pour aider à la publication d'un poster. Juste un dernier point à éclaircir : « les ribosomes à 3 sites, quelle révolution !! Moi de mon temps il n'y en avait que 2 ». Ce petit moment de fou rire reste gravé dans ma mémoire.

Jérémy, mon coup de cœur, tu as tenu une place primordiale sur ces 4 années. Tu m'as donné un savoir que je n'aurais pu imaginer posséder un jour. Toutes mes questions ont toujours trouvé réponses. Grâce à toi, j'ai décroché des notes exemplaires, des notes que je rêvais d'obtenir. Ton intelligence, ta rigueur ont été plus que bénéfiques pour moi. Le 18/20 en informatique-mathématiques, ma bête noire, en est la preuve. Cette force de caractère t'a conduit à obtenir ton internat du premier coup sans aucune aide extérieure, je voulais encore te féliciter pour cet exploit. Merci pour ta gentillesse, ta patience et les heures passées à mes côtés. Tu as su effacer mes larmes dans les moments de doute. Nous formons une belle équipe.

Au-delà de ces années de pharmacie, je voudrais remercier des personnes qui ont cru en moi sur ces 17 ans d'études. Ces personnes ont eu un impact positif dans ma réussite et dans mon dépassement.

Madame Fontaine, professeur de mathématiques au Lycée Brémontier, vous m'avez enseigné pendant tout un été votre discipline avec dévouement, me permettant ainsi d'accéder à la faculté. Votre conviction et votre croyance en moi m'ont permis d'avancer. Merci pour ce beau geste.

Sandrine Eveillard, chercheur à l'INRA, personne de caractère et d'excellence, vous m'avez permis de me révéler. Nous avons écrit une publication ensemble, qui a été ma première récompense en tant que chercheur. Pour ma première thèse, vous m'avez fait l'honneur d'être présente et de faire partie des membres du jury. Je voudrais vous remercier encore une fois car vous m'avez donné les clés de la réflexion scientifique et de l'autonomie. Vous êtes l'une des plus belles rencontres de ma vie.

Monsieur Pierre-Vincent Graves, Professeur de Biochimie à la Faculté de Bordeaux, vous avez été un soutien pour moi pendant toute la durée de mes études. Vous avez pris le temps de me comprendre et vous m'avez fait confiance. Vous avez gardé un œil bienveillant à mon égard. Je vous remercie de m'avoir aidé à atteindre mes rêves. Je vous remercie de m'avoir préparé aux concours de Pharmacie. J'espère que vous êtes fier de moi.

Monsieur Bernard Muller, Doyen de la Faculté de Pharmacie, je vous remercie de m'avoir sélectionné le jour de mon examen pour intégrer les études de Pharmacie. Merci de votre confiance. Grâce à vous, j'ai réalisé mon plus beau rêve : devenir Pharmacienne. Je suis très fière de faire partie aujourd'hui de cette grande famille et d'être la plus vieille pharmacienne diplômée ces dernières années à Bordeaux.

Mes derniers remerciements et non les moindres vont à ma famille. Un fameux jour de l'année 1997, je vous ai fait part de mon choix de vie. Je voulais tout savoir, j'avais soif d'apprendre, je voulais faire de hautes études. Sans aucune hésitation, vous avez signé en bas de cette feuille blanche où mon destin n'était pas encore écrit. Vous m'avez aimé, porté et choyé.

Edith, ma maman de cœur, tu as été présente pour moi tout au long de ces 17 ans. Le savoir que tu m'as transmis m'a beaucoup apporté. Merci d'avoir trouvé les mots réconfortants dans mes moments de doutes et de découragements. Merci de ta présence en ce jour de bonheur.

Mon frère, Yohan, a tenu une place particulière. Ta présence est stratégique car tu as toujours été présent lorsque les efforts étaient les plus intenses. Tu as participé à ma première thèse en travaillant dans les champs de roses. Que de beaux souvenirs ! Tu as été le seul à me faire rire quand les larmes coulaient. Tu es le frère que je rêvais d'avoir mais je tiens à souligner qu'à cause de toi, je n'ai pas eu ma poupée Corolle ! Merci pour tout.



Maman, combien as-tu passé d'examens, combien de nuits blanches avons-nous passé ensemble ? Tu as réalisé un joli herbier pour m'aider à comprendre la complexité du mode végétal. Ainsi, notre plus belle récompense, en première année de pharmacie, est le 19 sur 20 en botanique qui nous a valu la première place du classement. En plus d'être ma référence, tu as été celle d'un chercheur de la Faculté de Pharmacie, Monsieur Alain Badoc, qui t'a citée dans ses travaux suite à tes connaissances sauvages des Cucurbitacées. On ne se demande pas pourquoi aujourd'hui je suis passionnée par le domaine végétal. Grâce à toi, j'ai développé cette force de caractère, cette rage de vaincre. Je l'ai fait pour nous, maman. A coups de livres, j'ai franchi tous ces murs.

Mes dernières lignes sont pour toi, mon papa de cœur, mon protecteur, toi, qui as fait que ma vie a pu prendre une autre route, une route semée de lumière, d'accomplissement et de bonheur. Dans chaque pas que j'ai fait, chaque montagne que j'ai gravi, c'est ton image que j'avais en moi. Tu as eu un regard bienveillant. Tu as soigné mon cœur et ma tête, partie de mon corps la plus importante sur ces 17 ans d'études à l'université. Ce deuxième doctorat, je te le dédie. Tu vois, tu n'es pas le seul à écrire des livres. Je te souhaite autant de plaisir et de satisfaction dans tes prochaines écritures que j'ai pu avoir en écrivant la mienne.

A ma famille, je vous aime tous très fort.

Je terminerai en disant : « Fais de ta vie un rêve, et d'un rêve une réalité ».

|  |    |
|--|----|
| Introduction.....  | 31 |
| Chapitre 1 : Les excipients du CCAP® dans le contexte réglementaire.....         | 35 |
| I.  Laboratoire Pionneau et le CCAP® .....                                       | 36 |
| II. Référentiels opposables .....  | 37 |
| A.  Le code de la santé publique .....   | 37 |
| B.  Les Pharmacopées.....  | 37 |
| C.  Les Good Manufacturing Practices : Les Bonnes Pratiques de Fabrication ..... | 38 |
| III.  La notion de risque dans un système qualité.....                           | 39 |
| A.  ICH Q9 : la gestion du risque qualité [10 - 11].....                         | 39 |
| B.  Les Lignes Directrices du 19 mars 2015.....                                  | 41 |
| IV.  Objectifs du travail de thèse.....  | 42 |
| Chapitre 2 : Les oléo-gommo-résines de plantes.....                              | 45 |
| I.  Généralités .....  | 46 |
| A.  Définition de l’appellation oléo-gommo-résine .....                          | 46 |
| B.  Rôles des oléo-gommo-résines végétales et organes sécréteurs .....           | 47 |
| II.  Cas de l’encens et la myrrhe : composition chimique et toxicité.....        | 49 |
| A.  La partie oléo : huiles essentielles.....                                    | 49 |
| B.  La partie gomme : polysaccharides .....                                      | 52 |
| C.  La partie résine : polyterpènes.....   | 54 |
| Chapitre 3 : Oléo-gommo-résine d’encens : Boswellia .....                        | 57 |
| Chapitre 3.1 : Dossier bibliographique .....                                     | 57 |
| I.  Présentation végétale de Boswellia .....                                     | 58 |
| A.  Origine botanique et distribution géographique .....                         | 58 |
| B.  Production d’oléo-gommo-résine .....   | 60 |
| C.  Utilisations et propriétés.....  | 60 |
| II.  Fraction résineuse .....  | 61 |
| A.  Composition chimique.....  | 62 |
| 1.  Origine et voies de synthèse .....   | 62 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 2.  | Les diterpènes .....   | 63 |
| 3.  | Les triterpènes.....   | 63 |
| B.  | Etude pharmacologique de l'oléo-gommo-résine et des acides boswelliques.....                         | 67 |
| 1.  | Mécanismes d'action expliquant les effets anti-inflammatoires .....                                  | 68 |
| a)  | Action sur la synthèse des eicosanoïdes .....  | 68 |
| b)  | Action sur les élastases leucocytaires .....   | 69 |
| c)  | Activité anti-complémentaire.....  | 69 |
| 2.  | Applications des effets anti-inflammatoires sur différentes pathologies .....                        | 69 |
| a)  | Arthrose.....  | 70 |
| b)  | Polyarthrite Rhumatoïde .....  | 71 |
| c)  | Arthrite .....   | 71 |
| d)  | Asthme .....   | 72 |
| e)  | Psoriasis .....  | 72 |
| f)  | Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.....  | 73 |
| 3.  | Applications commerciales.....   | 73 |
| 4.  | Pharmacocinétique .....  | 74 |
| a)  | Par voie orale.....  | 74 |
| b)  | Par voie topique .....   | 74 |
| C.  | Etude toxicologique de l'oléo-gommo-résine et des acides $\beta$ -boswelliques .....                 | 74 |
| 1.  | Toxicité aiguë.....  | 74 |
| 2.  | Toxicité chronique .....   | 75 |
| 3.  | Evaluation de la sécurité lors d'une administration par voie topique .....                           | 75 |
| D.  | Conclusion .....   | 76 |
|     | Chapitre 3.2 : Dossier analytique .....  | 79 |
| I.  | Caractéristiques physico-chimiques de l'acide $\beta$ -boswellique et de ses formes cétoniques ..... | 80 |
| II. | Études analytiques connues en HPLC.....  | 83 |
| A.  | Identification des triterpènes de Boswellia en LC-MS/MS.....   | 83 |
| B.  | Dosage des acides boswelliques et lupéoliques en HPLC-UV .....                                       | 84 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| C.   | Récapitulatif des méthodes de dosage des acides $\beta$ -boswelliques ..... | 86 |
| III. | Matériels.....  | 88 |
| A.   | Techniques analytiques : UHPLC-UV [93].....                                 | 88 |
| 1.   | Principe de fonctionnement de l'appareil.....                               | 88 |
| a)   | Méthode de séparation par UHPLC.....  | 88 |
| b)   | Choix des colonnes .....  | 90 |
| (1)  | Colonne Synchronis® C18 .....   | 90 |
| (2)  | Colonne Kinetex® Phenylhexyle .....   | 91 |
| c)   | Mode de détection UV .....  | 91 |
| 2.   | Analyse des données chromatographiques .....                                | 92 |
| a)   | Qualitative .....   | 92 |
| b)   | Quantitative.....   | 95 |
| B.   | Echantillons utilisés lors de l'étude .....                                 | 96 |
| 1.   | Témoins .....   | 96 |
| 2.   | Matière première : l'encens .....   | 96 |
| 3.   | Le CCAP®.....   | 96 |
| IV.  | Méthodes .....  | 97 |
| A.   | Préparation des échantillons.....   | 97 |
| 1.   | Préparation des témoins .....   | 97 |
| a)   | Cas de C1 et C2 .....   | 97 |
| (1)  | Selon le protocole de la Pharmacopée Européenne [14].....                   | 97 |
| (2)  | Optimisation de la préparation du témoin C1.....                            | 97 |
| b)   | Cas de B1 .....   | 98 |
| (1)  | Selon le protocole de la publication de 2014 [96].....                      | 98 |
| (2)  | Optimisation de la préparation du témoin B1 .....                           | 98 |
| (3)  | Evaluation de la perte à l'évaporation/reprise .....                        | 98 |
| 2.   | Préparation de la matière première : encens .....                           | 99 |
| a)   | Selon le protocole de la Pharmacopée Européenne .....                       | 99 |

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| b)  | Selon l'AMM du CCAP® .....   | 99  |
| c)  | Cas de C1 : étude de la perte à la filtration .....                  | 99  |
| 3.  | Préparation des échantillons de CCAP® .....                          | 99  |
| a)  | Pur .....  | 99  |
| b)  | Cas de C1 et C2 : CCAP® concentré .....                              | 99  |
| c)  | Cas de B1 : CCAP® repris dans le méthanol.....                       | 100 |
| B.  | Techniques chromatographiques.....                                   | 100 |
| 1.  | Méthode de séparation.....   | 100 |
| a)  | Cas de C1 et C2 .....  | 100 |
| b)  | Cas de B1 .....  | 101 |
| (1) | Protocole de la publication de 2014 [96] .....                       | 101 |
| (2) | Optimisation de la méthode d'analyse .....                           | 102 |
| 2.  | Mode de détection .....  | 102 |
| a)  | Cas de C1 et C2 .....  | 102 |
| (1) | Selon le protocole de la Pharmacopée Européenne .....                | 102 |
| (2) | Optimisation des paramètres de détection de C1 .....                 | 102 |
| b)  | Cas de B1 .....  | 103 |
| (1) | Selon le protocole de la publication de 2014 [96].....               | 103 |
| (2) | Optimisation des paramètres de détection .....                       | 103 |
| 3.  | Validation de la méthode de dosage de C1 et C2 .....                 | 103 |
| a)  | Linéarité, spécificité.....  | 103 |
| b)  | Exactitude et fidélité .....   | 104 |
| c)  | Répétabilité inter-journalière.....                                  | 106 |
| 4.  | Rendement de l'étape de concentration par distillation/reprise ..... | 106 |
| 5.  | Dosage dans le CCAP® .....   | 107 |
| a)  | Cas de C1 et C2 .....  | 107 |
| b)  | Cas de B1 .....  | 107 |
| V.  | Résultats .....  | 107 |

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| A.  | Cas de C1 et C2 .....  | 108 |
| 1.  | Développement de la méthode de préparation des témoins.....                        | 108 |
| a)  | Selon le protocole de la Pharmacopée Européenne .....                              | 108 |
| b)  | Optimisation des paramètres analytiques .....                                      | 111 |
| (1) | Longueur d'onde de détection pour C1 .....   | 111 |
| (2) | Choix du solvant d'injection .....   | 112 |
| (a) | Comparaison Méthanol – Phase mobile .....  | 112 |
| (b) | Comparaison Méthanol – Ethanol 33%.....  | 114 |
| c)  | Selon le protocole optimisé.....   | 115 |
| 2.  | Développement de la méthode de préparation de la matière première : l'encens ..... | 116 |
| a)  | Selon la Pharmacopée Européenne .....  | 116 |
| b)  | Dans le cadre de l'AMM .....   | 119 |
| 3.  | Développement de la méthode de préparation du CCAP® .....                          | 122 |
| a)  | CCAP® pur.....   | 123 |
| b)  | CCAP® concentré .....  | 124 |
| 4.  | Validation de la méthode analytique .....  | 127 |
| a)  | Linéarité/Spécificité.....   | 127 |
| (1) | C1.....  | 127 |
| (2) | C2.....  | 130 |
| b)  | Fidélité/exactitude .....  | 133 |
| (1) | C1.....  | 133 |
| (2) | C2.....  | 134 |
| c)  | Répétabilité inter-journalière.....  | 135 |
| d)  | Rendement de l'étape de concentration par distillation/reprise .....               | 137 |
| 5.  | Dosage .....   | 139 |
| a)  | Gamme d'étalonnage .....   | 139 |
| b)  | Le CCAP® .....   | 141 |
| B.  | Cas de B1 .....  | 145 |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 1.   | Développement de la méthode à l'aide du témoin B1 .....                  | 145 |
| a)   | Selon le protocole de la publication de Nold (2014) .....                | 145 |
| b)   | Optimisation de la méthode d'analyse .....                               | 146 |
| (1)  | Choix du solvant de reprise .....  | 146 |
| (2)  | Choix des conditions chromatographiques .....                            | 148 |
| (3)  | Choix de la longueur d'onde.....   | 151 |
| 2.   | Identification de B1 dans l'encens .....                                 | 152 |
| 3.   | Identification et dosage de B1 dans le CCAP® .....                       | 153 |
| a)   | CCAP® pur.....   | 153 |
| b)   | CCAP® repris dans du méthanol.....                                       | 154 |
| (1)  | Evaluation de la perte à l'évaporation/reprise .....                     | 155 |
| (2)  | Détermination de la LOD.....   | 156 |
| 4.   | Perspectives.....  | 156 |
| VI.  | Conclusion .....   | 157 |
|      | Chapitre 4 : Oléo-gommo-résine de myrrhe : Commiphora .....              | 161 |
|      | Chapitre 4.1 : Dossier bibliographique.....                              | 161 |
| I.   | Présentation générale de Commiphora .....                                | 162 |
| A.   | Origine botanique et distribution géographique .....                     | 162 |
| B.   | Production d'oléo-gommo-résine .....                                     | 164 |
| C.   | Historique, utilisations et propriétés.....                              | 165 |
| II.  | Fraction résineuse .....   | 168 |
| A.   | Composition chimique.....  | 168 |
| III. | Etude pharmacologique de l'oléo-gommo-résine et des guggulstérones ..... | 174 |
| A.   | Mécanismes d'action expliquant les effets hypolipémiants .....           | 174 |
| 1.   | Action sur le métabolisme des acides biliaires et du cholestérol .....   | 174 |
| 2.   | Action sur la fonction thyroïdienne.....                                 | 175 |
| 3.   | Action sur le système catécholaminergique .....                          | 176 |
| B.   | Applications des effets thérapeutiques sur différentes pathologies ..... | 176 |

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 1.  | Pouvoir hypolipémiant .....  | 176 |
| 2.  | Autres effets .....  | 177 |
| C.  | Utilisation commerciale.....   | 178 |
| IV. | Etude toxicologique de l'oléo-gommo-résine et des guggulstérones.....      | 178 |
| A.  | Toxicité aiguë et subaiguë .....   | 179 |
| B.  | Toxicité chronique et sécurité d'emploi.....                               | 179 |
| 1.  | Evaluation en médecine traditionnelle .....                                | 179 |
| 2.  | Evaluation lors d'essais précliniques .....                                | 179 |
| 3.  | Evaluation lors d'essais cliniques .....                                   | 180 |
| V.  | Conclusion .....   | 180 |
|     | Chapitre 4.2 : Dossier analytique .....                                    | 183 |
| I.  | Caractéristiques physico-chimiques des E- et Z-guggulstérones .....        | 184 |
| A.  | Études analytiques connues en HPLC.....                                    | 185 |
| 1.  | Extraction des différentes fractions de l'oléo-gommo-résine de myrrhe..... | 185 |
| a)  | Première méthode .....   | 186 |
| 2.  | Deuxième méthode.....  | 187 |
| 3.  | Identification et quantification des guggulstérones en HPLC-UV .....       | 188 |
| 4.  | Comparaison des méthodes de dosage des guggulstérones .....                | 189 |
| II. | Matériels.....   | 190 |
| A.  | Techniques chromatographiques : UHPLC-UV .....                             | 190 |
| 1.  | Principe de fonctionnement de l'appareil.....                              | 190 |
| a)  | Méthode de séparation par UHPLC.....                                       | 190 |
| b)  | Mode de détection UV .....   | 191 |
| 2.  | Analyse des données chromatographiques .....                               | 191 |
| B.  | Echantillons utilisés lors de l'étude .....                                | 191 |
| 1.  | Témoins .....  | 191 |
| 2.  | Matière première : la myrrhe.....  | 191 |
| 3.  | Le CCAP® .....   | 191 |



|      |   |     |
|------|---|-----|
| III. | Méthodes .....  | 192 |
| A.   | Préparation des échantillons.....                                   | 192 |
| 1.   | Préparation des témoins .....                                       | 192 |
| a)   | Selon les données bibliographiques [130 - 132] .....                | 192 |
| b)   | Optimisation de la préparation du témoin Z.....                     | 193 |
| 2.   | Préparation de la matière première : myrrhe.....                    | 193 |
| a)   | Dans le méthanol.....   | 193 |
| b)   | Selon l'AMM du CCAP® .....  | 193 |
| 3.   | Préparation des échantillons de CCAP® .....                         | 194 |
| a)   | Pur .....   | 194 |
| b)   | Repris dans le méthanol .....                                       | 194 |
| (1)  | Evaluation de l'erreur liée à l'évaporation reprise.....            | 194 |
| (2)  | Application sur le CCAP® .....                                      | 194 |
| B.   | Techniques chromatographiques.....                                  | 194 |
| a)   | Méthode de séparation.....  | 194 |
| (1)  | Protocoles déjà publiés .....                                       | 195 |
| (a)  | Protocole 1 [131] .....   | 195 |
| (b)  | Protocole 2 [132] .....   | 196 |
| (2)  | Optimisation de la méthode d'analyse .....                          | 196 |
| b)   | Mode de détection .....   | 197 |
| (1)  | Selon les données de la littérature.....                            | 197 |
| (2)  | Optimisation des paramètres de détection de la Z-guggulstérone..... | 197 |
| C.   | Dosage dans le CCAP® : sensibilité .....                            | 198 |
| IV.  | Résultats .....   | 198 |
| A.   | Développement de la méthode analytique à partir des témoins .....   | 198 |
| 1.   | Identification des deux isomères .....                              | 198 |
| a)   | Selon le protocole 1 [131] .....                                    | 198 |
| b)   | Selon le protocole 2 [132] .....                                    | 200 |

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 2.  | Optimisation des paramètres analytiques .....                               | 201 |
| a)  | Optimisation de la méthode de séparation .....                              | 201 |
| b)  | Choix de la longueur d'onde.....  | 205 |
| c)  | Choix du solvant de reprise .....   | 206 |
| 3.  | Développement de la méthode analytique de la matière première : myrrhe..... | 207 |
| a)  | Extraction par le méthanol.....   | 208 |
| b)  | Selon l'AMM du CCAP® .....  | 210 |
| 4.  | Développement de la méthode analytique dans le CCAP®.....                   | 212 |
| a)  | CCAP® pur.....  | 213 |
| b)  | Evaluation de l'erreur liée à l'évaporation/reprise .....                   | 215 |
| c)  | Dosage de la Z-guggulstérone dans le CCAP® .....                            | 217 |
| (1) | Protocole .....   | 217 |
| (2) | Détermination de la LOD et LOQ.....   | 218 |
| V.  | Conclusion .....  | 219 |
|     | Conclusion Générale.....  | 221 |
|     | Références Bibliographiques.....  | 227 |
|     | Annexes .....   | 239 |
|     | Annexe 1 : Lignes Directrices du 19 mars 2015.....                          | 240 |
|     | Annexe 2 : Monographie de l'encens (Pharmacopée Européenne v9.0).....       | 244 |



|  |     |
|--|-----|
| Tableau 1 : Molécules majoritaires retrouvées dans l'huile essentielle d'encens.....   | 50  |
| Tableau 2 : Molécules principales retrouvées dans l'huile essentielle de myrrhe .....  | 50  |
| Tableau 3 : Structure chimique de deux constituants monosaccharidiques des gommages.....   | 53  |
| Tableau 4 : Classification phylogénétique de l'encens.....   | 58  |
| Tableau 5 : Molécules diterpéniques isolées de la résine de <i>Boswellia carterii</i> .....  | 63  |
| Tableau 6 : Groupes de molécules triterpéniques tétracycliques isolées de la résine d'encens.....  | 63  |
| Tableau 7 : Groupes de molécules triterpéniques pentacycliques isolées de la résine d'encens .....   | 64  |
| Tableau 8 : Molécules triterpéniques pentacycliques isolées de la résine d'encens.....   | 66  |
| Tableau 9 : Structure chimique de B1, C1 et C2.....  | 81  |
| Tableau 10 : Caractéristiques physico-chimiques de B1, C1 et C2.....   | 82  |
| Tableau 11 : Composition quantitative en triterpènes de la résine d'encens .....   | 84  |
| Tableau 12 : Proportions de B1, C1 et C2 dans les résines d'encens .....   | 85  |
| Tableau 13 : Comparaison des méthodes de dosage des acides boswelliques : B1, C1 et C2.....  | 86  |
| Tableau 14 : Photographie et structure chimique d'une colonne Synchronis® .....  | 90  |
| Tableau 15 : Schéma et photographie de particules de silice dans la colonne Kinetex® en MET et MEB [94] .....  | 91  |
| Tableau 16 : Exemples de différentes efficacités, sélectivités et résolutions.....   | 94  |
| Tableau 17 : Représentation du signal donné par la concentration en composé présent dans le détecteur à un instant $t$ (schéma de gauche) et du chromatogramme obtenu après enregistrement des signaux sur un intervalle de temps $\omega$ (schéma de droite)..... | 95  |
| Tableau 18 : Données du gradient de la monographie de l'encens selon la Pharmacopée Européenne .....   | 101 |
| Tableau 19 : Données du gradient de la publication de 2014 [96] .....  | 101 |
| Tableau 20 : Gamme d'étalonnage - C1 .....   | 104 |
| Tableau 21 : Gamme d'étalonnage - C2 .....   | 104 |
| Tableau 22 : Exactitude et fidélité – C1.....  | 105 |
| Tableau 23 : Exactitude et fidélité – C2.....  | 105 |
| Tableau 24 : Paramètres chromatographiques de C1 et C2.....  | 109 |
| Tableau 25 : Paramètres de séparation de C1 et C2 dans la solution fille .....   | 110 |

|  |     |
|--|-----|
| Tableau 26 : Paramètres chromatographiques de C1 à différentes longueurs d'onde .....  | 112 |
| Tableau 27 : chromatographiques de C1 à 250 nm, dissous dans du méthanol ou dans la phase mobile.....                                | 113 |
| Tableau 28 : Paramètres de séparation de C1 et C2 issus de l'injection en UHPLC-UV à 250 nm.....                                     | 116 |
| Tableau 29 : Paramètres de séparation de C1 et C2 dans la matière première .....   | 117 |
| Tableau 30 : Proportions de C1 et C2 dans la résine d'encens .....   | 118 |
| Tableau 31 : Paramètres de séparation de C1 et C2 dans la matière première .....   | 120 |
| Tableau 32 : Données quantitatives de C1 et C2 dans la résine d'encens .....   | 120 |
| Tableau 33 : Données quantitatives de C1 et C2 dans la résine d'encens .....   | 121 |
| Tableau 34 : Données brutes et interprétation statistique des résultats obtenus par les trois filtrats .....                         | 122 |
| Tableau 35 : Paramètres de séparation de C1 et C2 dans le CCAP® pur.....   | 123 |
| Tableau 36 : Données brutes correspondant à C1 et C2 dans le CCAP® pur .....   | 124 |
| Tableau 37 : Paramètres de séparation de C1 et C2 dans le CCAP® concentré.....   | 125 |
| Tableau 38 : Données brutes correspondant à C1 et C2 dans le CCAP® concentré.....  | 126 |
| Tableau 39 : Données brutes des points de gamme injectés – C1.....   | 127 |
| Tableau 40 : Données brutes des points de gamme injectés - C2 .....  | 130 |
| Tableau 41 : Données brutes et interprétation statistique des points permettant de déterminer la fidélité et l'exactitude – C1 ..... | 133 |
| Tableau 42 : Données brutes et interprétation statistique des points permettant de déterminer la fidélité et l'exactitude – C2 ..... | 134 |
| Tableau 43 : Données brutes et interprétation statistique de la répétabilité inter-journalière – C1.                                 | 135 |
| Tableau 44 : Données brutes et interprétation statistique de la répétabilité inter-journalière – C2.                                 | 136 |
| Tableau 45 : Données quantitatives de C1 et C2 dans la solution d'encens avant concentration .....                                   | 137 |
| Tableau 46 : Données quantitatives de C1 et C2 dans la solution d'encens concentrée puis re-diluée .....                             | 139 |
| Tableau 47 : Données des gammes d'étalonnage de C1 et C2 réalisées le jour de leur dosage dans le CCAP® .....                        | 141 |
| Tableau 48 : Résultats du dosage de C1 et C2 dans le CCAP®.....  | 141 |
| Tableau 49 : Résultats du dosage de C1 et C2 dans le CCAP®.....  | 142 |

|  |     |
|--|-----|
| Tableau 50 : Résultats du dosage de C1 et C2 dans le CCAP® .....   | 142 |
| Tableau 51 : Résultats du dosage de C1 et C2 dans le CCAP® .....   | 143 |
| Tableau 52 : Résultats du dosage de C1 et C2 dans le CCAP® .....   | 143 |
| Tableau 53 : Résultats du dosage de C1 et C2 dans le CCAP® .....   | 143 |
| Tableau 54 : Résultats du dosage de C1 et C2 dans le CCAP® .....   | 144 |
| Tableau 55 : Résultats du dosage de C1 et C2 dans le CCAP® .....   | 144 |
| Tableau 56 : Teneur de C1 et C2 par flacon de CCAP® .....  | 145 |
| Tableau 57 : Paramètres chromatographiques de B1 et des pics parasites 1 et 3 .....  | 150 |
| Tableau 58 : Paramètres de séparation de B1 et des pics parasites 1 et 3 .....   | 150 |
| Tableau 59 : Paramètres chromatographiques de B1 à différentes longueurs d'onde .....  | 151 |
| Tableau 60 : Données brutes correspondant à B1 dans le CCAP® repris dans le méthanol et dans le témoin .....                           | 154 |
| Tableau 61 : Données brutes et interprétation statistique des résultats obtenus pour les échantillons distillés et non distillés ..... | 155 |
| Tableau 62 : Classification phylogénétique de la myrrhe .....  | 162 |
| Tableau 63 : Première famille chimique isolée de Commiphora mukul .....  | 169 |
| Tableau 64 : Deuxième famille chimique isolée de Commiphora mukul .....  | 172 |
| Tableau 65 : Troisième famille chimique isolée de Commiphora mukul .....   | 173 |
| Tableau 66 : Structure chimique des E- et Z-guggulstérones.....  | 184 |
| Tableau 67 : Caractéristiques physico-chimiques des E- et Z-guggulstérones.....  | 185 |
| Tableau 68 : Méthodes de dosage des deux isomères de guggulstérones.....   | 189 |
| Tableau 69 : Données du gradient du protocole 1.....   | 195 |
| Tableau 70 : Données du gradient du protocole 2.....   | 196 |
| Tableau 71 : Données du gradient optimisé .....  | 197 |
| Tableau 72 : Paramètres de séparation des E- et Z-guggulstérones selon le protocole 1 .....  | 199 |
| Tableau 73 : Paramètres de séparation des E- et Z-guggulstérones selon le protocole 2 .....  | 201 |
| Tableau 74 : Paramètres chromatographiques des E- et Z-guggulstérones selon le protocole optimisé .....                                | 202 |

|  |     |
|--|-----|
| Tableau 75 : Paramètres de séparation du mélange des deux isomères selon le protocole optimisé .....   | 203 |
| Tableau 76 : Données du gradient optimisé .....  | 204 |
| Tableau 77 : Paramètres chromatographiques de la Z-guggulstérone à différentes longueurs d'onde .....  | 205 |
| Tableau 78 : Paramètres chromatographiques du témoin Z-guggulstérone dissous dans deux solvants différents .....                                     | 207 |
| Tableau 79 : Paramètres de séparation des E- et Z-guggulstérone dans la matière première .....   | 209 |
| Tableau 80 : Données quantitatives des E- et Z-guggulstérone dans la résine de myrrhe .....  | 209 |
| Tableau 81 : Données issues des chromatogrammes des E- et Z- guggulstérone dans de l'éthanol 33 % .....  | 211 |
| Tableau 82 : Comparaison des paramètres chromatographiques des deux composés d'intérêt après plusieurs jours de macération dans l'éthanol 33 % ..... | 212 |
| Tableau 83 : Paramètres de rétention de la Z-guggulstérone dans le CCAP® pur .....   | 213 |
| Tableau 84 : Données brutes de la Z-guggulstérone de 2 lots de CCAP® pur .....   | 215 |
| Tableau 85 : Comparaison des données brutes des deux solutions témoins évaporée/non évaporée .....   | 216 |
| Tableau 86 : Données quantitatives de la Z-guggulstérone dans le CCAP® .....   | 218 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 1 : Contre-coups de l'Abbé Perdrigeon .....  | 36  |
| Figure 2 : Schéma du processus général de gestion du risque qualité selon l'ICH Q 9 [10] .....  | 41  |
| Figure 3 : Exsudat de type oléo-gommo-résine s'écoulant le long d'un arbre à encens .....   | 46  |
| Figure 4: Différents rôles des exsudats végétaux [19] .....   | 47  |
| Figure 5 : Canaux résinifères des pins [23]. La résine circule dans les canaux résinifères présents dans le xylème (*), le phloème et le périderme (**) ..... | 48  |
| Figure 6 : Unité d'isoprène à 5 atomes de carbones.....   | 54  |
| Figure 7 : Photographie d'arbres à encens dans leur environnement naturel .....   | 59  |
| Figure 8 : Photographies de <i>Boswellia serrata</i> .....  | 60  |
| Figure 9 : Différentes voies de biosynthèse des composés terpéniques et phénoliques présents dans les exsudats résineux des végétaux [23] .....               | 62  |
| Figure 10 : Schéma simplifié de la synthèse des eicosanoïdes .....  | 68  |
| Figure 11 : Evolution de la dégradation du cartilage en cas d'arthrose, constitué de protéoglycanes (glycosaminoglycanes), de protéines et d'eau .....        | 70  |
| Figure 12 : Comparaison entre une articulation saine (à gauche) et une articulation chez un patient atteint de polyarthrite rhumatoïde (à droite).....        | 71  |
| Figure 13 : Patients atteints de psoriasis avant (à gauche) et après (à droite) application de crème à base d'acides $\beta$ -boswelliques [77].....          | 72  |
| Figure 14 : Chromatogramme de la résine de <i>Boswellia</i> en LC-MS/MS.....  | 83  |
| Figure 15 : Schéma d'un pic asymétrique .....   | 94  |
| Figure 16 : Photographie de l'oléo-gommo-résine de <i>Boswellia serrata</i> .....   | 96  |
| Figure 17 : Photographie du produit fini, le CCAP® .....  | 96  |
| Figure 18 : Photographie de l'évaporateur rotatif .....   | 106 |
| Figure 19 : Chromatogramme de la solution stock de C1 .....   | 108 |
| Figure 20 : Chromatogramme de la solution stock de C2 .....   | 108 |
| Figure 21 : Chromatogramme de la solution fille C1 et C2 .....  | 109 |
| Figure 22 : Blanc méthanol.....   | 110 |
| Figure 23 : Blanc phase mobile.....   | 110 |
| Figure 24 : Chromatogrammes de C1 à différentes longueurs d'onde. De gauche à droite : 250, 252, 254, 256, 258 et 260 nm.....                                 | 111 |



Figure 25 : Chromatogrammes de C1 dissous dans du méthanol (en bleu) ou dans la phase mobile (en noir) ..... 113

Figure 26 : Chromatogrammes de C1 dissous dans du méthanol (en noir) ou dans de l'éthanol 33 % (en bleu) ..... 114

Figure 27 : Chromatogrammes de la solution stock de C2 (en rose), la solution stock de C1 (en bleu), la solution fille de C1 + C2 (en noir) en UHPLC-UV à 250 nm..... 115

Figure 28 : Chromatogramme d'une solution d'encens extraite selon le protocole de la Pharmacopée Européenne ..... 117

Figure 29 : Chromatogrammes de la solution d'encens en mode gradient (en haut) ou isocratique (en bas) ..... 118

Figure 30 : Chromatogramme d'une solution d'encens préparée selon le protocole de l'AMM du CCAP® ..... 119

Figure 31 : Chromatogramme d'une solution d'encens macérée..... 121

Figure 32 : Superposition des chromatogrammes représentant les pics de C1 suite à l'injection des trois filtrats ..... 122

Figure 33 : Chromatogramme du CCAP® pur ..... 123

Figure 34 : Chromatogramme du CCAP® concentré ..... 125

Figure 35 : Photographie d'une fiole contenant le CCAP® avant distillation ..... 126

Figure 36 : Photographie du ballon contenant l'extrait de CCAP® après distillation et avant reprise dans le méthanol..... 126

Figure 37 : Photographie du ballon contenant l'extrait de CCAP® après reprise dans le méthanol... 126

Figure 38 : Gamme d'étalonnage – C1 ..... 128

Figure 39 : Gamme d'étalonnage – C2 ..... 131

Figure 40 : Chromatogramme d'une solution d'encens avant concentration ..... 137

Figure 41 : Chromatogramme d'une solution d'encens concentrée puis re-diluée ..... 138

Figure 42 : Gamme d'étalonnage de C1 réalisée le jour du dosage de C1 et C2 dans le CCAP® ..... 140

Figure 43 : Gamme d'étalonnage de C2 réalisée le jour du dosage de C1 et C2 dans le CCAP® ..... 140

Figure 44 : Superposition des chromatogrammes d'un blanc méthanol/eau (30/70 V : V) (en noir) et d'une solution de témoin B1 dans le même mélange (en bleu) ..... 146

Figure 45 : Chromatogrammes d'un blanc ACN 100% (en noir) et d'un témoin B1 dissous dans de l'ACN 100% (en bleu)..... 147

Figure 46 : Chromatogrammes d'un blanc méthanol 100 % (en noir) et d'un témoin B1 dissous dans du méthanol 100 % (en bleu) ..... 147

Figure 47 : Chromatogrammes correspondant à l'injection de 20 µL de la solution de témoin B1 dans du méthanol 100 % (en bleu) et à 30 µL de la même solution (en rose) ..... 147

Figure 48 : Chromatogrammes d'un blanc éthanol 33 % (V : V) (en noir) et d'une solution de témoin B1 dans le même solvant (en bleu) ..... 147

Figure 49 : Chromatogramme d'un blanc méthanol en mode isocratique ..... 149

Figure 50 : Chromatogramme d'une solution de témoin B1 dissous dans du méthanol..... 149

Figure 51 : Zoom sur les pics parasites 1 et 3..... 149

Figure 52 : Superposition des chromatogrammes d'une solution de B1 aux longueurs d'onde : 208 nm (en rose), 210 nm (en noir) et 212 nm (en bleu)..... 151

Figure 53 : Chromatogramme d'une solution de témoin B1 (en noir) et d'encens à 1 % (en bleu) ... 152

Figure 54 : Chromatogramme d'une solution de témoin B1 (en noir) et d'encens à 1 % dilué au 1/100<sup>ème</sup> (en bleu) ..... 152

Figure 55 : Chromatogrammes du CCAP<sup>®</sup> pur (en noir) et du témoin B1 (en bleu) ..... 153

Figure 56 : Chromatogrammes de deux solutions de CCAP<sup>®</sup> reprises dans du méthanol (en noir et bleu) et d'une solution de témoin B1 (en rose) ..... 154

Figure 57 : Chromatogramme d'une solution témoin contenant B1, C1 et C2..... 156

Figure 58 : Chromatogramme du CCAP<sup>®</sup> pur ..... 156

Figure 59 : Dessin et photographie de *Commiphora myrrha*..... 163

Figure 60 : Photographie de *Commiphora mukul* ..... 164

Figure 61 : Photographie d'oléo-gommo-résine de myrrhe ..... 164

Figure 62 : Photographie d'une incision réalisée sur l'écorce de l'arbre à myrrhe dont le fluide jaune s'écoule..... 165

Figure 63 : Schéma simplifié de la physiologie du métabolisme lipidique. Les éclairs représentent les lieux d'action des guggulstérones ..... 175

Figure 64 : Etapes d'extraction de l'oléo-gommo-résine de *Commiphora mukul* [105 ; 129]..... 186

Figure 65 : Etapes d'extraction de l'oléo-gommo-résine de *Commiphora mukul* [109]..... 187

Figure 66 : Chromatogramme de résine de myrrhe en HPLC-UV détectée à 250 nm avec la colonne Nucleosil ..... 188

Figure 67 : Photographie de l'oléo-gommo-résine de *Commiphora carterii* ..... 192

|  |     |
|--|-----|
| Figure 68 : Photographie du produit fini, le CCAP® .....   | 192 |
| Figure 69 : Photographie de l'UHPLC Ultimate 3000 .....  | 195 |
| Figure 70 : Chromatogramme d'un mélange des E- et Z-guggulstérones selon le protocole 1 .....  | 199 |
| Figure 71 : Chromatogramme d'un mélange des E- et Z-guggulstérones selon le protocole 2 .....  | 200 |
| Figure 72 : Chromatogramme de la E-guggulstérone selon le protocole optimisé .....   | 202 |
| Figure 73 : Chromatogramme de la Z-guggulstérone selon le protocole optimisé .....   | 202 |
| Figure 74 : Chromatogramme de la solution stock de la E-guggulstérone (en rose), de la Z-guggulstérone (en bleu) et du mélange (en noir) .....   | 203 |
| Figure 75 : Chromatogramme d'un blanc méthanol .....   | 203 |
| Figure 76 : Chromatogrammes de la Z-guggulstérone aux différentes longueurs d'onde : 246, 248, 250, 252 et 254 nm (de gauche à droite) .....   | 205 |
| Figure 77 : Chromatogrammes de la Z-guggulstérone dissoute dans du méthanol (en bleu) ou dans de l'éthanol 33 % (en noir) .....  | 206 |
| Figure 78 : Chromatogramme d'une solution de myrrhe à 1 % extraite avec du méthanol .....  | 208 |
| Figure 79 : Zoom du chromatogramme d'une solution de myrrhe à 1 % extraite avec du méthanol .....  | 208 |
| Figure 80 : Chromatogramme d'une macération de myrrhe dans de l'éthanol 33 % (en noir) et des témoins (en bleu) .....  | 211 |
| Figure 81 : Chromatogramme du CCAP® pur .....  | 213 |
| Figure 82 : Zoom du chromatogramme du CCAP® pur .....  | 213 |
| Figure 83 : Chromatogramme du CCAP® pur (en bleu), de la solution stock de la E-guggulstérone (en noir) et du CCAP® pur avec ajout de E-guggulstérone (en rose) .....                  | 214 |
| Figure 84 : Superposition des chromatogrammes de la solution stock à 12,5 µg/mL de la Z-guggulstérone (en bleu) et de la solution évaporée et reprise dans le méthanol (en noir) ..... | 216 |
| Figure 85 : Superposition des chromatogrammes du témoin (en rose) et de deux échantillons de CCAP® repris dans du méthanol (en noir et en bleu) .....                                  | 217 |

Équation 1 : Facteur de rétention ..... 92

Équation 2 : Sélectivité ..... 93

Équation 3 : Efficacité ..... 93

Équation 4 : Résolution ..... 93

Équation 5 : Facteur de symétrie ..... 94

Équation 6 : Loi de Beer-Lambert..... 95

Équation 7 : Pente de la droite de régression ..... 127

Équation 8 : Ordonnée à l'origine de la droite de régression ..... 128

Équation 9 : Détermination  $t_{obs}(a)$  ..... 129

Équation 10 : Détermination  $s_a$  ..... 129

Équation 11 : Détermination  $\sigma_x$  ..... 129

Équation 12 : Détermination  $\sigma_y$  ..... 129

Équation 13 : Détermination  $t_{obs}(b)$  ..... 129

Équation 14 : Détermination  $s_b$  ..... 129

Équation 15 : Détermination  $\sigma_x$  ..... 129

Équation 16 : Détermination  $\sigma_y$  ..... 129



## TABLE DES ABREVIATIONS

|                  |   |
|------------------|---|
| AINS             | Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien                                     |
| AMM              | Autorisation de Mise sur le Marché                                    |
| ANSM             | Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et des produits de santé |
| As               | Facteur de symétrie   |
| BDF              | Bruit De Fond   |
| BPF              | Bonnes Pratiques de Fabrication                                       |
| C.               | Commiphora  |
| CCAP®            | Contre-Coups de l'Abbé Perdrigeon®                                    |
| CE               | Commission Européenne   |
| CIP              | Code Identifiant de Présentation                                      |
| CSP              | Code de la Santé Publique   |
| CV%              | Coefficient de variation exprimé en pourcentage                       |
| DL <sub>50</sub> | Dose Létale 50  |
| EMA              | European Medicines Agency   |
| FDA              | Food and Drug Administration  |
| FXR              | Farnesoid X Receptor  |
| GC-FID           | Gas Chromatography-Flame Ionization Detector                          |
| GC-MS            | Gas Chromatography-Mass Spectrometry                                  |

## TABLE DES ABREVIATIONS

|          |   |
|----------|---|
| HPLC-UV  | High Performance Liquid Chromatography –UltraViolet   |
| ICH      | The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use |
| LC-MS/MS | Liquid chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry   |
| LOD      | Limit of Detection  |
| LOQ      | Limit of Quantification   |
| MET      | Microscope Electronique à Transmission  |
| MEB      | Miscroscope Electronique à Balayage   |
| REACH    | Registration, Evaluation and Autorisation of Chemicals  |
| TFA      | Acide trifluoroacétique   |
| UHPLC-UV | Ultra High Performance Liquid Chromatography-UltraViolet  |

# Introduction



Au cours de l'histoire et des civilisations, les plantes et les produits naturels ont toujours tenu une place importante pour soigner les Hommes. Les matières résineuses et parmi celles-ci les résines d'encens et de myrrhe sont employées en médecine traditionnelle depuis des millénaires en occident comme dans les cultures chinoises et indiennes. Leurs substances chimiques, retrouvées à la fois sous forme d'huile essentielle, de gomme et de résine (oléo-gommo-résine), sont utilisées dans de nombreux produits notamment en cosmétique et en parfumerie en raison de leur rôle aromatisant. Elles ont également une place notable dans le domaine pharmaceutique, surtout pour la préparation de médicaments ou encore de pommades. En usage traditionnel, ces oléo-gommo-résines revendiquent des propriétés antiseptiques, antiarthritiques et anti-inflammatoires. Cependant, des lacunes existent encore dans notre connaissance de leurs usages traditionnels et dans les bases de données scientifiques disponibles à ce sujet, qui ne sont pas très documentées. C'est pourquoi, au cours des 20 dernières années, l'encens et la myrrhe ont éveillé l'intérêt des scientifiques qui ont tenté de mieux définir leurs effets thérapeutiques et d'identifier les constituants qui en sont responsables.

Le Contre-Coups de l'Abbé Perdrigeon (CCAP®) est un très bon exemple d'utilisation des résines d'encens et de myrrhe puisqu'elles y sont employées en tant qu'excipients à vocation aromatisante. Ce médicament, commercialisé par le Laboratoire Pionneau, établissement pharmaceutique français, est régi selon un contexte réglementaire spécifique permettant de garantir sa qualité lorsqu'il est mis sur le marché mais surtout sa sécurité auprès des patients. Chacune des étapes de fabrication d'un médicament est mise en place et définie par un système de gestion de la qualité. Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) correspondent au référentiel qualité opposable pour les autorités réglementaires. La dernière version des BPF, revue en 2015, a été publiée au Bulletin officiel n° 2015/12 bis du Ministère des Affaires Sociales et de la Santé [1]. D'autres textes s'ajoutent progressivement comme les Lignes Directrices du 19 mars 2015 relatives « à l'évaluation formalisée du risque visant à déterminer les bonnes pratiques de fabrication appropriées pour les excipients utilisés dans les médicaments à usage humain » [2]. Ces Lignes Directrices concernant la gestion du risque appliquée aux excipients ont été ajoutées suite à la décision du Directeur Général de l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et des produits de santé (ANSM) le 30 décembre 2016. C'est au cœur de cette actualité juridique que je suis arrivée au Laboratoire Pionneau.

Face à cette nouveauté s'inscrit ma problématique. Le Laboratoire Pionneau m'a proposé de travailler sur l'application de ces Lignes Directrices sur les excipients utilisés dans le CCAP®, médicament traditionnel à base de plantes. Mes recherches de thèse se sont donc focalisées sur l'étude des excipients de ce médicament qui sont des oléo-gommo-résines d'encens (*Boswellia serrata* et *Boswellia carterii*) et de myrrhe (*Commiphora myrrha* et *Commiphora mukul*).

**Ce travail de thèse porte principalement sur l'étude des compositions chimiques des oléo-gommo-résines et plus particulièrement des fractions résines de deux plantes avec plusieurs objectifs :**

- ♣ Un objectif principal : accroître nos connaissances des constitutions chimiques des oléo-gommo-résines et des fractions résines des deux espèces dans le but de caractériser les composés majoritaires et/ou bioactifs de ces deux plantes. Pour ce faire, il convient de mettre en œuvre une stratégie analytique au laboratoire, puis de l'optimiser le cas échéant pour surmonter les difficultés d'identification et de dosage.
- ♣ Un objectif réglementaire à travers l'application des nouvelles Lignes Directrices concernant la gestion du risque des excipients du médicament commercialisé par le Laboratoire Pionneau, le CCAP®. D'un point de vue méthodologique, la gestion du risque s'appuie sur une approche scientifique et pratique qui consiste en partie à « réunir les informations contextuelles et/ou les données sur le danger potentiel, le dommage ou l'impact potentiel sur la santé humaine et animale » [1].

Cette thèse comporte 4 chapitres présentant l'état bibliographique de la question, les résultats analytiques et les discussions. Dans le chapitre 1, la première partie est un descriptif du Laboratoire Pionneau, entreprise pharmaceutique dans lequel s'est déroulée ma thèse. J'y décris également le statut juridique du médicament commercialisé ainsi que sa formulation. La deuxième partie propose les référentiels opposables pour une entreprise pharmaceutique suivie d'un exposé sur la notion de gestion du risque. C'est dans cette partie introductive que mes objectifs de thèse sont développés de façon plus précise.

Le chapitre 2 est consacré à des généralités sur les oléo-gommo-résines de plantes. J'y expose une revue bibliographique de la composition chimique des fractions huile essentielle et gomme d'encens et de myrrhe. J'ai inclus une synthèse des études bibliographiques concernant la toxicologie des composés majoritaires de ces deux fractions. Dans cette partie, je réponds partiellement aux Lignes Directrices. A ce stade de l'étude, en accord avec le Laboratoire Pionneau, nous excluons les deux fractions, huile essentielle et gomme, car nous avançons l'hypothèse que ces deux dernières, de par notamment le procédé de fabrication et leurs propriétés physico-chimiques, ne seraient retrouvées qu'à l'état de trace dans le CCAP® et ne seraient pas toxiques.

Dans le chapitre 3, je me focalise sur le premier excipient du CCAP® : l'encens. Ma méthode consiste à déterminer à partir d'un dossier bibliographique (chapitre 3.1) des techniques analytiques (chapitre 3.2). Dans le dossier bibliographique, je propose une description botanique de l'encens avec une liste de ses propriétés puis je me concentre sur la fraction résine, très riche en composés. Je présente dans des sous parties dédiées la composition chimique de la résine d'encens. Les activités pharmacologiques et toxicologiques sont abordées. Le dossier analytique décrit la partie expérimentale des composés majoritaires sélectionnés grâce à l'étude précédente. Je détaille les

analyses menant à l'identification et la quantification des composés majoritaires détectés dans la plante. J'examine également dans cette partie le matériel et les diverses méthodes de préparation de la matière première d'encens ainsi que du produit fini (CCAP®), les méthodes d'identification et de quantification des composés d'intérêts ainsi que des données statistiques. Dans un dernier point, les résultats sont détaillés.

Le chapitre 4 aborde le deuxième excipient du CCAP®, la myrrhe selon une méthodologie similaire au chapitre 3.

En fin de thèse, une partie est dédiée à une conclusion générale mettant en évidence les points les plus importants permettant de répondre aux Lignes Directrices. En annexe, sont donnés plusieurs éléments intéressants mais qui, à mon sens, auraient rendu la lecture moins aisée s'ils avaient été insérés dans le manuscrit.

# **Chapitre 1 : Les excipients du CCAP® dans le contexte réglementaire**

## I. Laboratoire Pionneau et le CCAP®

Situé à Vayres (33), le Laboratoire Pionneau est actuellement le plus ancien laboratoire pharmaceutique français indépendant encore en activité. Il démarre son exploitation en 1879 autour du CCAP® qui a été créé en 1859. D'autres produits de santé sont actuellement commercialisés tels que des compléments alimentaires, des dermo-cosmétiques et des huiles essentielles. A ce jour, le Laboratoire Pionneau est un établissement pharmaceutique possédant l'autorisation d'ouverture (n° MM 14/497) délivrée par l'ANSM (articles L5124-3 et R5124-6 du CSP) et certifié par les BPF européennes et les Bonnes Pratiques de Distribution en Gros (BPDG). Cet établissement possède les statuts de fabricant de produits non stériles ainsi que d'exploitant et de distributeur en gros (articles R5124-2 et R5124-3 du CSP). L'établissement pharmaceutique Pionneau répond donc aux référentiels en vigueur : Code de la Santé Publique (CSP), Pharmacopée Européenne, BPF, BPDG et les Bonnes Pratiques de Pharmacovigilance.

Le CCAP® est l'un des plus vieux médicaments français (Figure 1) et prend son origine dans une variante populaire du baume du commandeur de Pernes. Médicament d'usage traditionnel et à base de plantes (autorisé n°CIP : 3400930252659), il appartient à la catégorie des antiseptiques (classe ATC D08AX), répondant donc aux normes antiseptiques. Il se présente sous la forme d'une solution pour application cutanée qui s'applique sur la lésion à l'aide d'une compresse 2 à 4 fois par jour pendant 5 jours. Non soumis à prescription obligatoire, ses deux indications thérapeutiques sont le traitement d'appoint des ecchymoses et des contusions ainsi que l'antisepsie des plaies superficielles et peu étendues.



Figure 1 : Contre-coups de l'Abbé Perdrigeon

Trois genres de plantes soit cinq espèces entrent dans la formulation de ce médicament : l'aloès du cap (*Aloe ferox*), l'encens (*Boswellia serrata* et *Boswellia carterii*) et la myrrhe (*Commiphora myrrha* et *Commiphora mukul*). L'aloès du cap en est la substance active (1,10 %), l'encens et la myrrhe en sont les excipients de fonction aromatisante (1 % chacun). Les autres excipients sont l'eau purifiée et l'éthanol à 96 %. Un excipient se définit comme « tout composant d'un médicament, autre qu'une substance active et les matériaux d'emballage » [2]. La substance active est le « Composant d'une spécialité pharmaceutique reconnu comme possédant des propriétés thérapeutiques » [3].

## II. Référentiels opposables

La conception et le développement des médicaments sont régis actuellement par des exigences strictes qui doivent être appliquées tout au long du cycle de vie du médicament. Les entreprises pharmaceutiques doivent donc mettre en place un système qualité performant et précis, permettant de garantir la maîtrise de chacune de leurs activités. L'industrie pharmaceutique se situe à un haut niveau de gestion de la qualité dans le développement, la fabrication et le contrôle des produits. A partir de référentiels connus, chaque entreprise se doit de définir les moyens et les méthodes spécifiques pour atteindre le résultat escompté et maîtriser les risques liés à la fabrication, la distribution et l'utilisation du médicament, et ce dans le but de garantir la sécurité du patient.

### A. Le code de la santé publique

Le CSP est constitué d'articles législatifs et réglementaires qui fixent le cadre global dans lequel évolue tout établissement qui exerce une activité pharmaceutique. Un système d'autorisation de mise sur le marché garantit que les médicaments commercialisés sont évalués par une autorité compétente, assurant leur conformité avec les normes en vigueur en matière de sécurité, d'efficacité et de qualité (L.5121-8 du CSP). Comme tout médicament autorisé, le dossier d'AMM du CCAP® rassemble des données expérimentales et analytiques prouvant la sécurité, la qualité, l'efficacité ainsi que l'ensemble des spécifications concernant la fabrication de ce médicament (arrêté du 23 avril 2004 du CSP).

### B. Les Pharmacopées

Historiquement, une Pharmacopée est un recueil de plantes, animaux et minéraux destinés à l'usage thérapeutique et utilisés dans une zone géographique. De nos jours, le terme désigne généralement un recueil à caractère officiel et réglementaire des matières premières autorisées dans un pays ou dans un groupe de pays pour la fabrication des médicaments, destinées aux professionnels de santé et aux laboratoires. Il existe une Pharmacopée Internationale, publiée par l'Organisation Mondiale de la Santé, qui est un recueil de normes portant sur l'activité et la pureté des produits pharmaceutiques qui entrent dans le commerce international [4]. Il existe également des Pharmacopées Nationales. Des accords ont été passés entre les Etats-Unis, le Japon et l'Europe afin

d'harmoniser la présentation de ces Pharmacopées sous forme de monographies [5]. **Ainsi, les normes de ce référentiel scientifique qui permet d'assurer une qualité optimale font autorité pour toute substance ou monographie figurant dans la Pharmacopée.**

Pour la Pharmacopée Européenne, les normes s'appliquent réglementairement à l'ensemble des états membres signataires de la Convention pour l'élaboration de la Pharmacopée Européenne (36 états). Elle est complétée, pour certains états, par des Pharmacopées Nationales. La Pharmacopée Européenne actuellement en vigueur est la 9.0<sup>ème</sup> édition [5]. Elle est constituée de différentes monographies qui correspondent à un ensemble de spécifications définissant les critères de pureté des matières premières ou des préparations entrant dans la fabrication des médicaments (à usage humain et vétérinaire) et les méthodes d'analyse pour en assurer leur contrôle. **Afin d'étudier les excipients du CCAP®, les monographies de l'encens et la myrrhe ont été consultées. Pour l'encens, la méthode analytique HPLC-UV telle que décrite dans la Pharmacopée Européenne est le point de départ de mon travail.**

Les monographies de la Pharmacopée Française viennent compléter les textes de la Pharmacopée Européenne. Elle est régulièrement mise à jour sous formes d'additifs publiés par le directeur de l'ANSM. La Pharmacopée Française actuellement en vigueur est la 11<sup>ème</sup> édition mais aucune des deux monographies de l'encens et la myrrhe n'y sont retrouvées.

### **C. Les Good Manufacturing Practices : Les Bonnes Pratiques de Fabrication**

Les Good Manufacturing Practices sont établies au niveau européen par la Directive Européenne 91/356/EEC [6], abrogée par les Directives 2003/94/EC et 91/412/EEC. Elles sont rédigées en conformité avec la Directive Européenne 2001/83/CE qui établit le code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. La directive 2003/94/EC [7] établit les principes et Lignes Directrices des BPF concernant les médicaments à usage humain et les médicaments expérimentaux à usage humain. Des Lignes Directrices y sont donc publiées et destinées à servir de référence lors de l'examen des demandes d'autorisation de fabrication et lors de l'inspection des fabricants de médicaments. Les BPF représentent un gage de qualité appliqué à la fabrication de médicaments à usage humain ou vétérinaire. Elles sont définies comme « un des éléments de l'assurance de la qualité, garantissant que les produits sont fabriqués et contrôlés de façon uniforme et selon des normes de qualité adaptées à leur utilisation et spécifiées dans l'autorisation de mise sur le marché » [8]. Elles visent à garantir la sécurité du patient auquel le médicament sera administré.

Les Directives Européennes qui s'appliquent en France doivent être préalablement transposées en droit français dans le CSP. Ce référentiel est légalement opposable par les autorités administratives françaises. Il définit des réglementations à respecter pour veiller à l'assurance de la qualité et à la fabrication des médicaments telle que décrite dans l'AMM.

Les BPF se composent de trois parties. La partie I concerne l'ensemble des BPF des médicaments à usage humain, tandis que la partie II se rapporte aux substances actives utilisées comme matières premières dans les médicaments. **La partie III traitant des documents relatifs aux Bonnes Pratiques de Fabrication est importante pour mon travail de thèse [1].**

Les BPF sont mises à jour quand de nouvelles annexes sont publiées. Actuellement, la version en vigueur est la N°2015/12 bis, parue au Bulletin officiel en 2016 [1] qui intègre la partie III du guide européen relative aux attentes réglementaires et qui inclut les documents suivants :

- ♣ Gestion du risque qualité (ICH Q9)

La Ligne Directrice ICH Q9 [9] « management du risque qualité » décrit le management du risque et des exemples d'outils possibles pour cette évaluation, qu'elle soit prospective ou rétroactive.

- ♣ Système qualité pharmaceutique (ICH Q10)

Le document ICH Q10 [9] propose un système de management permettant d'orienter et de contrôler une société pharmaceutique en matière de qualité. Il introduit de façon formelle l'amélioration continue, l'engagement de la direction, la maîtrise des modifications, la maîtrise de la connaissance et la gestion de la qualité.

- ♣ Exigences internationales harmonisées pour la certification d'un lot
- ♣ Annexes

Elles comprennent 19 Lignes Directrices particulières apportant des éléments complémentaires dans certains domaines d'activité plus spécifiques.

### III. La notion de risque dans un système qualité

#### A. ICH Q9 : la gestion du risque qualité [10 - 11]

**La Qualité** est « l'aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à un produit, un système ou un processus à satisfaire des exigences » [12]. Elle correspond globalement à l'ensemble des actions mises en place par une entreprise pour atteindre ses objectifs afin de garantir la sécurité du patient.

**Le risque** caractérise un événement indésirable par sa probabilité d'occurrence et par la gravité des dommages encourus. Par exemple, c'est le risque de fournir un médicament non conforme.

**La gestion du risque qualité** est un processus systématique d'évaluation, de maîtrise, de communication et de revue des risques qualité du médicament. Elle peut être appliquée de façon



prospective ou rétrospective. Ce processus participe donc à la démarche d'amélioration continue.

**L'analyse de risque** fournit une approche systématique pour l'évaluation de la gestion du risque qualité en proposant les principes et des exemples d'outils internes à une société qui peuvent être appliqués à tous les aspects de la qualité et tout au long de la vie du produit. Elle recommande qu'une approche de gestion des risques soit mise en place. Cependant, elle laisse le libre choix à l'entreprise sur l'utilisation des outils nécessaires à cette gestion, chacun ayant ses avantages et ses inconvénients et devant être sélectionné selon la problématique concernée. Elle permet une harmonisation internationale partagée de la gestion du risque et une meilleure utilisation des ressources. Globalement son application accroît la confiance réciproque entre industrie et autorités en apportant la preuve d'une meilleure gestion et maîtrise des risques. L'analyse de la gestion du risque permet également d'être en conformité avec la réglementation et d'affirmer, au cours d'une inspection ou d'un audit, que le système est sous contrôle. L'analyse de risque a pour but d'identifier les dangers significatifs potentiels, d'évaluer leur probabilité d'apparition ainsi que leur degré de gravité.

Pour réduire un risque, on peut donc agir à quatre niveaux :

- ♣ en réduisant la sévérité de l'effet provoqué par le danger
- ♣ en réduisant la probabilité d'apparition du danger
- ♣ en évitant le danger et en éliminant sa cause
- ♣ en augmentant les moyens de détection

La méthode de réduction du risque permet :

- ♣ d'avoir une meilleure connaissance du problème
- ♣ de mieux analyser le problème
- ♣ d'avoir la solution la mieux adaptée au problème (réduction du risque)
- ♣ d'améliorer la qualité du produit

**La gestion du risque qualité** se décompose en quatre étapes : son estimation, sa maîtrise, sa communication et sa revue (Figure 2).

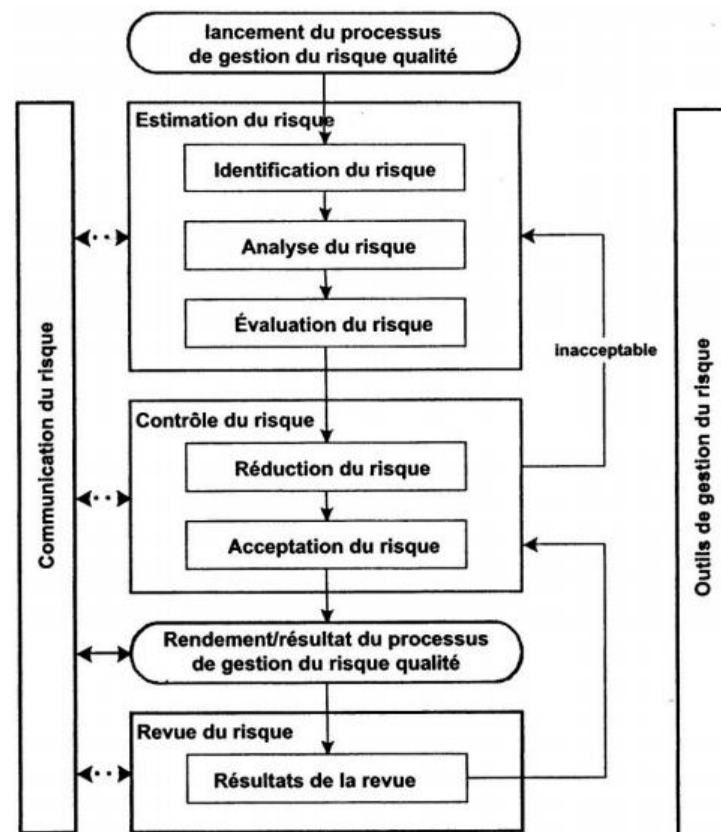


Figure 2 : Schéma du processus général de gestion du risque qualité selon l'ICH Q 9 [10]

La notion de risque dans un système qualité est au cœur des nouvelles Lignes Directrices concernant l'évaluation des excipients dans le CCAP®, ce qui les rend fondamentales pour mon travail.

## B. Les Lignes Directrices du 19 mars 2015

La gestion du risque est justement un des aspects abordés par les nouvelles Lignes Directrices du 19 mars 2015 relatives « à l'évaluation formalisée du risque visant à déterminer les BPF appropriées pour les excipients utilisés dans les médicaments à usage humain » [2]. Fondées conformément aux articles 46 et 47 de la Directive 2001/83/CE (code communautaire relatif aux médicaments à usage humain), ces Lignes Directrices Européennes sont transposées en droit français suite à la décision du 30 décembre 2016 par le Directeur général de l'ANSM, ce qui les intègre à la partie III des BPF. Selon ces Lignes Directrices, le titulaire de l'autorisation de fabrication doit veiller à ce que les excipients utilisés dans les médicaments qu'il fabrique fassent l'objet de « contrôles appropriés reposant sur des processus de gestion et de maîtrise du risque qualité ». Il doit ainsi « vérifier l'authenticité et la qualité des substances actives et des excipients ». Le Laboratoire Pionneau répond déjà à certains points de ces Lignes Directrices, notamment sur le suivi des matières premières (achat, importation et stockage, choix des fournisseurs, analyses), le tout conformément aux BPF.

Dans le chapitre 2 de ces Lignes Directrices, il est stipulé que les principes de gestion du risque de la qualité doivent être utilisés pour évaluer les risques liés à la qualité, la sécurité et la fonction de chaque excipient. En ce qui concerne l'utilisation et la fonction de chaque excipient, le titulaire de l'autorisation de fabrication doit tenir compte des éléments suivants :

- ♣ la forme pharmaceutique et l'utilisation du médicament contenant l'excipient
- ♣ la fonction de l'excipient dans la formule
- ♣ la proportion de l'excipient dans la composition du médicament
- ♣ la consommation journalière de l'excipient par le patient
- ♣ les effets connus ou potentiels sur les caractéristiques essentielles pour la qualité du médicament

Le titulaire de l'autorisation de fabrication doit conserver sur place la documentation relative à l'évaluation/la gestion du risque aux fins de la détermination des BPF appropriées concernant les excipients, pour permettre la vérification par les inspecteurs. Ainsi, ma thèse pourra être incluse dans ce cadre et pourra répondre aux parties qui ne sont pas encore maîtrisées par le Laboratoire Pionneau et sera donc un point positif pour cette gestion du risque des excipients.

#### **IV. Objectifs du travail de thèse**

Afin de répondre aux évolutions des BPF liées aux Lignes Directrices du 19 mars 2015, le Laboratoire Pionneau m'a proposé de travailler sur l'application de la réglementation concernant la gestion des risques pour les excipients utilisés dans les médicaments à usage humain, dans une démarche de minimisation des risques liés à leurs utilisations. Mon travail s'est donc focalisé sur l'étude des excipients du CCAP® qui sont des oléo-gommo-résines d'encens et de myrrhe. Il a ainsi été question de déterminer et de préciser les risques concernant la qualité et la sécurité de l'excipient depuis sa source jusqu'au produit fini. Des questions peuvent être posées concernant les matières premières du CCAP®. Quelle est la proportion des excipients dans la composition du médicament ainsi que la consommation journalière des excipients par le patient ? Quels sont les composés majoritaires des résines d'encens et de myrrhe ? Ces composés ont-ils des effets connus ou potentiellement toxiques ?

Pour démarrer ma réflexion, je me suis appuyée sur les documents disponibles concernant les matières premières, l'encens et la myrrhe : la bibliographie déjà existante, leurs fiches de données de sécurité respectives ainsi que la Pharmacopée Européenne. A ce jour, pour les deux plantes, aucune mention de risque potentiel ne semble apparaître dans ces documents. De plus, le règlement REACH qui donne des mesures restrictives, c'est-à-dire des précautions à prendre pour les composés chimiques, ne mentionne aucune restriction ou précaution particulière pour les composés chimiques de l'encens et la myrrhe [13]. Ainsi, il y a peu d'informations et pas de réglementation toxicologique

sur les molécules constitutives de ces deux plantes. La monographie de l'encens de la Pharmacopée Européenne met en évidence la présence d'acides  $\beta$ -boswelliques sous deux formes cétoniques en utilisant comme méthode de référence la chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un détecteur UV [14].

Mes objectifs de thèse se sont articulés de la façon suivante. Dans un premier temps, je me suis engagée à réaliser une revue approfondie de la littérature des oléo-gommo-résines d'encens et de myrrhe pour faire un état des lieux et une actualisation de la bibliographie déjà existante. Ce travail a été fait dans le but d'identifier les molécules majoritaires et/ou bioactives de chaque espèce de plante ainsi que leur éventuelle toxicité. Dans un deuxième temps, pour appuyer et consolider cette étude bibliographique, j'ai entrepris un travail analytique destiné à caractériser et quantifier les molécules majoritaires et/ou bioactives dans la matière première et le produit fini. La technique de séparation la plus appréciée en analyse phytochimique est l'HPLC. C'est également une technique de référence opposable par les autorités compétentes pour l'identification des composés de la matière première, l'encens. Le Laboratoire Pionneau étant équipé d'une chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC) couplée à un détecteur UV, j'ai pu mettre au point une méthode d'identification et de quantification des composés d'intérêt de la résine d'encens et de myrrhe dans le CCAP®.



## **Chapitre 2 : Les oléo-gommo-résines de plantes**

## I. Généralités

Afin de mieux comprendre le terme d'oléo-gommo-résine, ce rapport débute par un chapitre introductif permettant d'aborder une définition générale et chimique des oléo-gommo-résines de plantes. Mon étude est axée sur les lieux de synthèse et les rôles de ces exsudats.

### A. Définition de l'appellation oléo-gommo-résine

Les exsudats de plantes sont des substances végétales d'origine et de nature diverses, correspondant aux substances sécrétées par l'arbre qui s'écoulent le long de l'écorce (Figure 3). Nous en connaissons plusieurs types à ce jour dont le latex, les gommés et les mucilages [15]. **Ce travail bibliographique concerne les exsudats gommo-résineux obtenus sous une forme de mélange de gomme-résine.** Ces derniers peuvent être mélangés à des essences et dans ce cas, ils prennent la dénomination d'oléo-gommo-résine. Ce nom indique qu'il y a différents groupes de molécules susceptibles d'être séparés en trois fractions [16] : les huiles essentielles (fraction oléo dans des proportions de 5 à 10 %), les polysaccharides (fraction gommo dans des proportions de 30 à 65 %) et les polyterpènes (fraction résine dans des proportions de 30 à 60 %). Dans ce groupe de plantes à exsudats, nous retrouvons l'encens, provenant des arbres du genre *Boswellia* et la myrrhe, provenant des arbres du genre *Commiphora*.



Figure 3 : Exsudat de type oléo-gommo-résine s'écoulant le long d'un arbre à encens

Dans la littérature, les termes résine et oléo-gommo-résine sont souvent confondus. De là, vient la nécessité de caractériser ces deux entités. Jusqu'à l'arrivée des techniques de chromatographie et de spectrométrie, le terme résine était employé à défaut pour définir une oléo-gommo-résine, alors qu'aujourd'hui le terme résine est utilisé pour désigner la sous fraction résineuse de l'oléo-gommo-résine.

## B. Rôles des oléo-gommo-résines végétales et organes sécréteurs

Les oléo-gommo-résines ont une importance capitale dans la vie des végétaux. Nous distinguons deux sortes de sécrétions de résine par la plante :

- ♣ Dans des conditions physiologiques, l'exsudat est sécrété et accumulé en petite quantité dans des organes spéciaux [17] pour protéger la plante de la dessiccation, des radiations UV et des hautes températures, et ce principalement au niveau des jeunes feuilles et tiges [18].
- ♣ L'exsudation est également un mécanisme naturel dont se servent les plantes pour cicatriser leurs blessures [19]. Certains auteurs considèrent que l'exsudat confère une protection vis-à-vis de l'invasion microbienne [20]. Par exemple, les protéines trouvées dans le latex de *Calotropis procera* (pommier de Sodome) ont permis de diminuer le développement de *Callosobruchus maculatus* (coléoptère) [21].

Comme le montre la Figure 4, l'oléo-gommo-résine exsudée par les arbres sert à combler d'éventuelles fissures dans le bois (a) ou entre l'arbre et l'écorce (b). Elle peut créer aussi des poches à l'intérieur du tronc (c) ou de l'écorce (d). Elle sert de pansement pour le bois (e) et a la particularité de s'épancher sur le tronc (f) ou de s'étaler en couche autour du tronc (g). L'oléo-gommo-résine qui goutte forme des « glaçons » (h), des « renflements » (i) ou encore des « stalactites » (j) [19].



Figure 4: Différents rôles des exsudats végétaux [19]



Les oléo-gommo-résines sont sécrétées selon un mécanisme connu à ce jour. En effet, les plantes vasculaires sont constituées de tissus sécréteurs qui peuvent prendre la forme de cellules épidermiques, de poils sécréteurs, de canaux sécréteurs... [22]. Dans la majorité des cas, les substances résineuses se forment et s'amassent dans des canaux sécréteurs [17]. Par exemple, le pin sécrète et conduit ses exsudats résineux par des canaux résinifères (Figure 5). Dans le cas de la myrrhe, l'oléo-gommo-résine est élaborée au niveau des canaux résinifères répartis dans tout le parenchyme cortical de l'écorce des branches. Il faut bien différencier les tissus sécréteurs et les tissus conducteurs qui assurent le transport de la sève brute et de la sève élaborée, ce qui permet d'apporter des substances nutritives à la plante. Les sèves et les exsudats n'empruntent donc pas les mêmes tissus.

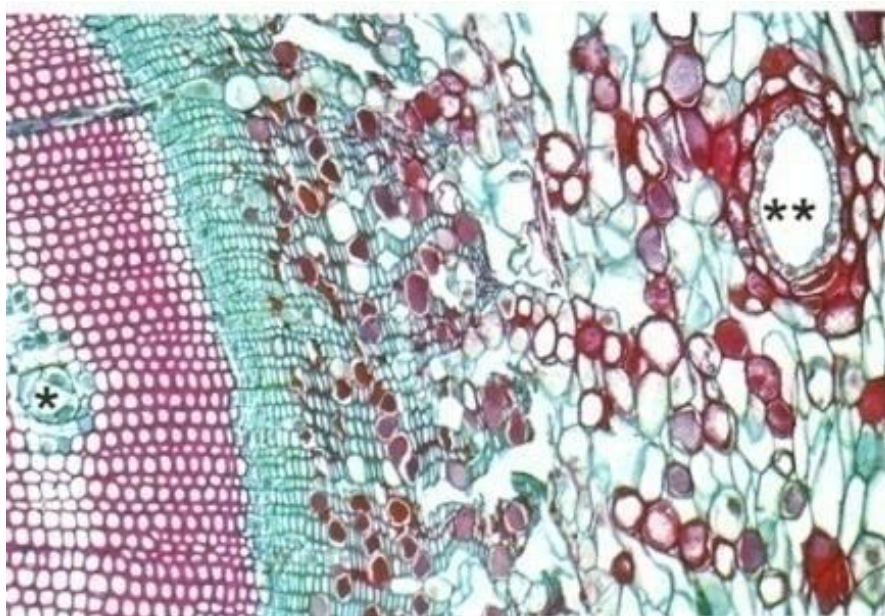


Figure 5 : Canaux résinifères des pins [23]. La résine circule dans les canaux résinifères présents dans le xylème (\*), le phloème et le périoderme (\*\*)

Cette première approche nous montre que les exsudats produits par les plantes sont des substances naturelles complexes ayant un rôle physiologique et un rôle de défense. Les plantes possèdent des structures anatomiques très spécialisées pour la production, le stockage et la sécrétion des résines. La microscopie électronique a mis en évidence que les substances résineuses d'encens et de myrrhe sont sécrétées notamment par des canaux résinifères.

## II. Cas de l'encens et la myrrhe : composition chimique et toxicité

D'un point de vue chimique, une oléo-gommo-résine est constituée d'un mélange de substances liposolubles correspondant aux parties résine (substances non volatiles) et huile essentielle (composés volatils) ainsi que des substances hydrophiles correspondant à la gomme [18]. L'encens et la myrrhe rentrent dans cette définition, néanmoins il existe des variations dans la composition chimique des différentes fractions.

Afin de répondre aux Lignes Directrices, les trois fractions qui composent ces concrétions doivent être étudiées. Chacune d'entre-elles comporte un grand nombre de composés chimiques qui sont détaillés dans ce paragraphe. L'intérêt principal de cette partie est de savoir si certaines molécules apportent un risque dans l'utilisation des excipients du CCAP®.

### A. La partie oléo : huiles essentielles

Les oléo-gommo-résines d'encens et de myrrhe sont riches en huiles essentielles, présentes dans des proportions de 5 à 10 %. Par définition, l'huile essentielle est un produit obtenu à partir d'une matière première végétale soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques, soit par distillation sèche » [24].

Des analyses chromatographiques ont montré que les huiles essentielles d'encens et de myrrhe possèdent des compositions et des proportions variables en fonction de la source botanique (la variété de l'arbre) et la localisation géographique (pays où pousse la plante) dont elles sont issues. Le détail précis de leur composition chimique et de leur quantité est donc difficile à fournir car il en existe une très grande variabilité en fonction du climat, du moment de la récolte, de la variété de l'espèce de l'arbre et de la zone géographique. En effet, la discordance des études met en évidence cette fluctuation dans l'identification et la quantification des composés issus des huiles essentielles, ce qui rend difficile leur analyse exhaustive. Néanmoins, j'ai réalisé une synthèse dans laquelle apparaissent seulement les composés majoritaires.

**En comparant trois espèces de *Boswellia* (*carterii*, *serrata* et *sacra*), nous pouvons avancer que les monoterpènes, famille chimique majoritaire dans la composition de l'huile essentielle, sont représentés principalement par le limonène et le E- $\beta$ -ocimène [25 ; 26], et en plus faible quantité par les pinènes, l' $\alpha$ -thujène et le myrcène. Les sesquiterpènes sont la famille la moins présente, constituée par le E-caryophyllène et l' $\alpha$ -copaène (Tableau 1).**

Tableau 1 : Molécules majoritaires retrouvées dans l'huile essentielle d'encens

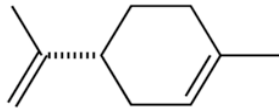
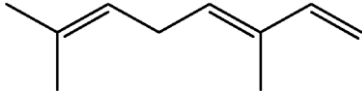
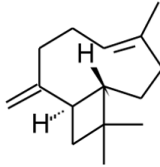
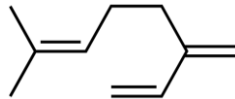
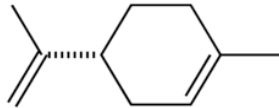
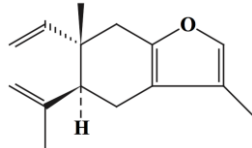
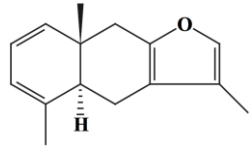
| Nom des molécules | Famille chimique | Structure chimique   |
|-------------------|------------------|--|
| Limonène          | Monoterpène      |   |
| E-β-ocimène       | Monoterpène      |   |
| E-caryophyllène   | Sesquiterpène    |  |

Tableau 2 : Molécules principales retrouvées dans l'huile essentielle de myrrhe

| Nom des molécules       | Famille chimique | Structure chimique  |
|-------------------------|------------------|---|
| Myrcène                 | Monoterpène      |  |
| Limonène                | Monoterpène      |  |
| Curzérène               | Sesquiterpène    |  |
| Furanoeudesma-1,3-diène | Sesquiterpène    |  |

En comparant deux espèces de *Commiphora* (*mukul* et *myrrha*), nous observons que l'huile essentielle est composée également de monoterpènes et sesquiterpènes [27]. En ce qui concerne les sesquiterpènes, le furanoeudesma-1,3-diène, le curzérène et le lindestrène sont les composés majoritaires de l'huile essentielle de myrrhe. Le myrcène et le limonène sont des représentants des monoterpènes, famille présente en quantité moindre par rapport aux sesquiterpènes (Tableau 2).

En l'état actuel des connaissances, il semblerait que ces huiles essentielles ne soient pas retrouvées dans le produit fini ou uniquement à l'état de trace. En effet, la technique de fabrication du CCAP® est bien différente des techniques optimisées pour l'extraction des huiles essentielles qui présentent déjà un faible rendement. Lors de mon travail de thèse, le Laboratoire Pionneau n'a pas souhaité développer cette partie car cela n'aurait probablement pas répondu à l'objectif de l'étude. Néanmoins, j'ai quand même réalisé une synthèse des études bibliographiques concernant la toxicologie des principales huiles essentielles retrouvées dans les deux matières premières, montrant ainsi que le risque encouru est très faible.

Pour répondre à cette évaluation de la toxicité des huiles essentielles d'encens et de myrrhe, je me suis appuyée sur le comité scientifique des produits de consommation qui contrôle leur emploi. Parmi les 26 substances classées comme allergènes, 17 peuvent être retrouvées dans les huiles essentielles [28] et seulement trois composés nous concernent : les pinènes, le limonène et le  $\beta$ -caryophyllène. Ces deux derniers ont des formes oxygénées qui sont plus allergènes.

Etant donné que le CCAP® est utilisé en voie externe, mes études se sont portées sur l'évaluation de la sécurité lors d'une administration d'huile essentielle par voie topique. **Ma première recherche s'est axée sur le limonène**, composé majoritaire de l'huile essentielle de l'encens et composé minoritaire pour la myrrhe.

Miller et son équipe (2012) ont évalué la sécurité d'une application topique d'huile de massage contenant du limonène à la concentration de 0,10 g/mL [29]. Dans cette étude ont été incluses 44 femmes qui ont appliqué l'huile de massage tous les jours, pendant 5 minutes (min). Après 4 semaines, la plupart des effets indésirables constatés se limitent à des événements liés à la dermatologie sur le site d'application. Cinq femmes ont signalé une légère démangeaison ou picotement au niveau du site d'application mais ont continué l'étude sans réduction de dose. Quatre femmes ont présenté une éruption qualifiée de légère à modérée au niveau du site d'application lors d'une exposition au soleil. Toutes les femmes ont terminé l'étude sans modification de dose. L'analyse de l'huile par GC-MS a montré la présence d'un limonène oxygéné (oxyde de limonène) qui serait associé à une irritation de la peau [30]. Pour corriger cela, un nouveau lot d'huile de massage a été préparé et une nouvelle analyse a révélé l'absence de la forme oxygénée. Dans les mêmes conditions, les nouvelles participantes ont été massées avec cette huile et aucune d'entre elles n'a déclaré d'éruption cutanée. Les résultats montrent que l'huile a été bien tolérée. D'une manière

générale, la toxicité des molécules aromatiques est liée à la présence de certains sites fonctionnels oxygénés comme les cétones ou encore les aldéhydes, ce qui appuie l'étude de Miller. De plus, les composés polyinsaturés possédant des doubles liaisons C=C sont habituellement plus toxiques que les autres [31]. Ainsi, le limonène n'est pas allergisant par lui-même mais par sa forme oxydée qui se lie très facilement aux protéines cutanées par voie radicalaire et peut dès lors exercer son pouvoir allergisant.

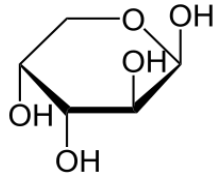
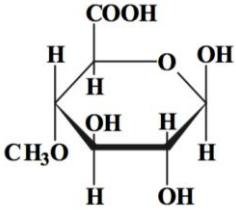
A ce jour les Doses Létales 50 (DL<sub>50</sub>) des huiles essentielles d'encens et de myrrhe, doses qui provoquent la mort de la moitié des animaux inclus lors de l'étude, n'ont pas été déterminées mais une étude comparative est réalisée avec d'autres huiles essentielles. Les DL<sub>50</sub> orales obtenues à partir des huiles essentielles d'anis, eucalyptus, girofle, camomille, citronnelle, lavande, basilic, estragon, ou encore origan sont supérieures à 1 g/kg [32 ; 33], ce qui leur confère une faible toxicité par voie orale. Par analogie, nous émettons l'hypothèse que les DL<sub>50</sub> de l'encens et de la myrrhe seraient du même ordre. Une autre grandeur est utilisée en toxicologie : la Non Observed Adverse Effect Level (NOAEL), qui est la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet nocif n'est rencontré. Le limonène possède par exemple une NOAEL de 300 mg/kg, ce qui signifie qu'en dessous de ce seuil, le risque d'observer un effet nocif est nul [34 ; 35]. Toutes ces informations nous amènent à penser que le limonène ne serait pas toxique par voie topique.

**Ma deuxième recherche s'est focalisée sur les composés majoritaires de la famille des sesquiterpènes**, présents dans l'huile essentielle de myrrhe. Sa sécurité lors d'une utilisation par voie topique a été évaluée chez la souris. Quelques gouttes d'huile essentielle extraite de l'oléo-gommo-résine de *Commiphora myrrha* ont été introduites dans l'oreille des souris [31]. L'étude a montré que le curzérène, le furanodiène-6-one et le furanoedesma-1,3-diène possèdent des propriétés irritantes.

## **B. La partie gomme : polysaccharides**

La fraction gomme représente entre 30 % et 60 % de l'extrait total de l'oléo-gommo-résine d'encens et de myrrhe. La composition chimique des gommes extraites de *Boswellia* et *Commiphora* est relativement similaire [36 - 38]. Elle comprend des monosaccharides comme le galactose, l'arabinose et l'acide 4-O-méthyl-D-glucuronique, qui s'associent pour former des polysaccharides, se liant eux-mêmes avec des protéines formant ainsi des protéoglycanes (Tableau 3). Ces deux gommes sont uniquement différenciées par la proportion et l'agencement des sucres entre eux.

Tableau 3 : Structure chimique de deux constituants monosaccharidiques des gommés

| Nom des molécules               | Structure chimique   |
|---------------------------------|--|
| Arabinose                       |  |
| Acide 4-O-méthyl-D-glucuronique |  |

En l'état actuel des connaissances, ces gommés ne semblent pas être présentes dans le produit fini ou seulement à l'état de trace. En effet, la technique d'extraction des gommés, fraction présentant un caractère hydrophile, nécessite un solvant polaire tel que l'eau. Deux paramètres peuvent influencer de façon favorable la solubilité des gommés : l'élévation de la température et l'agitation des particules qui a pour but de maintenir la matière végétale en suspension dans le liquide. Ces paramètres me permettent d'avancer l'hypothèse selon laquelle les gommés ne seraient pas retrouvés dans le produit fini, étant donné les conditions de fabrication du CCAP®.

Afin de répondre au mieux aux Lignes Directrices, j'ai rassemblé des études bibliographiques concernant la toxicologie des gommés, montrant que leur impact sur la santé est très faible. **A ce jour, la toxicité des gommés extraites de l'encens et de la myrrhe n'a pas été évaluée. J'ai donc entrepris une étude comparative sur des gommés issues d'espèces végétales voisines.**

Plusieurs articles énoncent les avantages des gommés naturelles en sciences pharmaceutiques. De par leur richesse en hydrates de carbone, elles seraient biocompatibles et non toxiques. Il semble qu'elles soient mieux tolérées par le patient et qu'elles présentent des effets indésirables moindres comparés aux matériaux synthétiques [39 - 42].

Maru et son équipe (2012) rapportent que le mucilage, structure voisine de la gomme, est non toxique lorsqu'il est évalué en toxicité aiguë chez la souris [43]. Il est isolé à partir des graines de *Caesalpinia pulcherrima* (Euphorbiacées). **La DL<sub>50</sub> supérieure à 5 g/kg traduit une absence de toxicité, même en cas d'ingestion.**

La gomme provenant de l'écorce d'anacardier présente une composition similaire à celle de l'encens et de la myrrhe [43]. Etant décrite comme non toxique et biodégradable, cette gomme est largement utilisée dans diverses applications pharmaceutiques, notamment en tant qu'excipient [44].

L'ensemble de ces études n'a montré aucune toxicité suite à l'utilisation de gommes provenant de végétaux différents [45 ; 46]. De par la similarité de leur composition chimique, les gommes de *Boswellia* et *Commiphora* ne seraient probablement pas toxiques. De plus, les travaux de Kumar et Singh (2010) suggèrent que la gomme de myrrhe pourrait être utilisée dans des formulations galéniques pour ses propriétés liantes et pour développer une forme retardée du principe actif [47].

**En conclusion, les informations collectées m'ont permis de connaître la composition chimique des deux fractions de ces deux plantes et plus particulièrement de caractériser leurs composés majoritaires. Le Laboratoire Pionneau exclut les parties huile essentielle et gomme de ce manuscrit car elles seraient toutes les deux retrouvées à l'état de trace dans le CCAP®. Cette hypothèse est confortée par des pistes préliminaires réalisées au Laboratoire Pionneau. Lors d'une étude en GC-FID sur le produit fini, les huiles essentielles d'encens et de myrrhe n'ont pas été identifiées.**

**Les études de toxicologie des huiles essentielles et de la gomme ne révèlent aucun effet nocif lors de l'utilisation par voie topique. Toutes les  $DL_{50}$  sont supérieures au seuil de toxicité conventionnellement admis, corroborant l'absence d'effets indésirables lors des études précliniques et cliniques. Nous pouvons donc conclure que les fractions huile essentielle et gomme d'encens et de la myrrhe ne seraient pas source de toxicité dans le produit fini.**

### C. La partie résine : polyterpènes

La fraction résine est retrouvée dans des proportions variant de 30 à 60 % par rapport à l'extrait total de l'oléo-gommo-résine d'encens et de myrrhe. Non-volatile, cette partie est constituée d'acides polyterpéniques en mélange avec certains alcools, aldéhydes et esters [18]. C'est une classe de composés très répandue dans la nature [48 ; 49], correspondant à des métabolites secondaires exsudés soit à l'intérieur de la plante soit à sa surface. Ils ne participent donc pas directement à son développement mais plutôt interviennent dans les relations avec les facteurs environnementaux. Ce sont des molécules possédant un gros squelette carboné appartenant au groupe des isoprénoïdes dont la structure de base est l'isoprène (Figure 6).

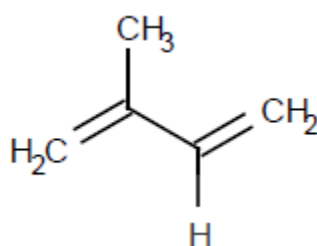


Figure 6 : Unité d'isoprène à 5 atomes de carbones

Quelques pistes bibliographiques nous ont en effet permis de supposer que certains de ces polyterpènes seraient présents dans le CCAP®, grâce à leur grand nombre dans la résine, à l'importante proportion de cette résine dans l'extrait total oléo-gommo-résineux et également de par leurs caractéristiques physico-chimiques compatibles avec le procédé de fabrication du CCAP®.

**Les chapitres suivants correspondent à une étude bibliographique puis analytique de la partie résineuse des oléo-gommo-résines d'encens et de myrrhe car ces dernières sont une source naturelle riche en composés probablement retrouvés dans le produit fini, méritant donc une attention particulière en termes d'identification et de quantification.**





## **Chapitre 3 : Oléo-gommo-résine d'encens : Boswellia**

### **Chapitre 3.1 : Dossier bibliographique**

Pour mener à bien ce chapitre concernant spécifiquement le premier excipient du CCAP®, j'ai mis en place une méthode associant la recherche bibliographique (chapitre 3.1) aux études analytiques (chapitre 3.2).

La première partie du chapitre 3.1 propose une présentation générale de l'encens avec une description botanique de *Boswellia*, suivie d'une revue bibliographique dédiée à la production de l'oléo-gommo-résine d'encens. Une liste de ses utilisations et de ses propriétés sont présentées. La deuxième partie du chapitre est uniquement consacrée à la fraction résine de l'encens. Je développe dans les sous parties dédiées la composition chimique de la fraction résine. Sa connaissance va permettre de dégager les mécanismes d'action des molécules la constituant. Les activités pharmacologiques et toxicologiques sont abordées dans un dernier point.

## I. Présentation végétale de *Boswellia*

### A. Origine botanique et distribution géographique

L'encens est une oléo-gommo-résine exsudée par les espèces appartenant au genre *Boswellia*, famille des Burséracées, ordre des Sapindales, dont la classification est détaillée dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Classification phylogénétique de l'encens

|                      |                                   |
|----------------------|-----------------------------------|
| <b>Règne</b>         | Plantae                           |
| <b>Embranchement</b> | Angiospermes                      |
| <b>Classe</b>        | Rosidae                           |
| <b>Ordre</b>         | Sapindales                        |
| <b>Famille</b>       | Burseraceae                       |
| <b>Genre</b>         | <i>Boswellia</i>                  |
| <b>Espèces</b>       | <i>serrata</i> et <i>carterii</i> |

Cette famille comprend environ 700 espèces distribuées en 18 genres [50]. Actuellement, les 4 principales espèces productrices sont *Boswellia serrata* (Nord-Ouest de l'Inde), *Boswellia sacra* (Arabie), *Boswellia frereana* (espèce endémique du Nord de la Somalie) et *Boswellia carterii* (corne de l'Afrique : nord de la Somalie, Soudan et Ethiopie) [51 - 53]. L'encens est connu sous de nombreuses dénominations comme notamment « oliban » ou « salaï guggal ».



Figure 7 : Photographie d'arbres à encens dans leur environnement naturel

Comme le montre la Figure 7, l'arbre à encens a besoin de chaleur et de sécheresse pour se développer : il est donc retrouvé dans des régions arides. *Boswellia* est un petit ligneux à feuilles caduques ayant une hauteur comprise entre 6 et 9 mètres. Son écorce est épaisse, grise et parcheminée. Ses feuilles composées et imparipennées comportent 9 à 14 paires de folioles dentées, ovales-oblongues [54 ; 55]. Ses fleurs sont blanches, petites, pourvues de nectaires rouges et constituent de belles grappes axillaires ou terminales (Figure 8).



Figure 8 : Photographies de *Boswellia serrata*

## B. Production d'oléo-gommo-résine

L'oléo-gommo-résine d'encens est le résultat de la sécrétion issue de l'écorce de l'arbre, qui se présente sous forme d'une résine pâteuse se solidifiant lentement à l'air libre. Elle est mise à sécher pendant trois mois minimum, puis triée selon des critères de qualité, de couleur, de flaveur, de forme et de taille des cristaux avant l'utilisation ou la vente [54 ; 55]. Ces concrétions ressemblent à des larmes figées, d'un or translucide avec une odeur balsamique, camphrée et légèrement citronnée (Figure 8).

L'oléo-gommo-résine est extraite de l'arbre par raclage d'une portion de l'écorce de 15 à 20 cm de large. La technique consiste à réaliser des incisions transverses en amont et en aval de la portion voulue puis de détacher l'écorce du tronc. La résine est alors collectée durant les 10 à 12 jours suivants et chaque arbre donne environ 1 kg de résine par an [56]. La meilleure qualité de résine est recueillie dans les zones les plus arides, au cours des mois les plus chauds. Elle est réservée à un usage médicinal alors que la résine ramassée dans des conditions moins favorables ou sur le bas des troncs, réputée de qualité inférieure, trouve un usage pendant les cérémonies religieuses. Aujourd'hui, la Somalie est le plus grand exportateur d'oliban, approvisionnant certains pays d'Europe (France, Allemagne et Italie) [52].

## C. Utilisations et propriétés

Les domaines d'utilisation de l'encens sont variés. L'utilisation religieuse date de l'Antiquité dans les cérémonies funéraires, puis est adoptée par les grecs et les romains et enfin dans les églises orientales et occidentales. Les juifs brûlent des résines lors de l'office. Plus tard, à partir du IV<sup>ème</sup> siècle, le christianisme accepte l'utilisation des oléo-gommo-résines [57].

Les premiers parfums fabriqués à partir de l'oléo-gommo-résine d'encens portaient la signature des anciens Egyptiens pour encenser les statues dans les temples. Les bouddhistes utilisent plutôt l'encens sous la forme de bâtonnets, mélangés souvent avec de la myrrhe [58].

D'un point de vue thérapeutique, les **chinois** destinaient la résine d'encens au traitement des rhumatismes, des douleurs abdominales, **des plaies et des ecchymoses**.

Par voie externe, l'extrait de *Boswellia serrata* servait dans le traitement des rhumatismes articulaires, **des plaies de toutes sortes**, des processus inflammatoires, des douleurs aux jambes, aux oreilles et à l'estomac. Par voie interne, c'était un traitement contre les troubles abdominaux (purgatif), contre les affections hépatiques et vésicales, les vers, la toux et les plaies [59]. **Son usage a été ininterrompu depuis l'Antiquité sous forme orale ou topique, entraînant peu ou pas d'effets secondaires.**

La résine de *Boswellia* est surtout connue dans la médecine traditionnelle **Ayurvédique** depuis le XI<sup>ème</sup> siècle. Elle servait à soigner les affections respiratoires (asthme, troubles bronchiques et pulmonaires), les troubles abdominaux (digestifs, urinaires et gynécologiques) tels que ulcère, diarrhée, dyspepsie, hémorroïde, infection urinaire, dysménorrhée, jaunisse, obésité, spasme. Elle est également employée pour les problèmes nerveux, **les plaies**, la teigne et enfin les rhumatismes, les affections inflammatoires dont l'arthrite rhumatoïde juvénile, les douleurs articulaires et troubles osseux [59]...

Aujourd'hui, l'encens a trouvé une place dans la phytothérapie, l'aromathérapie, la parfumerie et la cosmétique. La recherche pharmaceutique s'intéresse elle-aussi à la partie résine de l'encens car certains des composés, principalement les acides boswelliques, présentent des propriétés thérapeutiques. Ces molécules ont une action sur le processus d'inflammation de la peau [54], interviennent dans l'inhibition enzymatique [60] et possèdent également une action anticancéreuse [61]. Cette liste n'est pas exhaustive et d'autres activités ont été mises en évidence [62].

## II. Fraction résineuse

Dans cette deuxième partie, mon étude bibliographique s'arrête à la partie résine d'encens pour les raisons évoquées au chapitre 2. La composition chimique de l'encens est d'abord déterminée afin de connaître les molécules majoritaires présentes dans ces espèces. Ensuite, pour répondre à la gestion des risques énoncés précédemment dans les nouvelles Lignes Directrices, leurs activités pharmacologiques et leurs toxicités sont étudiées, dernier objectif de ce travail bibliographique.

## A. Composition chimique

### 1. Origine et voies de synthèse

La photosynthèse permet de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique, ce qui se traduit par une production d'Adénosine tri-phosphate (ATP) dans le végétal. Cette molécule « énergétique » est ensuite utilisée afin de produire les métabolites primaires (acides aminés, acides gras et glucides), essentiels pour la construction de molécules plus complexes [23]. Les composés terpéniques dérivent tous de l'isopentényl-pyrophosphate. Ils sont formés par deux voies de biosynthèse : la voie de l'acide mévalonique se déroulant dans le cytosol ou les mitochondries et la voie du 1-Déoxy-D-xylulose-5-P dans les plastes (Figure 9).

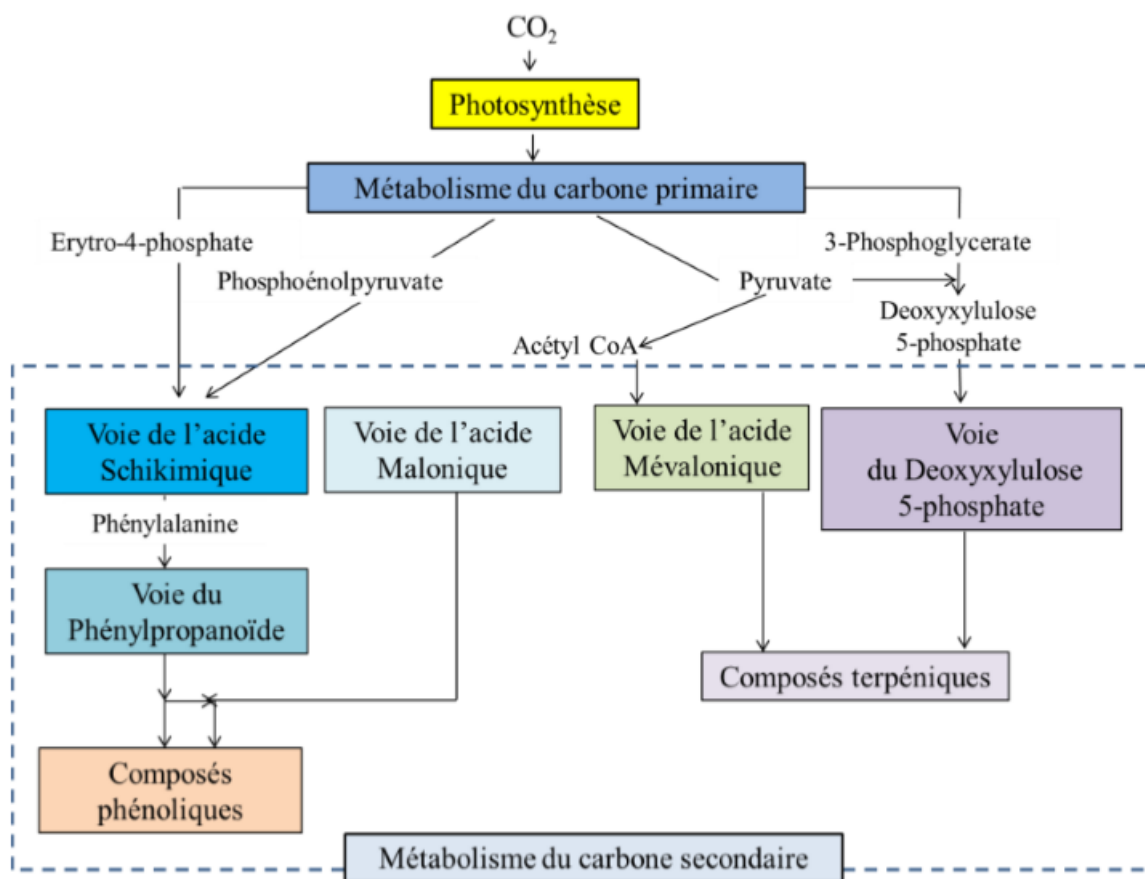


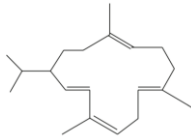
Figure 9 : Différentes voies de biosynthèse des composés terpéniques et phénoliques présents dans les exsudats résineux des végétaux [23]

La fraction résine de l'encens est riche en différents composés : elle contient à la fois des diterpènes et des triterpènes alors que toutes les autres oléo-gommo-résines contiennent soit des diterpènes (oléo-gommo-résines diterpéniques), soit des triterpènes (oléo-gommo-résines triterpéniques).

## 2. Les diterpènes

Les diterpènes présents dans l'encens sont des composés macrocycliques en C<sub>20</sub>, appartenant à deux familles identifiées : les cembranes et les verticillanes. Il faut mentionner que les cembranes et verticillanes constituent une particularité chimique de l'encens par rapport aux autres oléo-gommo-résines, bien qu'ils soient isolés dans certains organismes d'origine animale [63]. Les diterpènes identifiés sont les cembrènes A et C, l'isocembrène et le verticilla-4(20),7,11-triène (Tableau 5).

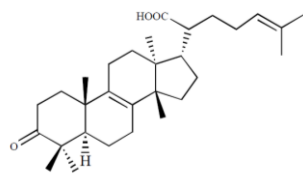
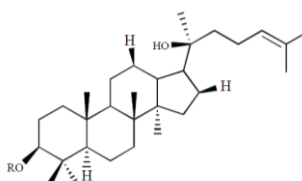
Tableau 5 : Molécules diterpéniques isolées de la résine de *Boswellia carterii*

| Diterpènes                |                                |   |
|---------------------------|--------------------------------|---|
| Source botanique          | Molécules isolées              | Structure chimique  |
| <i>Boswellia carterii</i> | Cembrène A et C                |  |
|                           | Isocembrène                    |   |
|                           | Verticilla-4(20), 7, 11-triène |   |

## 3. Les triterpènes

Les molécules triterpéniques [64], squelette à trente atomes de carbone (C<sub>30</sub>), sont dans la majorité des cas tétracycliques (Tableau 6) ou pentacycliques (Tableau 7).

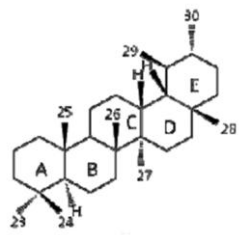
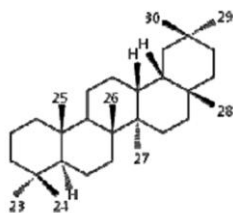
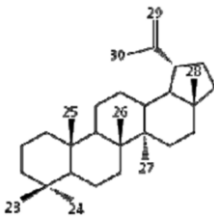
Tableau 6 : Groupes de molécules triterpéniques tétracycliques isolées de la résine d'encens

| Triterpènes tétracycliques |  |
|----------------------------|--|
| Tirucallanes               |  |
| Dammaranes                 |  |



Les molécules triterpéniques tétracycliques, agencées en 3 cycles à 6 carbones et un cycle D à 5 atomes de carbone, sont réparties entre la famille des tirucallanes et celle des dammaranes (Tableau 6). Cinq acides ayant le squelette tirucallane sont caractérisés dans la résine de *Boswellia sacra* alors que seulement 3 de type dammarane sont isolés dans la résine de *Boswellia frereana*.

Tableau 7 : Groupes de molécules triterpéniques pentacycliques isolées de la résine d'encens

| Triterpènes pentacycliques |   |
|----------------------------|---|
| Ursane                     |     |
| Oléanane                   |    |
| Lupane                     |  |

Les molécules agencées en 5 cycles à 6 carbones font partie des familles des ursanes ou des oléananes, qui diffèrent par la position d'un méthyle (C29) sur le cycle E. Les molécules agencées en 4 cycles à 6 carbones et 1 cycle à 5 carbones (cycle E) appartiennent à la famille des lupanes (Tableau 7).

La multitude de composés triterpéniques résulte :

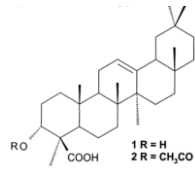
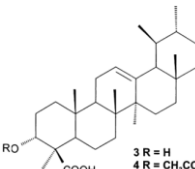
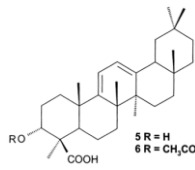
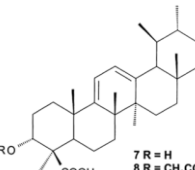
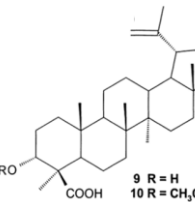
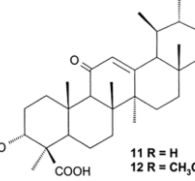
- ♣ du nombre et de l'agencement des cycles
- ♣ de la position des groupes méthyles substitués
- ♣ de la présence et la position des insaturations
- ♣ des isomères dus aux configurations chaise/bateau, R ou S,  $\alpha$  ou  $\beta$
- ♣ de la présence de groupes fonctionnels (OH, C=O, COOH)

Ainsi, 75 composés de la résine d'encens sont identifiés comme triterpènes tétracycliques ou pentacycliques [64]. **Les molécules ayant le squelette oléanane et celles ayant le squelette ursane sont en plus grand nombre dans la résine d'encens, plaçant ainsi les triterpènes pentacycliques comme composés majoritaires dans cette fraction.**

Des échantillons d'extraits de *Boswellia serrata* originaires d'Afrique ou d'Inde ont permis de retrouver jusqu'à 12 acides triterpéniques pentacycliques différents (Tableau 8). Les triterpènes pentacycliques majoritaires sont des acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -boswelliques qui présentent plusieurs métabolites acétylés (2, 4, 6, 8, 12) et cétoniques (11, 12). Les représentants identifiés de la famille des lupanes sont les acides lupéoliques (9, 10) [64]. Ces données, regroupées à d'autres articles, permettent d'étoffer cette étude. Il a déjà été montré que l'oléo-gommo-résine de *Boswellia serrata* contient habituellement 43 % d'acides boswelliques.

**Ainsi, la recherche de la composition chimique de ces résines m'amène à porter mon intérêt sur les molécules triterpéniques pentacycliques.**

Tableau 8 : Molécules triterpéniques pentacycliques isolées de la résine d'encens

| Triterpènes pentacycliques                                |  |                  |
|---|--|------------------|
| Nom de la molécule  | Structure chimique   | Famille chimique |
| Acide $\alpha$ -boswellique <u>1</u>                      |    | Oléanane         |
| Acide acétyl- $\alpha$ -boswellique <u>2</u>              |  |                  |
| Acide $\beta$ -boswellique <u>3</u>                       |    | Ursane           |
| Acide acétyl- $\beta$ -boswellique <u>4</u>               |  |                  |
| Acide 9,11-dehydro- $\alpha$ -boswellique <u>5</u>        |  | Oléanane         |
| Acide acétyl-9,11-dehydro- $\alpha$ -boswellique <u>6</u> |  |                  |
| Acide 9,11-dehydro- $\beta$ -boswellique <u>7</u>         |  | Ursane           |
| Acide acétyl-9,11-dehydro- $\beta$ -boswellique <u>8</u>  |  |                  |
| Acide lupéolique <u>9</u>                                 |  | Lupane           |
| Acide acétyl-lupéolique <u>10</u>                         |  |                  |
| Acide 11-céto- $\beta$ -boswellique <u>11</u>             |  | Ursane           |
| Acide 3-O-acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique <u>12</u>  |  |                  |

## B. Etude pharmacologique de l'oléo-gommo-résine et des acides boswelliques

Les acides  $\beta$ -boswelliques, composés majoritaires de la partie résine, sont utilisés pour leurs propriétés pharmacologiques. En effet, de nombreuses données scientifiques suggèrent que l'extrait de *Boswellia serrata* posséderait des propriétés anti-inflammatoires. L'oléo-gommo-résine d'encens et plus précisément les acides  $\beta$ -boswelliques ont donc été testés dans plusieurs maladies dans lesquelles l'inflammation est impliquée, comme l'arthrose, l'arthrite, la polyarthrite rhumatoïde, l'asthme, le psoriasis ou encore les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Une première étude a montré que dans des modèles de rats présentant une pleurésie induite par du carrageen, l'administration orale d'un extrait alcoolique de *Boswellia serrata* provoque une diminution de l'afflux de polynucléaires et réduit le volume d'exsudat, témoignant ainsi d'un effet anti-inflammatoire [65].

Une deuxième expérience a comparé l'effet anti-inflammatoire d'un extrait de *Boswellia* et celui d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) : la phénylbutazone. Dans des modèles de rats présentant un œdème de la patte induit par le carrageen, l'administration par voie orale de l'extrait de *Boswellia* entraîne une inhibition de 39 à 75 % du gonflement alors que celle induite par l'AINS est de 47 % [56]. Les auteurs ont ensuite cherché les molécules responsables de cet effet pharmacologique. Pour cela, une analyse séparant les constituants d'un mélange d'acides triterpéniques pentacycliques montre que l'effet anti-inflammatoire maximal est obtenu avec un dérivé de l'acide  $\beta$ -boswellique. Pour confirmer ces résultats, des acides  $\beta$ -boswelliques sont administrés oralement à ces mêmes animaux à des doses de 50 à 200 mg/kg et une inhibition significative du gonflement est relevée [56].

L'ensemble de ces travaux tendent à montrer que l'extrait de *Boswellia* et plus particulièrement les acides  $\beta$ -boswelliques présentent des propriétés anti-inflammatoires proches de celles des AINS utilisés dans le traitement des maladies inflammatoires.

## 1. Mécanismes d'action expliquant les effets anti-inflammatoires

La résine d'encens fait l'objet de publications et de nombreux essais. Les travaux suivants permettent d'estimer les mécanismes d'action anti-inflammatoire des acides  $\beta$ -boswelliques.

### a) Action sur la synthèse des eicosanoïdes

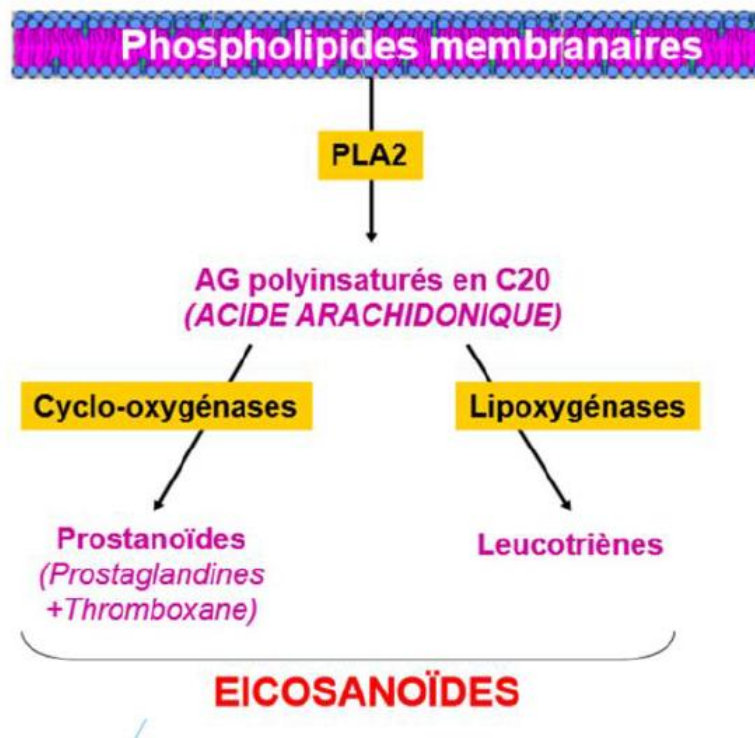


Figure 10 : Schéma simplifié de la synthèse des eicosanoïdes

Les eicosanoïdes sont des molécules pro-inflammatoires synthétisées par l'intermédiaire de deux enzymes, la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase, formant respectivement des prostanoïdes et des leucotriènes (Figure 10). De nombreux tissus sont le siège de la production de Tromboxane A<sub>2</sub>, de leucotriènes et de prostaglandines qui sont synthétisés au cours des phénomènes inflammatoires et douloureux.

Il est démontré que les acides  $\beta$ -boswelliques agissent directement sur la lipo-oxygénase, ce qui bloque la synthèse des leucotriènes, la meilleure inhibition étant apportée par l'acide acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique [66 - 68]. Ce constat est validé par l'ajout d'acide  $\beta$ -boswellique sur des cultures de polynucléaires neutrophiles péritonéaux de rats stimulés par un ionophore. Une inhibition dose-dépendante de la formation des leucotriènes à partir de l'acide arachidonique a été notée par rapport à un groupe témoin [66 ; 69].

D'autres travaux montrent que les acides  $\beta$ -boswelliques n'affectent pas le fonctionnement de la cyclo-oxygénase et ne modifient pas, par conséquent, la synthèse des prostanoïdes [66]. En effet, in vivo chez le rat, les acides  $\beta$ -boswelliques ne permettent ni d'allonger la durée de gestation ni d'améliorer le temps de guérison de diarrhées. Ces deux périodes étant liées à la production des prostaglandines, les auteurs en concluent que les acides  $\beta$ -boswelliques ne doivent pas inhiber leur synthèse [56].

### ***b) Action sur les élastases leucocytaires***

Une étude a montré que l'ajout d'extrait de *Boswellia serrata* sur des leucocytes humains mis en culture inhibe l'activité des élastases leucocytaires, enzymes pro-inflammatoires. Cette inhibition pourrait contribuer à l'effet anti-inflammatoire des acides  $\beta$ -boswelliques [70].

### ***c) Activité anti-complémentaire***

Pour prouver l'activité anti-complémentaire des acides  $\beta$ -boswelliques, une nouvelle expérience a été tentée : du sérum de cochon d'inde renfermant des anticorps anti-hématies de mouton est mis en contact avec 100  $\mu$ g d'acides  $\beta$ -boswelliques et des hématies de moutons. Une inhibition de l'hémolyse est alors observée par rapport à un groupe témoin, ce qui révèle que ces composés peuvent inhiber l'effet cytolitique du complément. Cet effet semble être dû à une inhibition de la C3-convertase qui intervient dans la voie classique d'activation du complément [71].

**L'inhibition de la lipo-oxygénase, des élastases leucocytaires et du complément participent ainsi à expliquer les propriétés anti-inflammatoires de la fraction résine d'encens, portées essentiellement par les acides  $\beta$ -boswelliques.**

## **2. Applications des effets anti-inflammatoires sur différentes pathologies**

Le deuxième point de ce travail porte sur les applications cliniques des propriétés anti-inflammatoires des acides  $\beta$ -boswelliques extraits de la résine d'encens. Les travaux cités sont des pistes de recherche. Leur liste n'est pas exhaustive et n'a pas toujours conduit à la commercialisation d'un nouveau produit de santé. Nous citons différentes voies d'administration qui permettent de mettre en évidence le panel d'applications possibles de ces composés en santé humaine.

### a) Arthrose

L'arthrose, à l'origine d'un processus inflammatoire, est une affection dégénérative progressive des articulations synoviales. Elle se caractérise principalement par une destruction du cartilage articulaire et une synovite modérée (Figure 11).



Il a été montré que l'utilisation d'un extrait de *Boswellia serrata* dans le traitement de l'arthrose du genou entraîne une diminution significative de la douleur [72]. Cet essai clinique, randomisé en double aveugle versus placebo, démontre que tous les patients recevant l'extrait augmentent leur flexion du genou et leur distance de marche. Par contre, la fréquence de gonflement du genou diminue, mais sans observer de modifications radiologiques. **Les différences significatives dans les résultats sont cliniquement en faveur de la prise de Boswellia qui présente également une bonne tolérance [72].**

Dans une autre étude, les auteurs comparent la prise d'AINS, classe médicamenteuse prescrite dans les pathologies inflammatoires, à l'extrait de *Boswellia*. Les AINS entraînent une diminution de la synthèse des glycosaminoglycanes dans les articulations, ce qui peut accélérer leur dégradation en cas d'arthrose. Il a été mis en évidence que l'extrait de *Boswellia serrata* diminue cette dégradation de l'articulation [72]. Ces résultats sont confirmés par une étude supplémentaire comparant l'extrait de *Boswellia* au kétoprofène [73].

### b) Polyarthrite Rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde, maladie auto-immune, est la plus fréquente des diverses formes de rhumatismes inflammatoires. Elle entraîne une inflammation simultanée de plusieurs articulations, qui gonflent, deviennent douloureuses et sont limitées dans leur amplitude de mouvement (Figure 12).

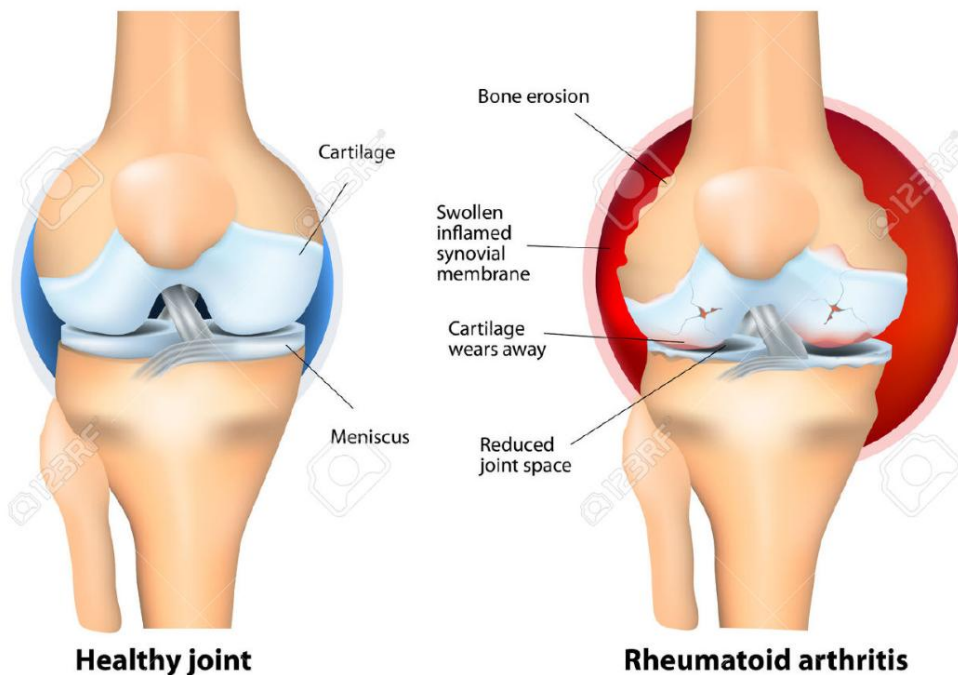


Figure 12 : Comparaison entre une articulation saine (à gauche) et une articulation chez un patient atteint de polyarthrite rhumatoïde (à droite)

Deux études cliniques ont testé l'extrait de *Boswellia serrata* versus placebo sur 81 patients présentant une polyarthrite rhumatoïde. **Ces travaux rapportent une réduction significative du gonflement et de la douleur après un traitement de 3 mois par l'extrait de Boswellia [74].**

### c) Arthrite

Un modèle d'arthrite chronique réalisé chez le lapin a montré que l'administration orale d'acides  $\beta$ -boswelliques permet d'obtenir une réduction significative du nombre de cellules et de protéines inflammatoires par rapport au groupe contrôle.

Ce même effet est retrouvé dans un essai clinique. En effet, les effets anti-inflammatoires des acides  $\beta$ -boswelliques ont été évalués dans divers modèles d'arthrites induites par l'adjuvant de Freund, du formaldéhyde... [56]. **Des acides  $\beta$ -boswelliques sont administrés par voie orale à la concentration de 50 à 200 mg/kg, entraînant une efficacité anti-arthritique comparable à celle de la phénylbutazone (AINS), par inhibition significative de l'afflux de cellules inflammatoires dans l'articulation [75].**



#### d) Asthme

Une étude en double aveugle versus placebo incluant 80 patients atteints d'asthme intermittent a permis d'évaluer l'effet d'un extrait de *Boswellia serrata*. Des doses de 300 mg d'oléo-gommo-résine d'encens ont été administrées 3 fois par jour pendant 6 semaines à 40 patients asthmatiques. **Certains symptômes tels que les difficultés respiratoires, la respiration sifflante et le nombre de crises ont été améliorés chez 70 % des patients ayant reçu l'extrait d'encens [76].**

#### e) Psoriasis

Une étude a été réalisée en double aveugle chez 10 patients atteints de psoriasis afin d'évaluer l'efficacité d'une crème à base d'acides  $\beta$ -boswelliques (Bosexil®). La crème est appliquée 2 fois par jour pendant 1 mois sur les parties du corps atteintes (Figure 13). Les effets sont calculés par Indice de Sévérité de la Surface du Psoriasis représentant un score évalué à partir des lésions élémentaires (érythème, infiltration, desquamation), des surfaces atteintes et de l'étendue des lésions.



Figure 13 : Patients atteints de psoriasis avant (à gauche) et après (à droite) application de crème à base d'acides  $\beta$ -boswelliques [77]

Une amélioration des symptômes est observée chez 70 % des patients. En effet, l'Indice de Sévérité de la Surface du Psoriasis passe de 14,5 à 11,5 à la fin de l'étude, comparé à celui du groupe placebo qui reste constant [77].

### f) *Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin*

Une étude menée en double aveugle versus placebo sur 102 patients atteints de maladie de Crohn, compare l'effet d'un extrait standardisé de *Boswellia serrata* à celui de la mesalazine (AINS) pendant 8 semaines. **Les patients ayant reçu l'extrait de Boswellia ont ressenti une amélioration de leur symptomatologie au moins aussi importante que les patients ayant pris le médicament [78].**

L'administration de l'extrait de *Boswellia serrata* à la posologie de 300 mg en 3 prises par jour pendant 6 semaines, sur un échantillon de petite taille, entraîne une rémission chez 70 % des patients. Cette même expérience, réalisée chez des patients traités par sulfasalazine (AINS) à 1 g en 3 prises par jour pendant 6 semaines, montre une rémission chez 40 % des patients [79].

**Au vu de tous ces résultats, il semblerait que l'utilisation de Boswellia et plus particulièrement des acides  $\beta$ -boswelliques présente un intérêt dans le traitement des pathologies impliquant des mécanismes inflammatoires. Ces recherches sont encore d'actualité puisqu'une étude clinique impliquant les acides  $\beta$ -boswelliques et portant sur le traitement du psoriasis a notamment été publiée en 2014.**

### 3. Applications commerciales

Certaines formulations à base de *Boswellia serrata* existent sur le marché mondial :

- ♣ Boswellin® est un produit présent sur les marchés asiatiques, américains et européens. Il est disponible sous forme de comprimés ou en association avec la capsaïcine dans une crème permettant de soulager la douleur. Il existe des dosages allant de 125 à 250 mg d'acides  $\beta$ -boswelliques par comprimé, à prendre 2 fois par jour. Cette spécialité possède des propriétés anti-inflammatoires utilisées en cas de douleurs articulaires.
- ♣ Sallaki 400 mg est utilisé pour diminuer l'inflammation et les raideurs articulaires. Il contient 60 % d'acides  $\beta$ -boswelliques et 7 à 8 % d'huiles essentielles.
- ♣ Rhumatismale-X contenant 20 mg d'extrait de *Boswellia serrata*, est destiné à soulager les douleurs lors des crises de goutte, les douleurs rhumatismales ou encore celles liées à l'arthrose [73].

#### 4. Pharmacocinétique

##### a) Par voie orale

Une étude pharmacocinétique a été menée chez l'homme par Sharma et son équipe (2004) [80]. Une administration unique par voie orale d'une capsule contenant 333 mg d'extrait de *Boswellia serrata* permet de doser les taux plasmatiques d'acide 11-céto- $\beta$ -boswellique, molécule à activité anti-inflammatoire dont la cinétique est étudiée.

L'absorption digestive de cette forme cétonique est relativement rapide, la concentration plasmatique maximale de 2,7  $\mu\text{mol/mL}$  étant observé au bout de 4,5 h environ après ingestion.

La valeur du temps de demi-vie d'élimination est d'approximativement 6 h, ce qui signifie que l'administration per os d'extrait de *Boswellia serrata* 3 fois par 24 h donnerait une concentration plasmatique stable au bout de 30 h [80].

La phase d'absorption est favorisée lorsque l'extrait est administré lors d'un repas contenant des matières grasses [81].

##### b) Par voie topique

L'application topique d'une émulsion eau dans huile contenant 4 acides  $\beta$ -boswelliques isolés à partir de l'oléo-gommo-résine de *Boswellia serrata* a permis d'évaluer leurs effets sur des modèles d'inflammation aiguë et chronique provoqués expérimentalement chez des rats [82].

Les résultats obtenus révèlent que l'application topique est aussi efficace que la voie systémique suggérant une bonne biodisponibilité par voie transdermique [82].

### C. Etude toxicologique de l'oléo-gommo-résine et des acides $\beta$ -boswelliques

L'intérêt principal de cette partie est de savoir si les extraits de *Boswellia* et plus particulièrement les acides  $\beta$ -boswelliques entraînent un risque sur la santé humaine de par leur présence dans les excipients et donc dans le CCAP®. La littérature scientifique fournit un certain nombre d'études précliniques et cliniques permettant de répondre à la question posée.

#### 1. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë d'un extrait de *Boswellia serrata* a été évaluée chez le rat et le lapin. La  $DL_{50}$  chez ces espèces est supérieure à 2 g/kg [83], ce qui classe cette substance comme non toxique en cas d'ingestion. Par comparaison, la  $DL_{50}$  de l'ibuprofène est de 1,6 g/kg, ce qui nous amène à conclure que l'extrait de *Boswellia* est moins toxique que l'ibuprofène. L'autre grand avantage de l'oléo-gommo-résine d'encens par rapport aux AINS est de ne pas provoquer d'ulcère [84].

## 2. Toxicité chronique

Une administration de 1 g/kg d'extrait de *Boswellia serrata* chez le rat pendant 4 mois n'entraîne aucune modification des paramètres biochimiques ou hématologiques. Les analyses histopathologiques du foie ou des reins ne montrent aucune modification par rapport aux rats contrôles. Pour compléter ces résultats, des études de toxicité subaiguë et chronique d'extraits de *Boswellia* conduites sur 3 espèces de mammifères n'ont révélé aucune modification des paramètres biochimiques plasmatiques ou tissulaires [84].

De la même manière, une expérience menée sur des rates recevant par voie orale des acides  $\beta$ -boswelliques à une dose équivalente à 250 fois celle utilisée chez l'homme (200 mg ; 2 fois par jour) pendant 6 mois, tend à prouver qu'il n'y a aucune modification des paramètres hématologiques et biochimiques par rapport au groupe témoin [56]. Pour compléter ces informations, des travaux menés sur le rat et le primate ont montré que l'administration d'acides  $\beta$ -boswelliques pendant 3 mois à 10 fois cette même dose (200 mg ; 2 fois par jour) n'est responsable d'aucun effet néfaste [56].

Lorsqu'il est donné à des rates enceintes, l'extrait de *Boswellia* ne provoque aucun effet secondaire, même à la dose de 200 mg/kg.

**Les données de toxicologie aiguë et chronique de l'extrait de *Boswellia* révèlent une excellente tolérance et une faible toxicité de ce même extrait. Comme le CCAP® est utilisé en voie externe, ma recherche s'est focalisée sur des articles portant sur l'évaluation de la sécurité lors d'une administration d'acides  $\beta$ -boswelliques par voie topique.**

## 3. Evaluation de la sécurité lors d'une administration par voie topique

Une étude a été réalisée pour évaluer l'innocuité et l'efficacité de l'application d'une crème contenant 2 % d'acides  $\beta$ -boswelliques (Bosexil®). Cette crème est utilisée pour la prévention et le soulagement des effets indésirables induits par la radiothérapie chez les patientes atteintes de cancer du sein. Les réactions aiguës de la peau et notamment sa couleur ont été évaluées cliniquement par l'intensité visuelle et l'analyse assistée par ordinateur. Cette expérience a été menée sur 59 patientes atteintes d'un carcinome mammaire en double aveugle avec un contrôle placebo sur 55 volontaires. **Bosexil® a été bien toléré et aucun effet indésirable n'a été ressenti dans la population étudiée [85].**

Un autre travail a été mené pour évaluer la sécurité de la pommade Boswellin® contenant 5 % d'acides  $\beta$ -boswelliques pour application cutanée [86]. Dans cette étude, 15 volontaires sains dans le groupe d'âge 23-41 ans ont été soumis à des tests de patch sur 5 zones saines de la peau de l'avant-bras. Après 24 et 48 h, aucune réaction de la peau en termes d'érythème, papule, cloque,

sécheresse, démangeaison, brûlure ou d'odeur n'a été signalée par les volontaires. La pommade a donc été trouvée exempte de toxicité cutanée. L'évaluation objective des médecins après auscultation n'a également révélé aucune réaction indésirable. **La préparation contenant Boswellin® a donc été bien tolérée par tous les bénévoles. Boswellin® paraît donc être un agent topique sûr qui ne sensibilise pas la peau et qui n'engendre pas de toxicité cutanée.**

D'ailleurs, aux États-Unis l'oléo-gommo-résine d'encens fait partie de la liste des substances sûres et son utilisation est autorisée par la Food and Drug administration (FDA) en tant qu'additif alimentaire [87]. De plus, l'arôme caractéristique de l'encens est acceptable dans la plupart des formulations topiques.

**Toutes ces études précliniques et cliniques ne démontrent aucune toxicité due à l'application cutanée d'extrait brut de Boswellia. De plus, la DL<sub>50</sub> évaluée chez les rats est de 2 g/kg, ce qui corrobore la très faible toxicité de ce produit même en cas d'ingestion. L'administration d'extrait de Boswellia et d'acides  $\beta$ -boswelliques n'entraîne aucune modification chronique des paramètres hématologiques chez le rat et aucun effet indésirable chez les rates enceintes. De plus, les formulations topiques contenant 2 et 5 % d'acides boswelliques n'entraînent aucune toxicité.**

## D. Conclusion

Ce chapitre 3.1 concerne spécifiquement l'encens, premier excipient retrouvé dans la formulation du CCAP®. Mon travail s'est focalisé sur sa fraction résine, majoritairement présente dans le produit fini. J'ai réalisé une revue approfondie des connaissances acquises sur cette fraction pour faire un état des lieux et une actualisation de la bibliographie déjà existante.

La fraction résine d'encens est caractérisée par une grande richesse en différents composés. Ces derniers peuvent être divisés en plusieurs familles moléculaires en fonction de leur structure et nombre d'atomes de carbone. Elle contient à la fois des diterpènes (C<sub>20</sub>) et des triterpènes (C<sub>30</sub>). La résine d'encens étudiée est caractérisée par sa grande diversité naturelle en composés triterpéniques. Il est rapporté que cette dernière famille est représentée majoritairement par des formes pentacycliques. **Les données de la bibliographie concernant la fraction résine nous amènent à miser sur certains de ces triterpènes : l'acide  $\beta$ -boswellique, l'acide 3-O-acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique et l'acide 11-céto- $\beta$ -boswellique. En effet, ces trois composés sont présents en forte proportion dans la matière première et les acides  $\beta$ -boswelliques sont décrits dans les différentes études pharmacologiques et toxicologiques comme composés d'intérêt.**

Une synthèse des études bibliographiques concernant la toxicologie des acides  $\beta$ -boswelliques a donc été réalisée dans le but d'évaluer le risque encouru sur la santé humaine. **Toutes les études précliniques et cliniques citées ne démontrent aucune toxicité due à l'application cutanée d'extrait brut de Boswellia ou d'acides  $\beta$ -boswelliques (2 à 5 % présents dans des formes topiques).** Une

étude bibliographique à usage systémique a permis d'appuyer les données concernant l'usage topique. En effet, la  $DL_{50}$  évaluée chez les rats est de 2 g/kg, ce qui corrobore la très faible toxicité de ce produit même en cas d'ingestion. L'administration d'extraits de *Boswellia* et d'acides  $\beta$ -boswelliques n'entraîne aucune modification chronique des paramètres hématologiques chez le rat et aucun effet indésirable chez les rates enceintes. **Ces données de toxicité par voie systémique permettent d'estimer l'impact sur la santé humaine d'un mésusage du CCAP® qui serait par exemple administré par voie orale à la place de la voie topique. Dans ce cas précis, nous nous attendons à une faible toxicité en cas d'ingestion.**

Dans un objectif plus fondamental, une revue bibliographique concernant des études pharmacologiques menées sur les résines d'encens a été rapportée dans ce manuscrit. L'idée principale qui en ressort serait la variabilité et la complexité des mécanismes d'action. L'extrait de *Boswellia* et les acides  $\beta$ -boswelliques interviendraient sur différentes voies de l'inflammation par des modes d'action variés en inhibant de nombreux médiateurs, cytokines et enzymes pro-inflammatoires. Certaines questions demeurent encore sans réponse. Parmi les différentes études citées, celle du psoriasis retient mon attention. Cette étude permet de mettre en évidence l'efficacité et la sécurité de l'utilisation d'une crème à base d'acides  $\beta$ -boswelliques sur les lésions. Cette application corrobore l'usage traditionnel des oléo-gommo-résines par voie externe, illustrant leurs propriétés antiseptiques et anti-inflammatoires. **L'usage en santé humaine des formulations topiques (crèmes) et par voie orale (compléments alimentaires) des spécialités à base d'extrait d'encens et/ou d'acides  $\beta$ -boswelliques, confirme une très faible toxicité voire nulle pour ces composés.**

**Ce travail bibliographique a permis de répondre à mon premier objectif de thèse, concernant l'application des Lignes Directrices liées à la gestion du risque des excipients entrant dans la composition du CCAP®.**

**Ce point là étant traité, le Laboratoire Pionneau a voulu identifier et surtout quantifier les trois composés dans le produit fini. Les données expérimentales ainsi recueillies pourront améliorer la connaissance de la composition du CCAP® en molécules d'intérêt, et également être comparées aux données de toxicité de la littérature ( $DL_{50}$ ), pour confirmer l'absence de toxicité des excipients du produit fini.**



## **Chapitre 3 : Oléo-gommo-résine d'encens : Boswellia**

### **Chapitre 3.2 : Dossier analytique**



Pour appuyer et consolider ce travail de revue littéraire, j'ai entrepris un travail analytique destiné à caractériser et quantifier les molécules majoritaires de la résine d'encens, potentiellement retrouvées dans le CCAP® : l'acide  $\beta$ -boswellique et ses deux formes cétoniques. Pour ce type de composés organiques non volatils, la technique de séparation la plus appréciée en analyse phytochimique est l'HPLC. Le Laboratoire Pionneau étant équipé d'une UHPLC-UV, j'ai pu mettre au point une méthode d'identification et de quantification des composés d'intérêt de la résine d'encens.

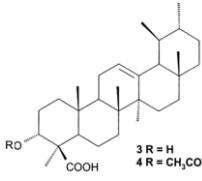
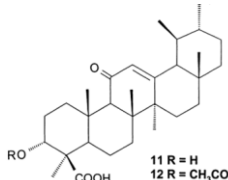
Ce chapitre est construit de la façon suivante. Une partie introductive permet d'aborder les caractères physico-chimiques de ces substances. Je me suis ensuite intéressée aux techniques analytiques de la bibliographie visant à identifier et quantifier ces différentes molécules, qui ont servi de base à la sélection de l'appareillage et des conditions analytiques appliquées dans mes protocoles. Pour finir, les résultats obtenus au Laboratoire Pionneau clôturent ce chapitre.

## **I. Caractéristiques physico-chimiques de l'acide $\beta$ -boswellique et de ses formes cétoniques**

Les molécules d'intérêt de la résine d'encens sont l'acide  $\beta$ -boswellique et ses deux formes cétoniques. Ces composés ont des caractéristiques physico-chimiques proches, bien que différentes comme le point de fusion ou encore le maximum d'absorption en UV, qui conditionnent leur extraction à partir des plantes et leur méthode de séparation et de détection.

L'acide  $\beta$ -boswellique (B1) et ses deux formes cétoniques (C1 et C2) sont des molécules possédant un gros squelette carboné pentacyclique, dérivant de la structure de base triterpénique. La richesse en groupements carbonés au regard des groupements polaires peu nombreux (-OH, -COOH) confère à ces molécules un caractère fortement apolaire (Tableau 9).

Tableau 9 : Structure chimique de B1, C1 et C2

| Triterpènes   |   |
|---|---|
| Nom de la molécule  | Structure chimique  |
| Acide $\beta$ -boswellique (B1) <u>3</u>                      |  |
| Acide 11-céto- $\beta$ -boswellique (C2) <u>11</u>            |  |
| Acide 3-O-acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique (C1) <u>12</u> |   |

Ces trois composés possèdent peu de groupements chromophores :

- ♣ La double liaison C=O de la fonction acide carboxylique
- ♣ La double liaison C=C intracyclique conjuguée avec
- ♣ La double liaison C=O spécifique de C1 et C2 située sur le C<sub>11</sub>

Les électrons  $\pi$  de la double liaison C=C intracyclique conjuguée à la double liaison C=O du C<sub>11</sub> sont responsables de la différence de longueur d'onde de détection de ces molécules : le maximum d'absorption de B1 est à 210 nm, alors que pour C1 et C2 il est à 250 nm.

Les triterpènes étudiés sont des molécules à caractère faiblement acide définies par un pKa d'environ 5. Ils sont très lipophiles, avec un log P d'environ 6, justifiant une faible solubilité dans l'eau. Ils sont par contre très solubles dans l'éthanol absolu et le méthanol. Les caractéristiques physico-chimiques connues de ces molécules sont regroupées dans le Tableau 10 [64 ; 73 ; 88].

Tableau 10 : Caractéristiques physico-chimiques de B1, C1 et C2

| Caractères chimiques                         | Acide $\beta$ -boswellique (B1)  | Acide 11-céto- $\beta$ -boswellique (C2) | Acide 3-O-acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique (C1) |
|--|----------------------------------|--|---|
| Formule brute                                | $C_{30}H_{48}O_3$                | $C_{30}H_{48}O_4$                        | $C_{32}H_{48}O_5$                                   |
| Masse molaire moléculaire (g/mol)            | 456,7                            | 470,69                                   | 512,73  |
| Nomenclature                                 | 3a-Hydroxy-urs-12-en-23-oic acid | 3a-Hydroxy-urs-12-en-11-keto-23-oic acid | 3a-Acetoxy-urs-12-en-11-keto-23-oic acid            |
| Point d'ébullition (°C)                      | 226–228                          | 195–197                                  | 271–274   |
| Longueur d'onde (nm) au maximum d'absorption | 208                              | 250                                      | 250   |
| pKa  | 5,11                             | 5,29                                     | 5,18  |
| log P  | 6,32                             | 6,46                                     | 6,35  |

## II. Études analytiques connues en HPLC

Dans le but d'obtenir le maximum d'informations concernant les méthodes analytiques permettant leur quantification, des études bibliographiques ont été sélectionnées, dans lesquelles la résine d'encens est extraite selon divers processus d'extraction puis analysée selon différentes techniques analytiques telles que l'HPLC-UV ou encore LC-MS/MS. Ces données permettront de confirmer, parmi la partie triterpénique, que ces trois molécules pentacycliques sont majoritairement importantes.

### A. Identification des triterpènes de *Boswellia* en LC-MS/MS

Certains composés présents dans la résine sont soit à l'état de trace, soit instables, ce qui rend leur identification complexe. Liu et son équipe (2014) sont arrivés à identifier ces composés par le biais d'une méthode LC-MS/MS [89].

1,0 g de poudre de résine de *Boswellia carterii* est dissous dans 15 mL de méthanol pendant 30 min. Après sonication, le surnageant est filtré puis injecté dans la colonne Agilent Zorbax SB C18 (21,2 mm x 250 mm x 7  $\mu$ m). Les 4 échantillons fils obtenus sont évaporés puis repris dans de l'ACN et réinjectés dans la colonne avec une détection MS/MS. Les composés sont élués en mode gradient par des mélanges de méthanol et d'ACN.

Le chromatogramme permet d'identifier, parmi les 75 composés obtenus, ceux qui sont majoritaires dans la résine de *Boswellia* (Figure 14).

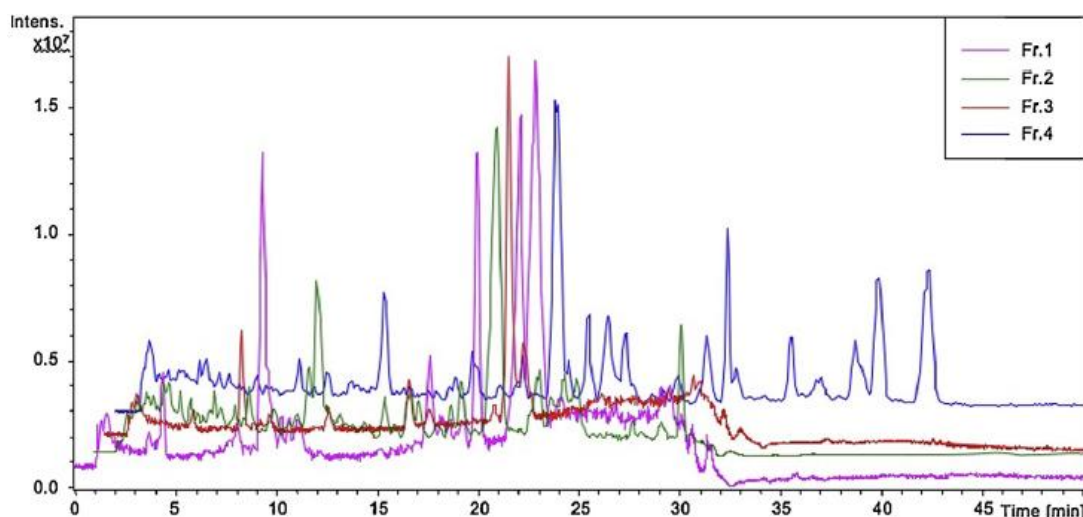


Figure 14 : Chromatogramme de la résine de *Boswellia* en LC-MS/MS

La Figure 14 montre que les acides boswelliques de type  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que les acides lupéoliques sont les composés majoritaires de la résine d'encens. Leur proportion relative dans la résine de *Boswellia* est alors étudiée.

## B. Dosage des acides boswelliques et lupéoliques en HPLC-UV

10 g d'oléo-gommo-résine fraîche de *Boswellia serrata* et *Boswellia carterii* sont extraits par 150 mL de méthanol pendant 3 h selon la méthode Soxhlet puis injectés en HPLC-UV dans une colonne ReproSil-Pur 120 ODS-3 (250 mm x 3,0 mm x 5 µm) [64].

Les composés sont élués en mode gradient avec une phase mobile A contenant le mélange Méthanol/Eau – Acide acétique (80/20/0,2 V : V : V) et une phase mobile B comprenant le mélange Méthanol – Acide acétique (100/0,2 V : V). Les composés sont détectés à 210, 250 et 280 nm. Les résultats du dosage des acides  $\beta$ -boswelliques et lupéoliques de la résine d'encens sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Composition quantitative en triterpènes de la résine d'encens

| Composés   | <i>Boswellia serrata</i><br>(mg/g d'encens) | <i>Boswellia carterii</i><br>(mg/g d'encens) |
|--|---|--|
| Acide $\alpha$ -boswellique <u>1</u>                             | 24,5  | 26,9   |
| Acide acétyl- $\alpha$ -boswellique <u>2</u>                     | 4,7   | 21,1   |
| Acide $\beta$ -boswellique (B1) <u>3</u>                         | 46  | 37,2   |
| Acide acétyl- $\beta$ -boswellique <u>4</u>                      | 25,4  | 39,8   |
| Acide 9,11-dehydro- $\alpha$ -boswellique <u>5</u>               | 0,24  | 0,04   |
| Acide acétyl-9,11-dehydro- $\alpha$ -boswellique <u>6</u>        | 0,12  | 0,06   |
| Acide 9,11-dehydro- $\beta$ -boswellique <u>7</u>                | 0,54  | 0,15   |
| Acide acétyl-9,11-dehydro- $\beta$ -boswellique <u>8</u>         | 0,18  | 0,28   |
| Acide lupéolique <u>9</u>  | 3,2   | 2,3  |
| Acide acétyl-lupéolique <u>10</u>                                | 3,5   | 7,8  |
| Acide 11-céto- $\beta$ -boswellique (C2) <u>11</u>               | 20,2  | 10,1   |
| Acide 3-O-acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique<br>(C1) <u>12</u> | 14,3  | 47,0   |
| <b>Total</b>   | <b>142,9</b>                                | <b>192,7</b>                                 |

Les composés 1, 3, 4, 11 et 12 sont majoritaires dans la résine de *Boswellia serrata* et *Boswellia carterii*, alors que le composé 2 est fortement représenté seulement chez *Boswellia carterii*. Dans le cas de *Boswellia serrata*, le composé le plus retrouvé est l'acide  $\beta$ -boswellique (B1) 3 tandis que pour *Boswellia carterii*, il s'agit de l'acide 3-O-acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique (C1) 12. Les résultats présentés dans le Tableau 12 donnent la proportion des trois acides 3, 11 et 12 dans la résine d'encens.

Tableau 12 : Proportions de B1, C1 et C2 dans les résines d'encens

| Composés  | <i>Boswellia serrata</i> |                    | <i>Boswellia carterii</i> |                    |
|---|--------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|
|   | (mg/g d'encens)          | (% dans la résine) | (mg/g d'encens)           | (% dans la résine) |
| Acide $\beta$ -boswellique (B1) <u>3</u>                      | 46                       | 32,2               | 37,2                      | 19,3               |
| Acide 11-céto- $\beta$ -boswellique (C2) <u>11</u>            | 20,2                     | 14,1               | 10,1                      | 5,2                |
| Acide 3-O-acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique (C1) <u>12</u> | 14,3                     | 10,0               | 47,0                      | 24,4               |

L'acide  $\beta$ -boswellique 3 et ses formes cétoniques 11 et 12 sont les composés majoritaires dans les résines de *Boswellia serrata* et *Boswellia carterii*. Ces molécules sembleraient être en proportions suffisantes pour être retrouvées dans le CCAP®.

Le procédé industriel d'extraction des acides boswelliques à partir de l'oléo-gommo-résine commence par un dégraissage à température ambiante, ce qui permet d'éliminer 40 % des graisses et des huiles essentielles. L'extrait obtenu subit ensuite différentes techniques de purification telles que la percolation, l'extraction sélective, le fractionnement et la concentration sous vide. L'extrait final représentant 12 % du matériel de départ est constitué d'un mélange d'acides triterpéniques pentacycliques. L'acide  $\beta$ -boswellique est le constituant principal puisqu'il représente 30 % des composés de la famille des acides boswelliques. Il se présente sous la forme d'une poudre blanchâtre. **Cette extraction industrielle de l'acide  $\beta$ -boswellique à partir de la résine corrobore les résultats du dosage précédemment mentionné.**

### C. Récapitulatif des méthodes de dosage des acides $\beta$ -boswelliques

Afin d'approfondir l'étude analytique, trois autres méthodes de dosage issues de publications et de la monographie de la Pharmacopée Européenne sont comparées (Tableau 13).

Tableau 13 : Comparaison des méthodes de dosage des acides boswelliques : B1, C1 et C2

| Publications  | Shah et al. 2008 [90]                                     | Shikov et al. 2010 [91]                             | Kamal et al. 2014 [92]                     | Pharmacopée Européenne [14]                   |
|---|---|---|--|---|
| Méthode   | HPLC-UV phase inverse                                     |   |  |   |
| Colonne   | C18, 250 mm x 4,6 mm x 5 $\mu$ m                          | C18, 150 mm x 4,6 mm x 5 $\mu$ m                    | C18, 250 mm x 4,6 mm x 5 $\mu$ m           |   |
| Mode d'élution  | Isocratique   | Gradient  |  |   |
| Phases mobiles  | ACN/Eau – Acide acétique (90/10 V : V) QSP pH = 4         | A : ACN<br>B : Eau – Acide trifluoroacétique 0,03 % | A : ACN<br>B : Eau – Acide acétique 0,05 % | A : ACN<br>B : Eau – Acide phosphorique 0,1 % |
| Débit de phases mobiles   | 2 mL/min  | 1 mL/min  | 2 mL/min                                   | 1 mL/min                                      |
| Durée d'analyse   | 18 min  |   | 40 min                                     |   |
| Longueur d'onde   | C1 et C2 : 260 nm   | C1 et C2 : 254 nm<br>B1 : 210 nm                    |  | C1 et C2 : 250 nm                             |
| Intervalle de concentrations dans lequel la méthode est validée | C1 : 6,50-32,50 $\mu$ g/mL<br>C2 : 11,66-58,30 $\mu$ g/mL |   | LOQ entre 1 et 5 $\mu$ g/mL                |   |

Dans ces quatre méthodes, les résines de *Boswellia* sont analysées en HPLC-UV en phase inverse avec une colonne C18. Le mode d'élution est l'isocratique ou le gradient avec un débit compris entre 1 et 2 mL/min. Les solvants utilisés sont l'ACN et l'eau tamponnée. Pour identifier les différents acides  $\beta$ -boswelliques, il faut se placer aux longueurs d'onde de 210, 254 ou 260 nm. Par contre, une seule équipe procède à la validation de la méthode de quantification des acides  $\beta$ -boswelliques par étalonnage externe selon les Lignes Directrices ICH [91].

**Le point de départ de mon travail analytique est basé sur la monographie de l'encens (Pharmacopée Européenne version 9.0) avec l'identification et la quantification de C1 et C2. Néanmoins, dans le cas de *Boswellia serrata* et *Boswellia Carterii*, l'acide  $\beta$ -boswellique est un composé majoritaire. J'ai également choisi de l'inclure dans l'étude des marqueurs de la résine d'encens dans le CCAP®.**

Pour mon travail de thèse, plusieurs points importants sont à retenir pour la recherche des composés terpéniques dans le CCAP®. Il a été étudié comment un processus d'extraction peut influencer la composition chimique d'une résine et quelles sont les molécules préférentiellement extraites en fonction du procédé et du solvant employé. Deux procédés d'extraction ont été testés : le Soxhlet et les ultrasons. Concernant les solvants d'extraction, le méthanol est sélectionné. Toutes ces informations m'ont aidé pour l'optimisation du développement de la méthode d'identification des composés dans le CCAP®.

**Il est important de souligner que les composés 3, 11 et 12 dans les tableaux précédents portent dorénavant les noms B1 (acide  $\beta$ -boswellique), C2 (acide 11-céto- $\beta$ -boswellique) et C1 (acide 3-O-acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique).**

L'objectif visé est de reproduire la monographie de la Pharmacopée Européenne pour le genre botanique *Boswellia* en tant que matière première et de la transposer ensuite sur le produit fini, le CCAP®. La mise au point du protocole d'identification et de dosage des formes cétoniques des acides  $\beta$ -boswelliques est établie. L'analyse de la matière première et du produit fini est réalisée par différentes techniques analytiques et chromatographiques. L'accent est mis sur l'amélioration des conditions opératoires, telle que la sensibilité de la méthode.



### III. Matériels

Pour identifier et doser les acides  $\beta$ -boswelliques, mon choix s'est porté sur une méthode de référence, l'HPLC-UV, recommandée par la Pharmacopée Européenne. Cette technique demeure la plus souvent utilisée car elle présente de nombreux avantages et la connaissance du principe de fonctionnement de l'appareil permet de régler au mieux les paramètres analytiques pour cette étude.

#### A. Techniques analytiques : UHPLC-UV [93]

##### 1. Principe de fonctionnement de l'appareil

Le laboratoire Pionneau est équipé d'une UHPLC et non d'une HPLC. L'UHPLC est une technologie qui s'appuie sur les principes de la chromatographie liquide haute performance à laquelle s'ajoutent des innovations en termes de sensibilité, de résolution chromatographique, de vitesse d'analyse et permet de tolérer des pressions allant de 800 à 1 200 bars.

L'UHPLC-UV est une technique analytique permettant d'identifier et quantifier des composés en solution dans un mélange, combinant une méthode de séparation physique par chromatographie liquide ultra haute performance avec un mode de détection par spectrophotométrie UV.

##### a) Méthode de séparation par UHPLC

L'UHPLC se base sur la différence d'affinité des composés d'un mélange en solution pour une phase stationnaire et une phase mobile. La rétention des molécules sera donc fonction de leur différence de polarité. La phase stationnaire correspond à une colonne choisie de manière à retenir les composés à séparer. La phase mobile correspond à un liquide en contact avec la phase stationnaire, responsable de l'élution des molécules.

Le terme de chromatographie en phase normale est utilisé lorsque la phase stationnaire est polaire, la phase mobile est alors un solvant organique apolaire : hexane, heptane, cyclohexane... Les composés apolaires seront élués avant les composés polaires puisqu'ils sont moins retenus par la phase stationnaire. En ce qui concerne la chromatographie en phase inverse, la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile est le plus souvent un mélange de solvants polaires. Ce type de chromatographie liquide est fréquemment utilisé. **Pour l'analyse des acides  $\beta$ -boswelliques, je choisis de travailler en phase inverse car les molécules étudiées ont un caractère fortement apolaire permettant leur rétention par une phase stationnaire du même type.**

L'UHPLC utilise une phase stationnaire constituée de microparticules (3-5  $\mu\text{m}$  de diamètre) placées dans une colonne. Le passage de la phase mobile dans la colonne provoque une augmentation de la pression nécessitant un appareillage spécifique (pompes, colonnes, injecteurs...). **La pression est un paramètre important à vérifier à chaque utilisation, elle est un bon indicateur du fonctionnement de la chaîne UHPLC.**

**Le réservoir** contient la phase mobile, elle-même constituée d'un ou plusieurs solvants conservés dans des flacons. La pompe doseuse rend possible la variation des mélanges de solvants sans avoir à les fabriquer dans des proportions fixes. Cela permet de faciliter l'expérimentation de différents mélanges de phases mobiles et également de faire varier leur composition au cours du temps. Les phases mobiles peuvent être tamponnées à l'aide d'un composé acide ou basique afin de jouer sur l'ionisation des composés à analyser et ainsi optimiser leur rétention. **Dans cette étude, les phases mobiles ont été tamponnées avec de l'acide phosphorique ( $\text{pK}_a = 2,1$ ). Dans ces conditions, ces composés sont donc presque exclusivement sous leur forme moléculaire, favorisant ainsi leur rétention par la colonne chromatographique.**

**La pompe** permet l'écoulement de la phase mobile dans la colonne. Elle assure un débit précis, constant et réglable tout en supportant des pressions élevées. Grâce à plusieurs voies, il est possible de travailler en mode :

- ♣ Isocratique : la composition de la phase mobile ne varie pas au cours du temps.
- ♣ Gradient : la composition de la phase mobile varie au cours de l'analyse.

**J'ai joué sur ces deux types de modes afin de tester différentes conditions pour séparer au mieux les composés à analyser, tout en limitant le temps de l'analyse.**

**L'injecteur** correspond à une boucle d'injection de volume variable, assurant une bonne répétabilité dans les volumes d'échantillons injectés. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Ce système maintient un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative. **Dans cette étude, la boucle partielle est utilisée. Le volume de la boucle est de 200  $\mu\text{L}$  ce qui permet des volumes d'injection compris entre 10 et 30  $\mu\text{L}$ .**

**La colonne** est un tube fabriqué à partir d'un matériau inerte (inox généralement), de diamètre : 2-20 mm et de longueur : 5-30 cm, au sein duquel se trouvent des microsphères de silice (3-5  $\mu\text{m}$  de diamètre) pouvant être greffées. La phase stationnaire varie en fonction du type de chromatographie à effectuer et de la nature des composés à doser.

Les phases stationnaires sont de deux types :

- ♣ Imprégnées : phase solide de silice retenant à sa surface les composés, surtout utilisées en chromatographie d'adsorption.
- ♣ Greffées : formées grâce à des liaisons covalentes entre les groupements silanols de la silice et des molécules organiques de nature variée. Elles peuvent être polaires (amines) ou apolaires (chaines linaires de 8 à plus de 20 carbones).


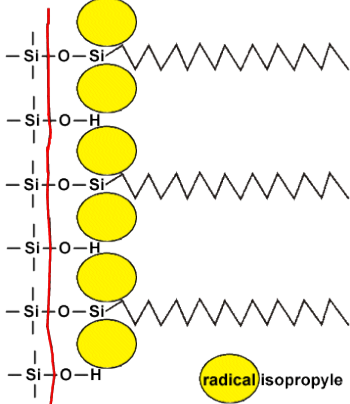
Les deux colonnes utilisées dans ce travail sont constituées de silice greffée à des groupements apolaires : soit des groupements C18, soit des groupements phenylhexyles. Je travaille donc en phase inverse.

### b) Choix des colonnes

#### (1) Colonne Synchronis® C18

Afin de reproduire les conditions de la monographie de la Pharmacopée Européenne, j'ai débuté l'identification des deux formes cétoniques avec une colonne constituée de silice greffée à des groupements apolaires, la Synchronis® C18 de dimensions 250 mm x 4,6 mm x 5 µm (Tableau 14).

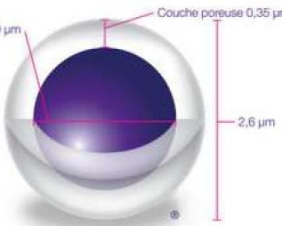
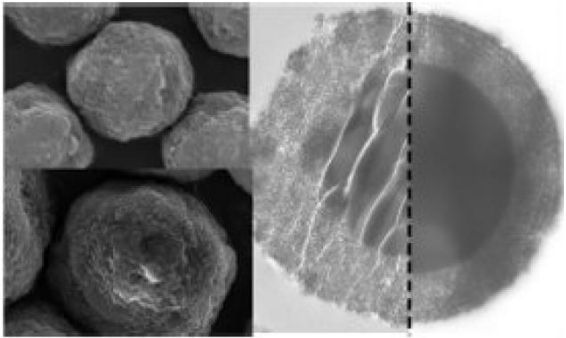
Tableau 14 : Photographie et structure chimique d'une colonne Synchronis®

| Colonne Synchronis®   | Structure chimique d'une colonne C18   |
|---|--|
|  |  |

## (2) Colonne Kinetex® Phenylhexyle

Une colonne core-shell Kinetex® (100 mm x 3,0 mm x 2,6 µm) de Phenomenex a aussi été utilisée afin d'identifier le composé B1. La particularité de cette colonne réside dans l'ajout de silice poreuse autour des sphères, leur conférant une forme régulière. Elles sont notamment plus lisses que dans une colonne classique (Tableau 15).

Tableau 15 : Schéma et photographie de particules de silice dans la colonne Kinetex® en MET et MEB [94]

| Colonne Kinetex®  | A droite Kinetex®, à gauche colonnes classiques                                     |
|---|---|
| <p><b>Particule Core-Shell 2,6 µm Kinetex®</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Un itinéraire de diffusion réduit optimise l'efficacité</li><li>• Ultra-hautes performances sur n'importe quel système équipé de colonnes 2,6 µm Kinetex®</li></ul>  |  |

L'avantage de la colonne Kinetex® réside dans son optimisation de la vitesse linéaire de la phase mobile, qui est supérieure à celle des colonnes avec des sphères complètement poreuses. Le temps d'analyse diminue donc considérablement avec ce type de colonne car il est possible de travailler avec un débit de phase mobile important [95]. **Les groupements phenylhexyles greffés permettent une meilleure rétention et séparation des hydrocarbures aromatiques, ce qui est le cas des acides β-boswelliques.**

### c) Mode de détection UV

**Les détecteurs UV** doivent fournir une réponse qui reflète en continu les variations de composition de l'éluant et qui diffère en fonction des composés. Les systèmes de détection les plus communément utilisés sont :

- ♣ Spectrophotomètre de type séquentiel : ce détecteur permet d'envoyer un faisceau monochromatique qui génère un signal à une seule longueur d'onde à un instant donné. Il est toutefois possible de faire varier la longueur d'onde du faisceau au cours du temps, mais pour un instant donné est généré un seul signal correspondant à une seule longueur d'onde. **Dans cette étude, ce type de détecteur est sélectionné.**

- ♣ Spectrophotomètre de type simultané ou Détecteur UV à barrette de diodes : celui-ci enregistre des signaux à toutes les longueurs d'onde simultanément, permettant ainsi de réaliser un spectre d'absorption à bandes larges, caractéristique de la molécule.

L'UV correspond au mode de détection le plus utilisé aujourd'hui pour l'analyse des composés naturels possédant un ou plusieurs groupements chromophores.

**Les trois acides  $\beta$ -boswelliques sont étudiés avec une technique analytique combinant une méthode de séparation physique (UHPLC) avec un mode de détection, d'identification et de quantification par spectrophotométrie UV.**

## 2. Analyse des données chromatographiques

### a) Qualitative

Le diagramme obtenu par traitement du signal enregistré en sortie du chromatographe est appelé chromatogramme. Chaque composé apparaît sous forme d'un pic et peut être caractérisé par un temps de rétention ( $t_r$ ). Le  $t_r$  correspond à la durée écoulée entre le moment de l'injection de l'échantillon et le point le plus haut du pic. Il s'exprime en unité de temps.

Chaque composé, dans des conditions données, va être caractérisé par son  $t_r$  permettant son identification au sein d'un mélange. Pour que cela soit possible, il faut une bonne séparation des pics et un temps d'analyse raisonnable. Cette séparation est caractérisée par plusieurs paramètres :

- ♣ **Le facteur de rétention** : grandeur qui caractérise la rétention d'un composé par le système chromatographique (Équation 1). Plus le facteur de rétention est grand, plus le composé est retenu par la phase stationnaire et donc plus son élution est tardive.

*Équation 1 : Facteur de rétention*

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Avec :

$k'$  le facteur de rétention

$t_r$  le temps de rétention du composé analysé

$t_m$  le temps mort

- ♣ **La sélectivité** : grandeur qui prend en compte la différence de  $t_r$  entre deux composés (Équation 2). Plus la sélectivité est importante, plus le composé à doser est séparé des autres.

*Équation 2 : Sélectivité*

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_m}{t_{r1} - t_m}$$

Avec :

$\alpha$  la sélectivité

$t_{r1}$  et  $t_{r2}$  respectivement les temps de rétention des composés 1 et 2

$t_m$  le temps mort

- ♣ **L'efficacité** : grandeur qui prend en compte la largeur du pic par rapport au  $t_r$  (Équation 3). Plus la méthode est efficace, plus le pic est fin. On évalue l'efficacité par le biais du nombre de plateaux théoriques  $N$ . Plus  $N$  est grand, plus la méthode est efficace.

*Équation 3 : Efficacité*

$$N = \frac{L}{H} = 16 \frac{t_r^2}{\omega^2} = 5,54 \frac{t_r^2}{\omega_{1/2}^2}$$

Avec :

$N$  le nombre de plateaux théoriques

$L$  la longueur de la colonne

$H$  la hauteur d'un plateau théorique

$t_r$  le temps de rétention du composé à doser

$\omega$  la largeur du pic à sa base

$\omega_{1/2}$  la largeur du pic à la moitié de sa hauteur

- ♣ **La résolution** : grandeur qui prend en compte la qualité de séparation de deux pics voisins (Équation 4). Une résolution supérieure à 1,5 indique que deux pics sont bien séparés. Une résolution supérieure à 3 n'est pas un gage de meilleure séparation mais d'un temps d'analyse plus long.

*Équation 4 : Résolution*

$$R = 2 \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(\omega_1 + \omega_2)}$$

Avec :

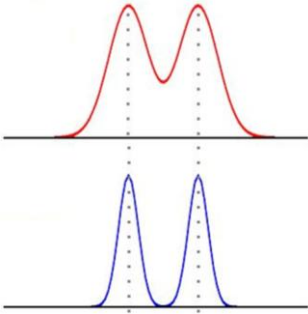
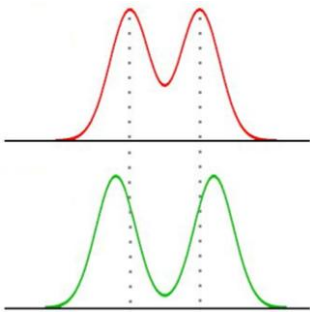
$R$  la résolution

$t_{r1}$  et  $t_{r2}$  respectivement les temps de rétention des composés 1 et 2

$\omega_1$  et  $\omega_2$  les largeurs à la base des pics correspondant aux composés 1 et 2

Des représentations graphiques de la sélectivité, l'efficacité et la résolution sont retrouvées dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Exemples de différentes efficacités, sélectivités et résolutions

| Même sélectivité, efficacité (bleu > rouge)<br>Donc composés bleus mieux résolus  | Même efficacité, sélectivité (vert > rouge)<br>Donc composés verts mieux résolus   |
|---|--|
|  |  |

- ♣ **Le facteur de symétrie** : grandeur qui caractérise la symétrie d'un pic (Équation 5). Un facteur de symétrie inférieur à 0,8 ou supérieur à 1,5 révèle une asymétrie du pic, entraînant des difficultés d'intégration ou générant de mauvaises résolutions. Le facteur de symétrie doit être proche de 1 (Figure 15).

Équation 5 : Facteur de symétrie

$$As = \frac{a_{5\%} + b_{5\%}}{2a_{5\%}}$$

Avec :

$As$  le facteur de symétrie

$a_{5\%}$  et  $b_{5\%}$  respectivement les largeurs du pic du côté gauche et droit de la verticale tracée depuis le haut du pic jusqu'à la base, à la hauteur de 5% de celle du pic.

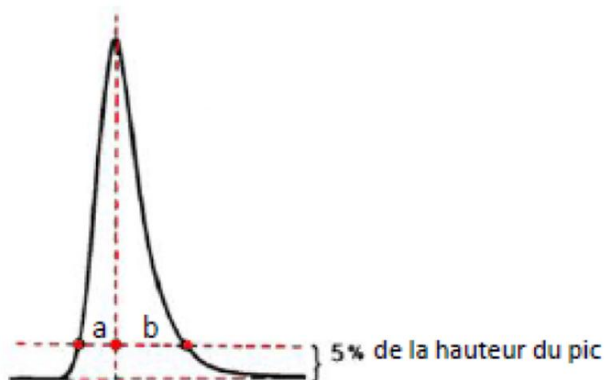


Figure 15 : Schéma d'un pic asymétrique

**b) Quantitative**

Le passage du composé à doser dans le détecteur UV entraîne la génération d'un signal régi par la loi de Beer-Lambert (Équation 6). En effet, il y a une relation de proportionnalité entre l'absorbance du composé à une longueur d'onde de travail et la concentration de ce même composé dans l'enceinte d'analyse.

*Équation 6 : Loi de Beer-Lambert*

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} I C$$

Avec :

$A_{\lambda}$  l'absorbance à la longueur d'onde  $\lambda$

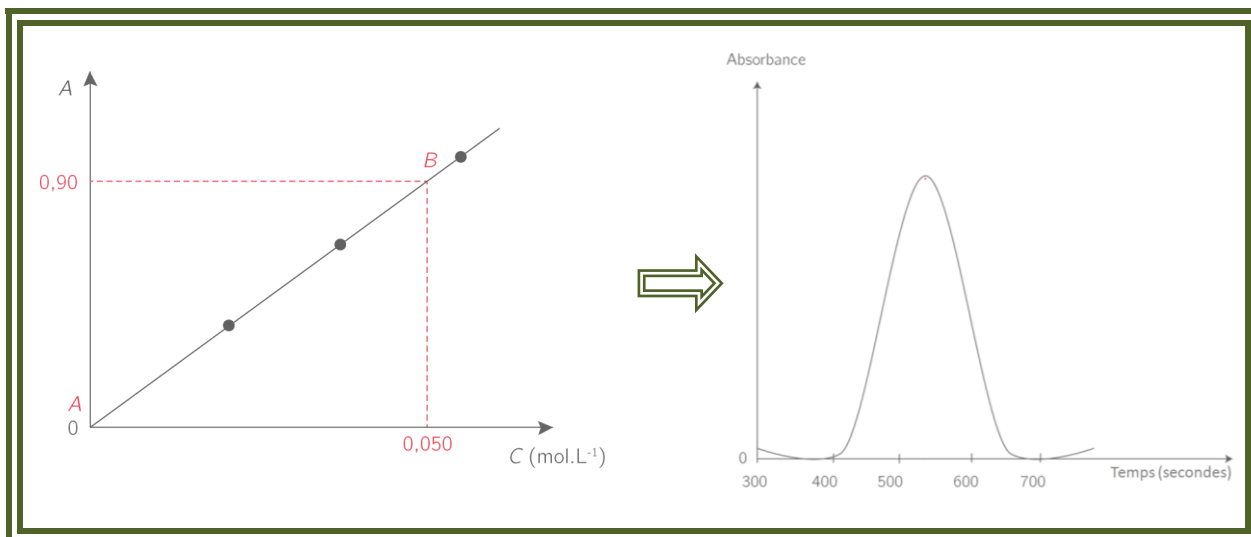
$\varepsilon_{\lambda}$  le coefficient d'extinction molaire ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) ou spécifique ( $\text{g}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

$I$  l'épaisseur de la cuve (cm)

$C$  la concentration molaire ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ou molale ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

En UHPLC-UV, les composés sont préalablement séparés puis détectés en continu pendant un intervalle de temps durant lequel l'intensité du signal est proportionnelle à la concentration à cet instant en molécule d'intérêt. Durant ce laps de temps, un pic est formé sur le chromatogramme, dont l'aire est proportionnelle à la quantité injectée de ce composé (Tableau 17).

*Tableau 17 : Représentation du signal donné par la concentration en composé présent dans le détecteur à un instant  $t$  (schéma de gauche) et du chromatogramme obtenu après enregistrement des signaux sur un intervalle de temps  $\omega$  (schéma de droite)*



Ainsi, une concentration peut être déterminée en utilisant une courbe de calibration par régression linéaire, également appelée droite d'étalonnage.



## B. Echantillons utilisés lors de l'étude

### 1. Témoins

Les formes cétoniques de l'acide  $\beta$ -boswellique (C1 et C2) ont été commandées chez Sigma-Aldrich. Elles se présentent sous la forme d'une poudre de couleur blanche dont les puretés sont respectivement de 94 et 95 %.

Une poudre contenant l'acide  $\beta$ -boswellique (B1) a été commandée chez Sigma-Aldrich. Elle est de couleur blanche et possède une pureté de 95%.

### 2. Matière première : l'encens

L'encens, en tant que matière première, est disponible au Laboratoire Pionneau. Il s'agit d'exsudats de type oléo-gommo-résine bien connus d'un point de vue chimique (Figure 16), récoltés en Somalie puis importés en France. L'encens est commercialisé par la société EMIGA implantée à Marseille. Ces concrétions me servent de contrôle puisque la présence des composés d'intérêt dans la matière première me permet d'appréhender les résultats lors de l'identification et du dosage dans le CCAP®. Deux lots d'oléo-gommo-résines d'encens ont été étudiés mais les résultats portent uniquement sur l'un d'entre eux.

### 3. Le CCAP®

Plusieurs lots de CCAP® ont été utilisés dans cette étude : CH 164 et CH 166. Ces lots de CCAP® ont été fabriqués respectivement en août et décembre 2016 avec le même lot d'encens (Figure 17).



Figure 16 : Photographie de l'oléo-gommo-résine de *Boswellia serrata*



Figure 17 : Photographie du produit fini, le CCAP®

## IV. Méthodes

### A. Préparation des échantillons

#### 1. Préparation des témoins

##### a) Cas de C1 et C2

###### (1) Selon le protocole de la Pharmacopée Européenne [14]

Une solution stock d'acide 3-O-acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique (C1) est préparée à la concentration de 14,80  $\mu\text{g/mL}$  à partir d'environ exactement 0,740 mg de poudre, pesé sur une balance de précision puis dissous dans 50 mL de méthanol de qualité HPLC. La solution est finalement diluée au demi dans la phase mobile constituée d'un mélange ACN/Eau (84/16 V : V), donnant une concentration finale de 7,40  $\mu\text{g/mL}$ .

Une solution stock d'acide 11-céto- $\beta$ -boswellique (C2) est préparée à la concentration de 7  $\mu\text{g/mL}$  à partir d'environ exactement 0,350 mg de poudre, pesé sur une balance de précision puis dissous dans 50 mL de méthanol de qualité HPLC. La solution est finalement diluée au demi dans la phase mobile constituée d'un mélange ACN/Eau (84/16 V : V), donnant une concentration finale de 3,50  $\mu\text{g/mL}$ .

Une solution fille contenant les deux témoins est préparée par mélange de deux volumes identiques des solutions stocks de C1 et C2, donnant respectivement des concentrations finales de 3,70  $\mu\text{g/mL}$  et 1,75  $\mu\text{g/mL}$ . Cette solution est donc diluée au demi par rapport aux solutions stocks.

Après homogénéisation, toutes les solutions sont filtrées sur une membrane de porosité 0,45  $\mu\text{m}$  (membrane en nylon de diamètre 13 mm) avant injection en UHPLC-UV. Ces solutions sont conservées à une température de 4°C.

###### (2) Optimisation de la préparation du témoin C1

Pour optimiser la résolution des pics en UHPLC-UV, trois nouvelles solutions stocks de C1 sont préparées à partir de trois solvants différents. Environ exactement 0,250 mg de poudre de C1 est pesé sur une balance de précision, puis mis en solution dans environ exactement 20 mL de méthanol de qualité HPLC, formant ainsi une solution stock de concentration 12,50  $\mu\text{g/mL}$ . La même masse de poudre de C1 est à nouveau pesée sur une balance de précision, puis dissoute dans environ exactement 20 mL d'éthanol 33 % (V : V) de qualité HPLC. La même masse de poudre est pesée puis dissoute dans 20 mL d'un mélange d'ACN et d'eau tamponnée avec de l'acide phosphorique à 0,1 % (84/16/0,1 V : V : V), tous de qualité HPLC. Cette dernière solution correspond à la phase mobile utilisée dans les analyses chromatographiques.

**b) Cas de B1****(1) Selon le protocole de la publication de 2014 [96]**

Une solution stock de l'acide  $\beta$ -boswellique (B1) est préparée à la concentration de 13  $\mu\text{g/mL}$  à partir d'environ exactement 0,260 mg de poudre, pesé sur une balance de précision, puis dissous dans un mélange Méthanol/Eau (30/70 V : V) de qualité HPLC.

Après homogénéisation, la solution est filtrée sur une membrane de porosité 0,45  $\mu\text{m}$  (membrane en nylon de diamètre 13 mm) avant injection en UHPLC-UV. Elle est conservée à une température de 4°C.

**(2) Optimisation de la préparation du témoin B1**

Une solution stock de l'acide  $\beta$ -boswellique (B1) est préparée à la concentration de 13  $\mu\text{g/mL}$  à partir d'environ exactement 0,260 mg de poudre, pesé sur une balance de précision puis mis en solution dans 20 mL de méthanol de qualité HPLC.

Une solution stock de l'acide  $\beta$ -boswellique (B1) est préparée à la concentration de 13  $\mu\text{g/mL}$  à partir d'environ exactement 0,260 mg de poudre, pesé sur une balance de précision et dissous dans 20 mL d'ACN de qualité HPLC.

Une solution stock de l'acide  $\beta$ -boswellique (B1) est préparée à la concentration de 13  $\mu\text{g/mL}$  à partir d'environ exactement 0,260 mg de poudre, pesé sur une balance de précision, mis en solution dans 20 mL dans un mélange Ethanol/Eau (33/67 V : V) de qualité HPLC.

Après homogénéisation, les solutions sont filtrées sur une membrane de porosité 0,45  $\mu\text{m}$  (membrane en nylon de diamètre 13 mm) avant injection en UHPLC-UV. Elles sont conservées à une température de 4°C.

**(3) Evaluation de la perte à l'évaporation/reprise**

Pour évaluer la perte de B1 lors de la technique de chauffage à reflux, exactement 10,0 mL de la solution stock de B1 sont prélevés à l'aide d'une pipette jaugée puis introduits dans le ballon. La solution est chauffée à reflux pendant 10 min avec des conditions opératoires précises : le ballon doit être immergé dans un bain marie à une température de 90°C, avec une vitesse de rotation de 90 tours/min. La solution est évaporée jusqu'à obtenir un extrait d'une masse finale d'environ exactement 0,92 g. Environ 8 mL de méthanol sont ajoutés afin de permettre une meilleure reprise de l'extrait qui est transféré dans une fiole jaugée de 10,0 mL. La fiole est complétée avec du méthanol jusqu'au trait de jauge. La solution est filtrée sur une membrane de porosité 0,45  $\mu\text{m}$ , avant injection en UHPLC-UV.

## 2. Préparation de la matière première : encens

Le protocole de la Pharmacopée Européenne et celui de l'AMM sont utilisés pour C1, C2 et B1.

### a) Selon le protocole de la Pharmacopée Européenne

Les échantillons solides d'exsudat sont broyés de manière homogène dans un mortier avec un pilon, formant une poudre fine de couleur jaunâtre. Environ exactement 1,0 g d'encens pulvérisé est pesé à l'aide d'une balance de précision, puis dissous dans 90 mL de méthanol. Pour faciliter la dissolution, le mélange est traité dans un bain aux ultrasons à la fréquence de 40 kHz pendant 10 min en agitant à 3 ou 4 reprises. L'ensemble est complété à 100 mL puis décanté pendant 20 min. Le surnageant est dilué au 1/50<sup>ème</sup> dans du méthanol puis filtré sur une membrane de porosité 0,45 µm, avant injection en UHPLC-UV.

### b) Selon l'AMM du CCAP®

Pour s'approcher du procédé de fabrication du CCAP®, les conditions de l'AMM sont respectées. Une prise d'essai en grammes d'encens broyés est mélangée dans de l'éthanol 33 % (V : V). L'échantillon est mélangé plusieurs fois par retournement et conditionné dans des flacons ambrés. La solution est filtrée sur une membrane de porosité 0,45 µm, avant injection en UHPLC-UV.

### c) Cas de C1 : étude de la perte à la filtration

La solution d'encens préparée selon le protocole de la Pharmacopée Européenne est filtrée avant une première injection en UHPLC-UV. La solution est de nouveau filtrée puis réinjectée dans le système chromatographique. Cette dernière étape est répétée une troisième fois.

## 3. Préparation des échantillons de CCAP®

Plusieurs lots de CCAP® sont utilisés dans cette étude : CH 164 et CH 166. Ils ont été fabriqués respectivement en août et décembre 2016 à partir du même lot d'encens.

### a) Pur

Environ exactement 2 g de CCAP® (lots CH 164 et CH 166) sont prélevés et filtrés sur une membrane de porosité 0,45 µm puis injectés en UHPLC-UV.

### b) Cas de C1 et C2 : CCAP® concentré

Environ exactement 100 g de CCAP® (lot CH 166) sont pesés sur une balance. La solution est chauffée à reflux pendant 20 min dans des conditions opératoires précises : le ballon doit être immergé dans un bain marie à une température de 90°C, avec une vitesse de rotation de 90 tours/min. La solution est évaporée jusqu'à obtenir un extrait d'une masse finale d'environ exactement 2 g. Environ exactement 3 g de méthanol sont ajoutés afin d'avoir une meilleure reprise de l'extrait. La solution

est filtrée sur une membrane de porosité 0,45 µm, avant injection en UHPLC-UV.

### *c) Cas de B1 : CCAP® repris dans le méthanol*

Pour l'identification de B1 dans le produit fini, exactement 10,0 mL de CCAP® sont prélevés à l'aide d'une pipette jaugée puis introduits dans le ballon. La solution est chauffée à reflux pendant 20 min avec des conditions opératoires précises : le ballon doit être immergé dans un bain marie à une température de 90°C, avec une vitesse de rotation de 90 tours/min. La solution est évaporée jusqu'à obtenir un extrait d'une masse finale d'environ exactement 0,92 g. Environ 8 mL de méthanol sont ajoutés afin de permettre une meilleure reprise de l'extrait qui est transféré dans une fiole jaugée de 10,0 mL. La fiole est complétée avec du méthanol jusqu'au trait de jauge. La solution est filtrée sur une membrane de porosité 0,45 µm, avant injection en UHPLC-UV.

## **B. Techniques chromatographiques**

### **1. Méthode de séparation**

Pour réaliser l'identification et la quantification des trois acides β-boswelliques dans la matière première et le CCAP®, il a été choisi de travailler sur un système chromatographique de type UHPLC-ultimate 3000 (Dionex - Thermo Scientific).

**Le composé B1 respecte un protocole différent de celui de C1 et C2 mais dans chacun des deux cas, le même protocole de séparation est utilisé pour tous les échantillons : témoins, encens, CCAP®.**

### *a) Cas de C1 et C2*

La monographie de la Pharmacopée Européenne utilise l'HPLC à polarité de phases inversées pour la séparation des formes cétoniques des acides β-boswelliques. **Je me place donc dans les mêmes conditions analytiques.**

Une colonne Synchronis® C18 (Thermo scientific) en acier inoxydable d'une longueur de 25 cm et d'un diamètre interne de 4,6 mm est utilisée. La colonne est placée dans une enceinte thermostatée à 28°C. La phase stationnaire est composée de billes de silice modifiées chimiquement par greffage de résidus octadécyliques (C18) sur les groupes silanols. La granulométrie de la phase stationnaire est de 5 µm. Dans ce travail, la phase mobile binaire est composée de proportions variables d'ACN (phase B) et d'eau (phase A), tous de qualité HPLC, plaçant la méthode en mode gradient. De manière à améliorer la résolution des signaux correspondant aux composés, un ajout d'acide phosphorique dans des proportions de 0,1 % est réalisé dans les deux phases mobiles. Les temps d'analyses de ce travail sont compris entre 20 et 30 min et la pression varie de 100 à 150 bars. Il est décidé de travailler avec un débit de 1 mL/min. Les données du gradient sont résumées dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Données du gradient de la monographie de l'encens selon la Pharmacopée Européenne

| Intervalle (min) | Phase mobile A (% V : V) | Phase mobile B (% V : V) |
|------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0-12,5           | 16 à 6                   | 84 à 94                  |
| 12,5-13,5        | 6 à 0                    | 94 à 100                 |
| 13,5-28          | 0                        | 100                      |

Cas particulier de la résine d'encens : d'autres paramètres chromatographiques ont été testés afin d'optimiser la résolution du composé C2. Il s'agit d'une élution en mode isocratique dans des proportions de phase mobile ACN/Eau (60/40 V : V).

**b) Cas de B1**

**(1) Protocole de la publication de 2014 [96]**

Une colonne Kinetex® phenylhexyle (Phenomenex) en acier inoxydable d'une longueur de 10 cm et d'un diamètre interne de 3 mm est utilisée. La colonne est placée dans une enceinte thermostatée à 35°C. La phase stationnaire est composée de billes de silice modifiées chimiquement par greffage de résidus phenylhexyles sur les groupes silanols. La granulométrie de la phase stationnaire est de 2,6 µm. Dans ce travail, la phase mobile binaire est composée de proportions variables d'ACN et d'eau, tous deux de qualité HPLC, plaçant la méthode en mode gradient. De manière à améliorer la résolution des signaux correspondant aux composés, un ajout d'acide phosphorique dans des proportions de 0,1 % est réalisé dans les deux phases mobiles, permettant ainsi de les tamponner. Le temps d'analyse de ce travail est de 20 min et la pression est de 400 bars. Il est décidé de travailler avec un débit de 0,6 mL/min. Les données du gradient sont résumées dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Données du gradient de la publication de 2014 [96]

| Intervalle (min) | Phase mobile A (% V : V) | Phase mobile B (% V : V) |
|------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0-0,5            | 50                       | 50                       |
| 0,5-4,5          | 50 à 0                   | 50 à 100                 |
| 4,5-15           | 0                        | 100                      |
| 15-17            | 0 à 50                   | 100 à 50                 |
| 17-20            | 50                       | 50                       |

## (2) Optimisation de la méthode d'analyse

Afin d'optimiser la méthode d'analyse de l'acide  $\beta$ -boswellique (B1), le mode d'élution gradient est remplacé par l'isocratique, avec une phase mobile binaire composée de proportions fixes d'ACN/Eau (60/40 V : V), tous de qualité HPLC. De manière à améliorer la résolution des composés, un ajout d'acide phosphorique dans des proportions de 0,1 % est réalisé dans les deux phases mobiles. Les temps d'analyses sont inférieurs à 10 min et la pression est d'environ 400 bars. Il est décidé de travailler avec un débit de 0,8 mL /min.

## 2. Mode de détection

La détection UV est une méthode de détection rapide, reproductible, sensible et non destructive. Les longueurs d'onde ont été choisies à l'aide de l'étude bibliographique réalisée précédemment et en s'appuyant sur les caractères physico-chimiques des différentes molécules.

Les données sont acquises via le logiciel Chromeleon® version 6.8 qui les transforme en résultats directement utilisables : intégration des pics, tracés de la courbe d'étalonnage, calcul de l'équation de la droite, du coefficient de corrélation, exactitude des contrôles rendue en pourcentage de déviation, calculs de la concentration des échantillons testés.

### a) Cas de C1 et C2

#### (1) Selon le protocole de la Pharmacopée Européenne

D'après la monographie de la Pharmacopée Européenne, la détection de C1 et de C2 s'effectue à la longueur d'onde de 250 nm puisque ces composés possèdent au niveau du C<sub>11</sub> une double liaison C=O spécifique conjuguée à une double liaison C=C intracyclique. La détection est donc fixée au départ à 250 nm, longueur d'onde à laquelle les composés possédant un noyau aromatique absorbent.

#### (2) Optimisation des paramètres de détection de C1

Le composé de référence C1 possède des groupements chromophores dont les longueurs d'onde d'absorption caractéristiques se situent dans le domaine ultraviolet entre 250 et 260 nm. En effet, le choix de la longueur d'onde d'excitation de chaque type de composés se porte généralement sur celle correspondant à l'absorption maximale observée sur le spectre UV et à laquelle les autres composés du mélange absorbent le moins. Pour évaluer et confirmer le maximum d'absorption de C1, sa détection est testée à différentes longueurs d'onde : 250, 252, 254, 256, 258 et 260 nm.

### *b) Cas de B1*

#### (1) Selon le protocole de la publication de 2014 [96]

D'après l'étude bibliographique réalisée précédemment et la publication de 2014, la détection de B1 s'effectue à la longueur d'onde de 210 nm, longueur d'onde à laquelle beaucoup de composés absorbent.

#### (2) Optimisation des paramètres de détection

Le composé B1 possède des groupements chromophores dont les longueurs d'onde d'absorption caractéristiques se situent dans le domaine ultraviolet vers 210 nm. Pour évaluer et confirmer le maximum d'absorption de B1, sa détection est testée à différentes longueurs d'onde : 208, 210 et 212 nm.

### 3. Validation de la méthode de dosage de C1 et C2

Il est important d'utiliser une méthode analytique validée pour obtenir des résultats fiables. Dans l'étude du CCAP®, les critères de validation retenus comprennent la linéarité, la spécificité, l'exactitude, la fidélité et la répétabilité inter-journalière. Cette validation a pour but de démontrer la fiabilité et reproductibilité des résultats.

#### *a) Linéarité, spécificité*

**La linéarité** d'une procédure analytique est sa capacité, à l'intérieur d'un intervalle de concentrations donné, à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration de la substance présente dans l'échantillon.

**La spécificité** correspond à la capacité de la méthode de dosage à donner un signal spécifique du composé à analyser. Autrement dit, la méthode est dite spécifique lorsqu'elle rend un résultat nul pour un échantillon ne contenant pas la molécule à analyser.

Afin de vérifier que la méthode est linéaire et spécifique, il est nécessaire d'effectuer un contrôle statistique sur les résultats obtenus à partir d'une gamme d'étalonnage.

**La gamme d'étalonnage** doit être composée d'au moins 5 points et d'un blanc (matrice dépourvue de l'analite). Ceci correspond au nombre minimal de points suffisant pour définir la relation entre la concentration de la molécule dans la matrice et la réponse correspondante du détecteur. Pour qu'une gamme soit valide, il faut que :

- ♣ L'ordonnée à l'origine soit non statistiquement différente de 0 : la méthode est alors spécifique.



- ♣ La pente de la droite de régression tracée à partir des points de gamme soit statistiquement différente de 0 : la méthode est alors linéaire.

Pour tester ces deux paramètres de validation de méthode, les solutions stock de C1 et C2 de concentrations différentes sont prélevées et placées dans un vial. Pour créer la gamme d'étalonnage, différents volumes des solutions stock de C1 et C2 sont injectés en UHPLC-UV : 10, 15, 20, 25 et 30  $\mu\text{L}$ . Ces volumes correspondent donc aux masses théoriques injectées (Tableaux 20 et 21).

Tableau 20 : Gamme d'étalonnage - C1

|  |   |       |       |       |       |       |
|--|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>Volume injectés (<math>\mu\text{L}</math>)</b>          | 0 | 10    | 15    | 20    | 25    | 30    |
| <b>Masse injectée théorique (<math>\mu\text{g}</math>)</b> | 0 | 0,148 | 0,222 | 0,296 | 0,370 | 0,444 |

Tableau 21 : Gamme d'étalonnage - C2

|  |   |       |       |       |       |       |
|--|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>Volume injectés (<math>\mu\text{L}</math>)</b>          | 0 | 10    | 15    | 20    | 25    | 30    |
| <b>Masse injectée théorique (<math>\mu\text{g}</math>)</b> | 0 | 0,070 | 0,105 | 0,140 | 0,175 | 0,210 |

### *b) Exactitude et fidélité*

L'**exactitude** d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur acceptée comme conventionnellement vraie c'est-à-dire la valeur de référence et la moyenne des valeurs trouvées. Elle est parfois appelée justesse. Les guides de validation recommandent d'évaluer l'exactitude sur un minimum de neuf déterminations avec au moins trois niveaux de concentration situés à l'intérieur de l'intervalle de validation de la méthode. Dans mon cas, trois concentrations seront répétées trois fois. L'étude statistique des résultats va permettre de vérifier l'exactitude de la méthode par le biais du taux de recouvrement qui représente le rapport entre la moyenne des concentrations estimées par le modèle mathématique et la teneur théorique.

La **fidélité** d'une procédure analytique est un terme général s'appliquant à la variabilité entre des essais répétés. Elle exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures obtenues à partir de plusieurs prises d'essai provenant d'un même échantillon homogène, dans les conditions prescrites. Les essais effectués sur des produits identiques, dans des circonstances présumées identiques, ne conduisent généralement pas à des résultats identiques. Cela est dû à l'existence d'erreurs à caractère aléatoire, inhérentes à toute méthode d'essai. La fidélité ou précision est évaluée à l'aide des CV% calculés à partir du rapport de l'écart-type et de la moyenne des résultats.

Dans ce travail, afin d'évaluer l'exactitude et la fidélité de la méthode, trois niveaux de contrôles sont utilisés pour C1 et C2 : un point bas de gamme (12  $\mu\text{L}$ ), un moyen de gamme (18  $\mu\text{L}$ ) et un haut de gamme (27  $\mu\text{L}$ ). Ils sont préparés à partir des solutions stocks et sont différents de ceux utilisés pour les points de gamme. Pour chaque volume, il existe une correspondance avec la masse injectée en  $\mu\text{g}$  (Tableaux 22 et 23). Chaque point est analysé cinq fois. Pour chacun d'entre eux, la concentration moyenne, l'écart type, le CV% et le taux de recouvrement sont déterminés. Ces deux derniers doivent être inférieurs à 15 % afin de prouver l'exactitude et la fidélité de la méthode. Les solutions de travail sont prélevées directement à partir des solutions stocks conservées à 4°C.

Tableau 22 : Exactitude et fidélité – C1

|  |       |       |       |
|--|-------|-------|-------|
| <b>Volume injecté (<math>\mu\text{L}</math>)</b>           | 12    | 18    | 27    |
| <b>Masse injectée Théorique (<math>\mu\text{g}</math>)</b> | 0,177 | 0,266 | 0,399 |

Tableau 23 : Exactitude et fidélité – C2

|  |       |       |       |
|--|-------|-------|-------|
| <b>Volume injecté (<math>\mu\text{L}</math>)</b>           | 12    | 18    | 27    |
| <b>Masse injectée Théorique (<math>\mu\text{g}</math>)</b> | 0,084 | 0,126 | 0,189 |

### c) Répétabilité inter-journalière

La répétabilité représente la mesure de la fidélité obtenue dans des conditions opératoires identiques et dans un court intervalle de temps (même analyte, même équipement, mêmes réactifs). Un minimum de cinq points répétés trois fois est recommandé pour la pertinence des résultats.

Dans ce travail, pour C1 et C2, l'étude de répétabilité inter-journalière est réalisée trois jours de suite à partir de l'échantillon ayant servi à obtenir la gamme d'étalonnage.

### 4. Rendement de l'étape de concentration par distillation/reprise

Une solution d'encens à 1 % est préparée selon le protocole de la Pharmacopée Européenne hormis la dernière étape de dilution qui est réalisée au 1/100<sup>ème</sup> et non au 1/50<sup>ème</sup>. Ainsi, les masses injectées sont dans l'intervalle de validation de la méthode de dosage. Cette solution est filtrée sur une membrane de porosité 0,45 µm puis analysée en UHPLC-UV.

Environ exactement 100 g de la solution d'encens sont chauffés à reflux pendant 10 min à 90°C afin d'obtenir un extrait d'environ exactement 0,09 g. Environ exactement 3 g de méthanol sont ajoutés à l'extrait sec. L'extrait est repris dans le méthanol puis re-dilué exactement avec le même facteur que celui de concentration de la solution d'encens. La nouvelle solution re-diluée est filtrée sur une membrane de porosité 0,45 µm et analysée en UHPLC-UV (Figure 18).



Figure 18 : Photographie de l'évaporateur rotatif

## 5. Dosage dans le CCAP®

### a) Cas de C1 et C2

Pour chaque composé, une gamme d'étalonnage est réalisée le même jour que celui du dosage de C1 et C2 dans le CCAP®, conformément au protocole cité dans le chapitre « Validation de la méthode de dosage ».

Environ exactement 100 g de CCAP® (lot CH 166) sont pesés sur une balance. La solution est chauffée à reflux pendant 20 min dans des conditions opératoires précises : le ballon doit être immergé dans un bain marie à une température de 90°C, avec une vitesse de rotation de 90 tours/min. La solution est évaporée jusqu'à obtenir un extrait d'une masse finale d'environ exactement 2 g. Environ exactement 3 g de méthanol sont ajoutés pour avoir une meilleure reprise de l'extrait. La solution est filtrée sur une membrane de porosité 0,45 µm, avant d'être injectée en UHPLC-UV.

### b) Cas de B1

La limite de détection (LOD) est la plus petite quantité ou concentration d'une substance à analyser qui puisse être détectée mais non suffisante pour pouvoir être quantifiée avec précision.

La détermination graphique est l'estimation de la LOD basée sur le rapport signal sur bruit. Il faut comparer la hauteur du pic d'intérêt au bruit de fond. Lorsque la concentration d'un échantillon avoisine la LOD, ce rapport est égal à 3.

Une solution stock de B1 à la concentration de 13 µg/mL a été diluée jusqu'à ce que la hauteur du pic obtenu avoisine 3 fois la valeur du bruit de fond. Cette solution a donc une concentration égale à la LOD.

En parallèle, la solution de CCAP® reprise dans le méthanol est filtrée sur une membrane de porosité 0,45 µm, avant injection en UHPLC-UV.

## V. Résultats

La présentation des résultats s'articule de la façon suivante. Tout d'abord, la méthode de préparation des témoins est développée, c'est-à-dire qu'un travail de sélection des meilleures conditions analytiques pour l'identification et la quantification des composés est mis en œuvre. Une fois tous ces paramètres optimisés, ils sont transposés sur la matière première puis sur le produit fini. Ensuite, la méthode de dosage est validée selon les normes ICH-Q8 pour enfin réaliser la quantification des trois composés dans le CCAP®. Les formes cétoniques des acides β-boswelliques (C1 et C2) sont étudiées en premier. B1 est donc analysé dans un deuxième temps selon un protocole distinct.

## A. Cas de C1 et C2

### 1. Développement de la méthode de préparation des témoins

#### a) Selon le protocole de la Pharmacopée Européenne

Une solution stock de C1 à la concentration de 14,80  $\mu\text{g/mL}$  et une solution stock de C2 à la concentration de 7  $\mu\text{g/mL}$  sont préparées conformément à la monographie de la Pharmacopée Européenne [14]. Ces deux solutions stocks sont obtenues par dissolution des témoins dans du méthanol puis reprise dans la phase mobile. Ainsi, les concentrations finales de la solution de C1 et C2 sont respectivement de 7,40  $\mu\text{g/mL}$  et de 3,5  $\mu\text{g/mL}$ . Les analyses du témoin sont réalisées avec une colonne Synchronis® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5  $\mu\text{m}$ ). La séparation a lieu avec les phases mobiles A ( $\text{H}_2\text{O}$  tamponnée) et B (ACN) en mode gradient en augmentant la proportion d'ACN de 84 % à 100 % en 13,5 min puis un palier à 100 % de phase B pendant 14,5 min avec un débit de 1 mL/min. Les témoins sont injectés en UHPLC-UV à 250 nm, ce qui permet d'obtenir les chromatogrammes des Figures 19 et 20.

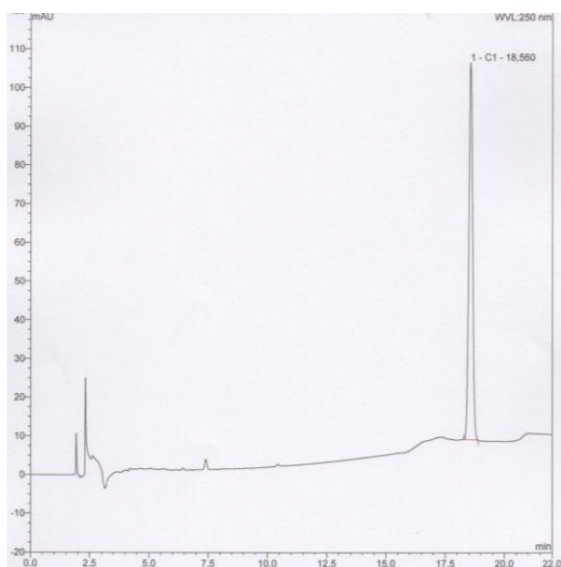


Figure 19 : Chromatogramme de la solution stock de C1

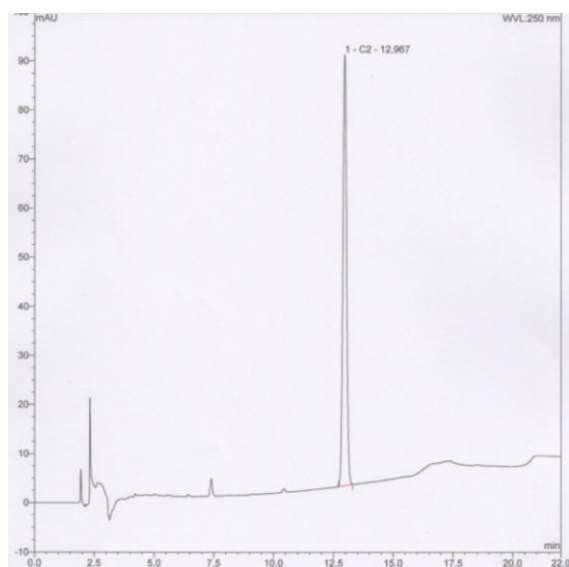


Figure 20 : Chromatogramme de la solution stock de C2

C1 et C2 sont élués respectivement à 18,560 et 12,967 min. Les deux pics semblent symétriques et suffisamment retenus. Les données chiffrées sont présentées dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Paramètres chromatographiques de C1 et C2

| Composé | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | Facteur de rétention (k') | Facteur de symétrie (As) |
|---------|------------------|---------------|---------------------------|--------------------------|
| C1      | 18,071           | 97,344        | 8,27                      | 1,04                     |
| C2      | 15,798           | 87,825        | 5,48                      | 1,03                     |

Les résultats bruts permettent de confirmer que les deux composés sont bien retenus ( $k' > 2$ ) et les pics sont symétriques ( $As \approx 1$ ). En revanche, la sensibilité de la méthode pourrait être améliorée afin de se situer à des concentrations supérieures à la limite de détection et quantification dans le CCAP®.

Pour observer la séparation du mélange des deux composés, une solution fille préparée par dilution au demi des solutions stocks de C1 et C2 est préparée. Ainsi, les concentrations finales de C1 et C2 sont respectivement de 3,70  $\mu\text{g/mL}$  et de 1,75  $\mu\text{g/mL}$ . Une bonne séparation est attendue puisque les deux composés enregistrés séparément sont élués à plusieurs minutes d'intervalle. Le chromatogramme de la Figure 21 est obtenu dont les paramètres de séparation sont décrits dans le Tableau 25.

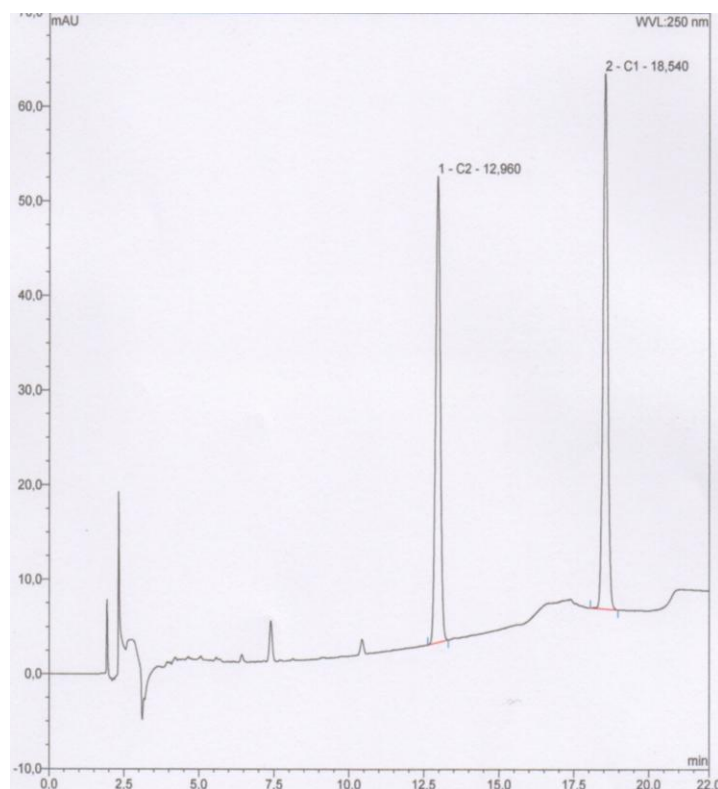


Figure 21 : Chromatogramme de la solution fille C1 et C2

Tableau 25 : Paramètres de séparation de C1 et C2 dans la solution fille

| Composé | Facteur de rétention (k') | Sélectivité ( $\alpha$ ) | Efficacité (N) | Résolution (Rs) | Facteur de symétrie (As) |
|---------|---------------------------|--------------------------|----------------|-----------------|--------------------------|
| C1      | 8,27                      | 1,42                     | 66 627         | 19,64           | 1,04                     |
| C2      | 5,48                      |                          | 33 980         |                 | 1,03                     |

D'après le chromatogramme, nous observons que les pics sont bien séparés. Les résultats sont satisfaisants concernant la séparation des deux pics ( $k'$ ,  $\alpha$ , As, Rs). Par exemple, leur résolution est bonne car elle est supérieure à 1,5. **En revanche, le facteur limitant de cette méthode d'analyse est sa sensibilité. En effet, en utilisant le protocole de la monographie, la hauteur et l'aire des pics correspondants à C1 et C2 sont plus faibles que dans le cas des solutions stocks de départ (Figures 19 et 20), ceci s'expliquant en partie par le fait qu'il existe une étape de dilution (Figure 21). L'application de la monographie n'est donc pas transposable sur le CCAP® car de par son process de fabrication, de très faibles concentrations y sont attendues. Le solvant de reprise utilisé est différent de celui retrouvé dans le CCAP® (éthanol 33 %), ce qui ajoute une difficulté supplémentaire.**

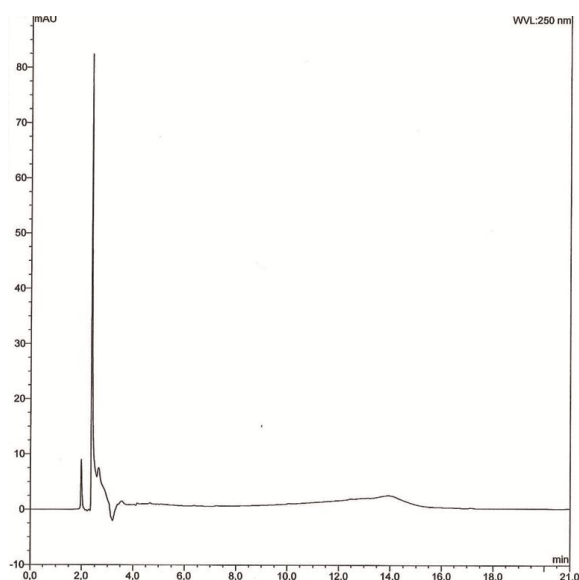


Figure 22 : Blanc méthanol

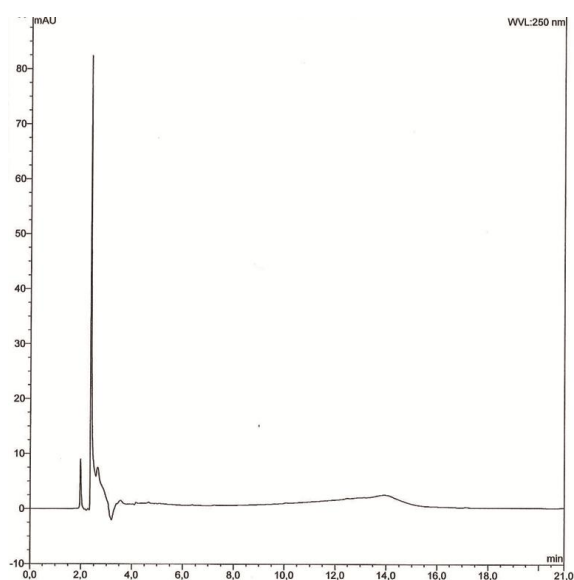


Figure 23 : Blanc phase mobile

Il est important d'effectuer un contrôle sur les blancs avant de passer à l'optimisation de la méthode. Deux blancs contenant uniquement les solvants utilisés lors de la préparation des solutions stocks (soit méthanol, soit phase mobile) sont ainsi passés dans le système chromatographique (Figures 22 et 23). Aucun pic n'est retrouvé après le volume mort démontrant que ces deux solvants n'absorbent pas à la longueur d'onde de 250 nm et qu'il n'y a pas de contamination du matériel.

### *b) Optimisation des paramètres analytiques*

Certaines étapes de la méthode de préparation des échantillons ou de la méthode de dosage pourraient être améliorées afin de gagner en sensibilité. Etant donné la faible quantité de témoins disponible au Laboratoire Pionneau, l'optimisation des paramètres analytiques n'est réalisée que sur C1, composé majoritaire de la résine d'encens par rapport à C2.

#### *(1) Longueur d'onde de détection pour C1*

Le maximum d'absorption de C1 et C2 se situe entre 250 et 260 nm. Pour être dans les meilleures conditions analytiques, C1 est testé à ces différentes longueurs d'onde avec une fenêtre de 2 nm.

Les analyses en UHPLC-UV de la substance de référence C1 sont inspirées du protocole de la Pharmacopée Européenne, réalisées avec une colonne Synchronis® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm). La séparation a lieu avec les phases mobiles A (H<sub>2</sub>O tamponnée) et B (ACN) en mode gradient en augmentant la proportion d'ACN de 84 % à 100 % en 13,5 min puis un palier à 100 % de phase B pendant 14,5 min avec un débit de 1 mL/min.

La Figure 24 représente les superpositions des chromatogrammes aux différentes longueurs d'onde, dont les paramètres sont résumés dans le Tableau 26.

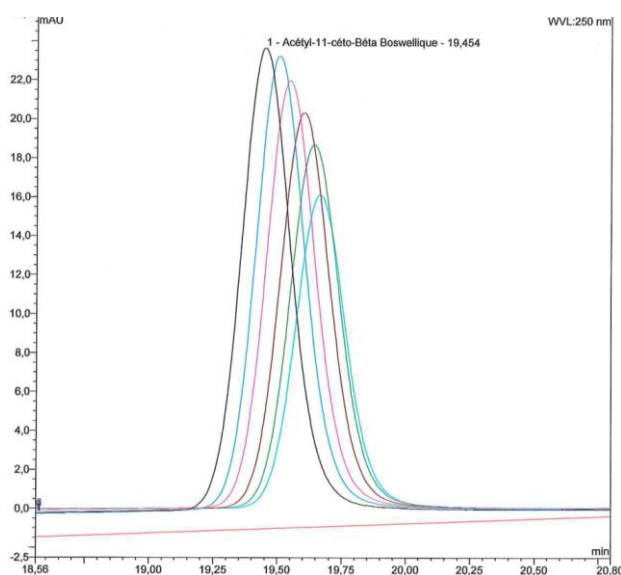


Figure 24 : Chromatogrammes de C1 à différentes longueurs d'onde. De gauche à droite : 250, 252, 254, 256, 258 et 260 nm



Tableau 26 : Paramètres chromatographiques de C1 à différentes longueurs d'onde

| Longueur d'onde (nm) | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | As   |
|----------------------|------------------|---------------|------|
| 250                  | 5,446            | 23,617        | 1,08 |
| 252                  | 5,326            | 23,144        | 1,09 |
| 254                  | 4,989            | 21,765        | 1,08 |
| 256                  | 4,636            | 20,129        | 1,09 |
| 258                  | 4,214            | 18,422        | 1,07 |
| 260                  | 3,552            | 15,718        | 1,07 |

D'après les données du chromatogramme, la hauteur du pic la plus importante est retrouvée à la longueur d'onde de 250 nm. Les données du tableau révèlent que lorsque la longueur d'onde varie de 250 nm à 260 nm, la hauteur et l'aire des pics diminuent d'environ 34 %, avec un maximum d'absorption de C1 à 250 nm, longueur d'onde retenue d'après cette expérience. Ce choix est conforté par la monographie de la Pharmacopée Européenne.

La symétrie des pics implique l'absence de phénomènes de rétention multiples ou de volumes morts trop importants, ce qui permet de faciliter les intégrations des chromatogrammes ou encore d'obtenir de bonnes résolutions.

**Ainsi, la longueur d'onde est dorénavant fixée à 250 nm.**

## (2) Choix du solvant d'injection

### (a) Comparaison Méthanol – Phase mobile

D'après le protocole de la Pharmacopée Européenne, les témoins sont solubilisés dans un premier temps avec du méthanol puis dilués dans la phase mobile. Pour que les pics soient fins, symétriques et bien résolus, il faut que le solvant de reprise ait une composition la plus proche possible de la phase mobile, ce qui explique la dernière étape du protocole.

Cette dilution finale est un problème pour l'identification et le dosage des formes cétoniques des acides  $\beta$ -boswelliques dans le CCAP<sup>®</sup> car leur concentration attendue est très faible. Pour s'affranchir de cette dernière étape, C1 est testé dans deux solvants différents : le méthanol et la phase mobile. Cette expérience a pour but de mettre ou non en évidence une variation dans les chromatogrammes et les paramètres correspondants avec les deux solvants (Figure 25 et Tableau 27).

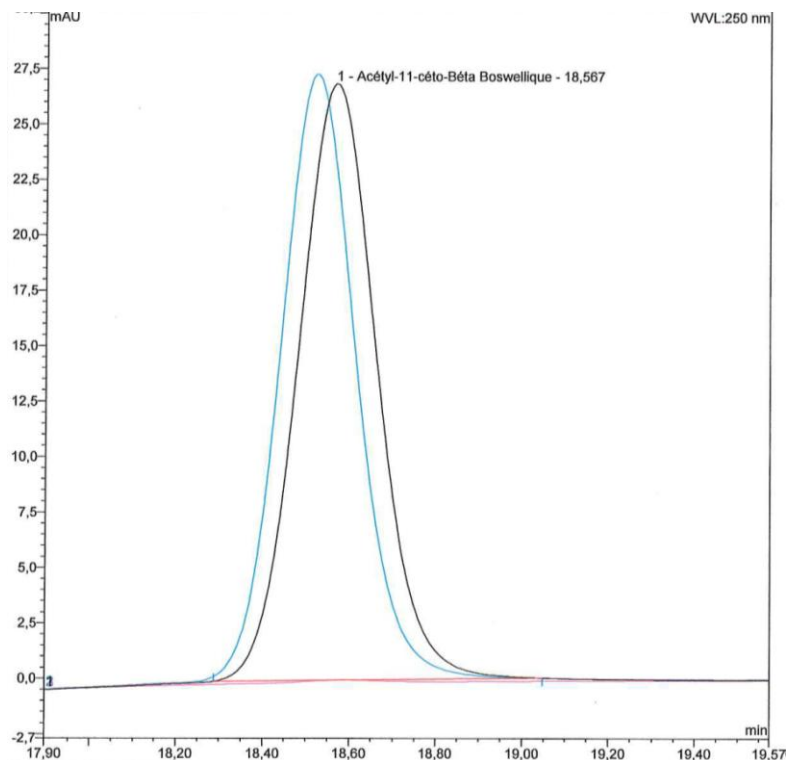


Figure 25 : Chromatogrammes de C1 dissous dans du méthanol (en bleu) ou dans la phase mobile (en noir)

Tableau 27 : chromatographiques de C1 à 250 nm, dissous dans du méthanol ou dans la phase mobile

| Solvant      | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | As   |
|--------------|------------------|---------------|------|
| Méthanol     | 5,697            | 27,441        | 1,07 |
| Phase mobile | 5,508            | 27,322        | 1,11 |

L'aire et la hauteur du pic correspondant à C1 sont quasiment identiques avec les deux solvants.

**Il est donc choisi de reprendre le témoin C1 dans du méthanol afin d'éviter l'étape de dilution et donc une perte de sensibilité de la méthode.**

*(b) Comparaison Méthanol – Ethanol 33%*

Afin d'être dans des conditions comparables entre le passage en UHPLC-UV des témoins et du CCAP®, C1 et C2 doivent être dissous dans le même solvant. Actuellement, le méthanol est sélectionné. Or, le CCAP® est constitué d'éthanol 33 % (V : V), non comparable avec le méthanol sans démonstration préalable. Il faut donc comparer les chromatogrammes (Figure 26) après passage de deux solutions stocks de C1, obtenues par dissolution soit dans du méthanol, soit dans de l'éthanol 33 % (V : V).

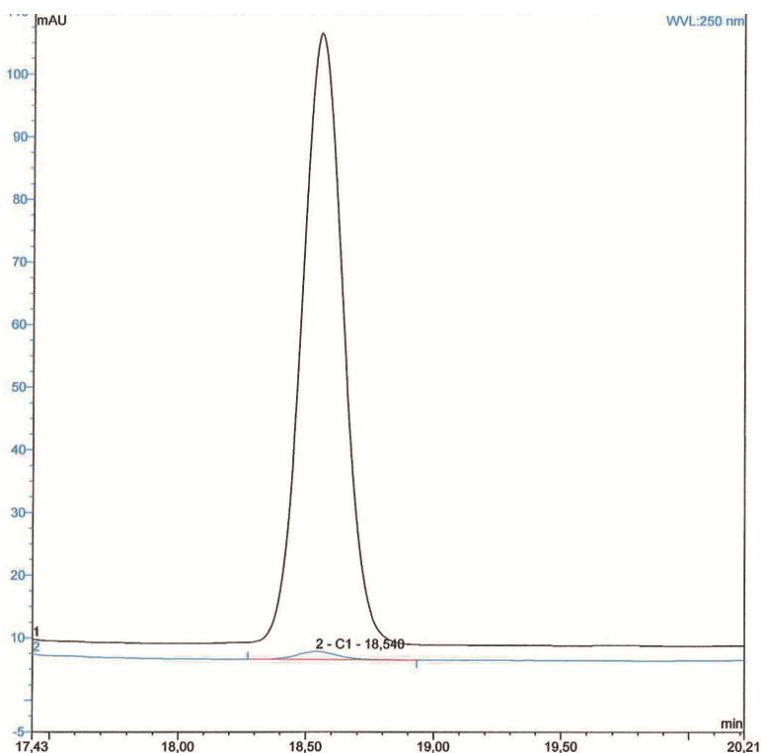


Figure 26 : Chromatogrammes de C1 dissous dans du méthanol (en noir) ou dans de l'éthanol 33 % (en bleu)

La superposition de ces deux chromatogrammes montre que les aires sont complètement différentes. **La méthode utilisant l'éthanol 33 % (V : V) n'est donc pas comparable à celle utilisant le méthanol.** Sans doute, la perte de sensibilité dans le cas de l'éthanol 33 % (V : V) serait due à une moins bonne solubilité de C1 dans ce solvant, ce qui était prévisible au vu de la structure chimique apolaire de ce triterpène.

**Pour rester le plus proche possible du protocole de la Pharmacopée Européenne et dans un souci d'économie des témoins et de perte conséquente de sensibilité, le méthanol est sélectionné. Pour rester comparable aux témoins, le CCAP® devra subir une étape d'évaporation/reprise avant injection dans la colonne chromatographique.**

*c) Selon le protocole optimisé*

Les conditions analytiques précédemment optimisées pour C1 sont appliquées à la solution fille contenant un mélange de C1 et C2 (Figure 27).

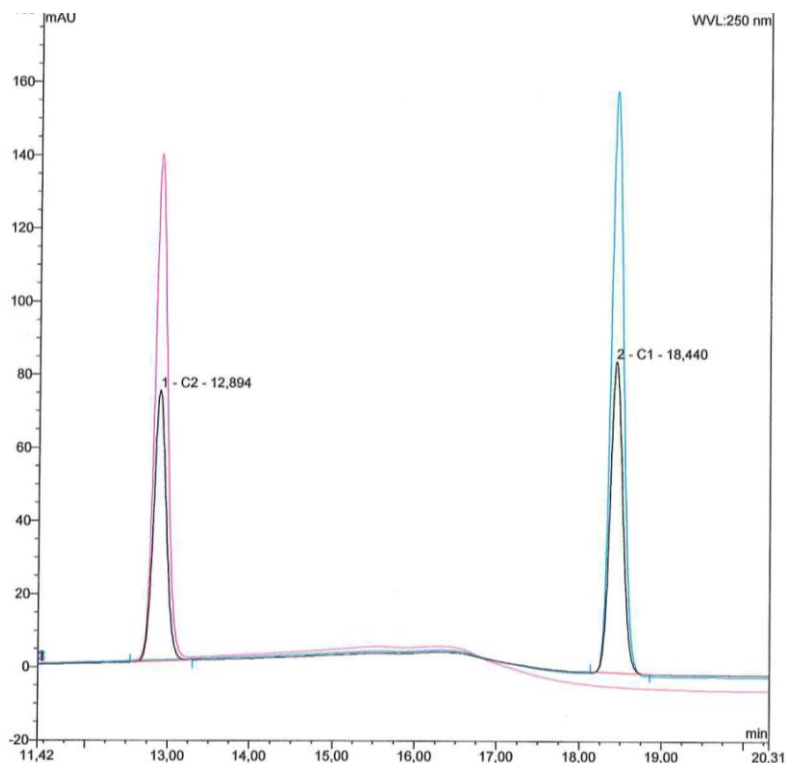


Figure 27 : Chromatogrammes de la solution stock de C2 (en rose), la solution stock de C1 (en bleu), la solution fille de C1 + C2 (en noir) en UHPLC-UV à 250 nm

La monographie de l'encens donne l'ordre d'éluion des composés : C2 et C1 sortent avec des  $t_r$  d'environ 8 et 12 min respectivement. Dans ce travail, les composés identifiés apparaissent dans le même ordre à 12,9 min et à 18,5 min, traduisant un temps d'analyse plus long.

L'identification de C1 et C2 en mélange a pu être confirmée en superposant les chromatogrammes des témoins obtenus de façon isolée (Figure 27). **Les chromatogrammes relèvent un ordre d'éluion inchangé avec des temps de rétention identiques.** L'absence de pics donnés par un blanc contenant uniquement du méthanol confirme qu'il n'y a pas de contamination du matériel (chromatogramme non montré).

Pour valider une bonne séparation entre deux pics, les paramètres à vérifier sont le facteur de rétention, la sélectivité, la résolution et l'efficacité (Tableau 28).

Tableau 28 : Paramètres de séparation de C1 et C2 issus de l'injection en UHPLC-UV à 250 nm

| Caractères analytiques | k'   | A    | N      | Rs    | As   |
|------------------------|------|------|--------|-------|------|
| C1                     | 8,22 | 1,42 | 66 613 | 19,65 | 1,05 |
| C2                     | 5,45 |      | 33 987 |       | 1,03 |

Les deux pics sont symétriques ( $A_s \approx 1$ ) et bien résolus ( $R_s > 1,5$ ). De plus, ils sortent loin du volume mort avec un temps d'analyse acceptable ( $2 < k' < 10$ ).

**La suppression de l'étape de dilution dans la phase mobile permet donc de gagner en sensibilité sans modifier la séparation des composés.**

## 2. Développement de la méthode de préparation de la matière première : l'encens

L'extraction des deux molécules triterpéniques du reste de la matrice constitue une étape importante pour pouvoir les analyser qualitativement et quantitativement. La qualité de l'analyte dépend fortement du protocole d'extraction employé et du choix du solvant utilisé. Les objectifs de ce travail sont de confirmer la présence des composés C1 et C2 dans la matière première, de comparer la méthode d'extraction telle que décrite dans la Pharmacopée Européenne à celle correspondant au dossier d'AMM du CCAP®, afin de prédire et d'expliquer les résultats des dosages de C1 et C2 dans le produit fini.

### a) Selon la Pharmacopée Européenne

Rappelons que les résines brutes sont finement broyées puis subissent une extraction de 10 min dans du méthanol à l'aide d'un bac à ultrasons. Les ultrasons sont fréquemment utilisés pour optimiser l'extraction des triterpènes à partir des résines naturelles [97 - 99]. Ils permettent de diminuer de façon significative la durée de cette étape par rapport aux autres techniques utilisant le chauffage à reflux, par exemple. Le méthanol est connu pour extraire et dissoudre la partie terpénique des matériaux résineux [97 - 99], en laissant précipiter la fraction non terpénique.

Les protocoles de séparation et de détection sont les mêmes que pour ceux des témoins. Les résultats obtenus par UHPLC-UV de l'oléo-gommo-résine d'encens sont rassemblés dans la Figure 28 et le Tableau 29.

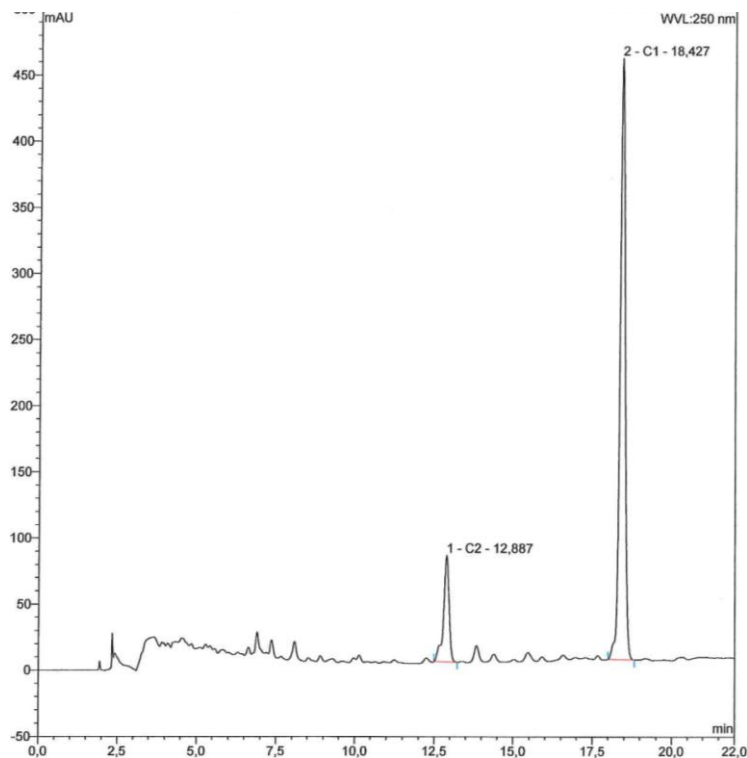


Figure 28 : Chromatogramme d'une solution d'encens extraite selon le protocole de la Pharmacopée Européenne

Tableau 29 : Paramètres de séparation de C1 et C2 dans la matière première

| Caractères analytiques | $k'$ | $\alpha$ | N      | $R_s$ | As   |
|------------------------|------|----------|--------|-------|------|
| C1                     | 8,55 | 1,42     | 65 734 | 19,42 | 1,01 |
| C2                     | 5,65 |          | 32 793 |       | 0,79 |

Deux pics majoritaires apparaissent aux  $t_r$  12,89 et 18,43 min. Ils sortent aux mêmes moments que C2 et C1 dans les solutions stocks, supposant qu'il s'agit bien de ces molécules. De plus, les paramètres de rétention et séparation de C1 et C2 dans l'encens sont les mêmes que dans les témoins, confirmant leur présence dans la matière première. Pour s'assurer que ces deux pics correspondent aux composés d'intérêt, quelques milligrammes de la poudre des témoins sont rajoutés à l'extrait d'encens, qui est alors réinjecté en UHPLC-UV. Une augmentation isolée de la hauteur et de l'aire des deux pics est notée, confirmant leur identité (chromatogramme non montré).

Il est à noter que le composé C2 est moins bien élué dans l'encens que dans le témoin. L'As d'environ 0,8 traduit un retard de rétention du composé représenté par un épaulement en début du pic, ou encore une possible co-élution de deux composés au même temps de rétention. Cette dernière hypothèse est tout à fait envisageable puisque l'échantillon est complexe et impur. Pour la vérifier, le mode d'élué et la composition de la phase mobile sont modifiés au profit de l'isocratique. Les deux chromatogrammes de la Figure 29 comparent le pic correspondant au composé C2 dans les deux conditions : mode gradient et isocratique.

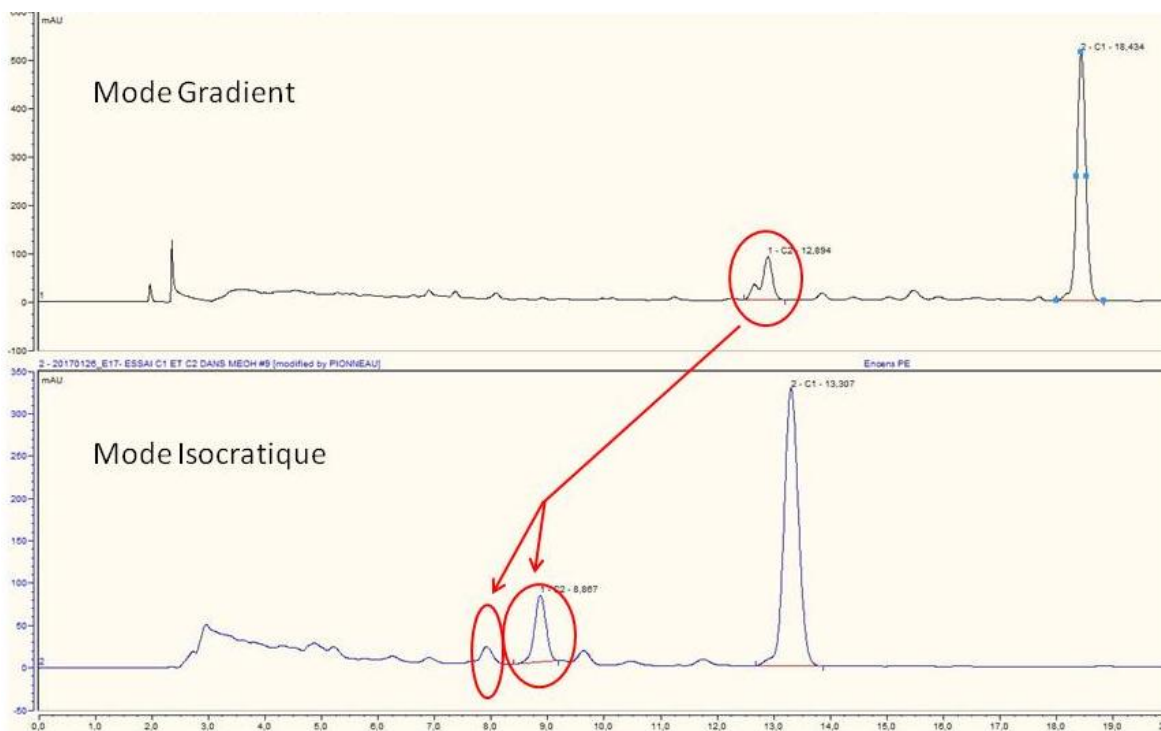


Figure 29 : Chromatogrammes de la solution d'encens en mode gradient (en haut) ou isocratique (en bas)

Nous pouvons observer que l'épaulement disparaît en mode isocratique, alors qu'apparaît un nouveau pic, confirmant que le mode gradient tel que décrit dans la Pharmacopée Européenne ne permet pas de séparer correctement le composé C2 des autres composés de la résine d'encens. Les données analytiques de C1 et C2 présentées dans le Tableau 30 ne concernent que les conditions en mode gradient.

Tableau 30 : Proportions de C1 et C2 dans la résine d'encens

| Caractères analytiques | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | Aire relative (%) |
|------------------------|------------------|---------------|-------------------|
| C1                     | 85,016           | 455,080       | 83,88             |
| C2                     | 16,336           | 80,497        | 16,12             |

Le calcul du pourcentage d'aire relatif des deux composés est employé pour déterminer la proportion des deux formes cétoniques des acides  $\beta$ -boswelliques dans la résine d'encens. Il en ressort que C1 est 5 fois plus représenté que C2 dans la résine d'encens. Ce chiffre est une sous-estimation de la réalité puisque qu'il a été montré que C2 sort en même temps qu'un autre composé.

Les résultats sont toutefois cohérents et confortent l'étude bibliographique. En effet, pour *Boswellia serrata*, il est montré que C1 est environ 5 fois plus concentré que C2. A l'inverse, pour *Boswellia carterii*, C2 est environ 1,4 fois plus concentré que C1. L'excipient du CCAP<sup>®</sup> est un mélange de deux espèces, *Boswellia serrata* et *Boswellia carterii*. Selon ces nouvelles données, *Boswellia serrata* serait l'espèce la plus représentée dans la matière première.

### b) Dans le cadre de l'AMM

La méthode d'extraction du dossier d'AMM présente une particularité consistant en une macération dans de l'éthanol 33 % (V : V) pendant une longue période. Dans cette expérience, toutes les étapes de l'extraction sont similaires, seule la durée diffère du procédé de fabrication du CCAP<sup>®</sup> : elle est beaucoup plus courte. Après injection dans le système chromatographique, nous obtenons la Figure 30.

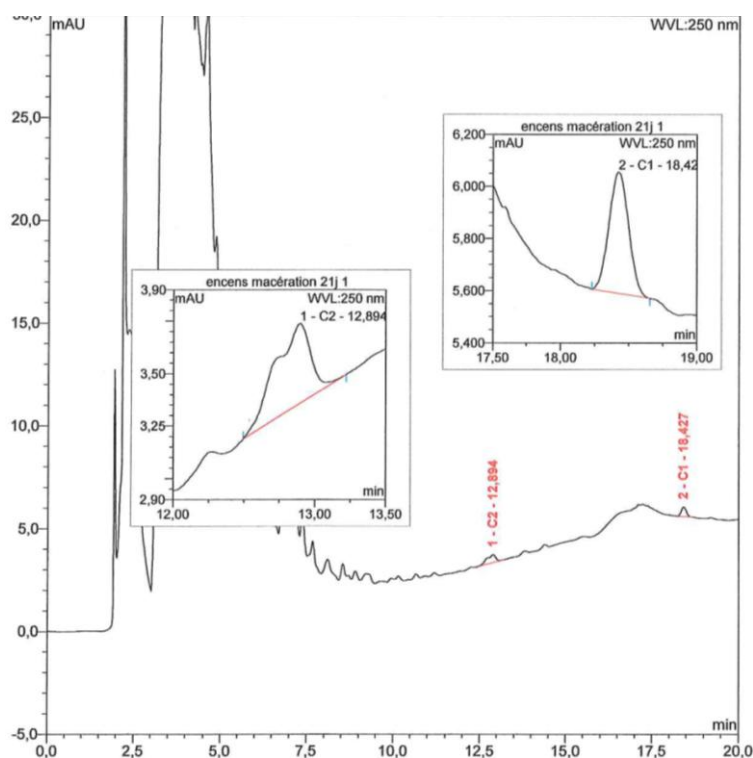


Figure 30 : Chromatogramme d'une solution d'encens préparée selon le protocole de l'AMM du CCAP<sup>®</sup>

Les  $t_r$  sélectionnés (12,9 min et 18,55 min) sont ceux correspondants à C2 et C1 respectivement. En revanche, nous remarquons que la hauteur des pics est beaucoup moins importante que précédemment dans le cas du méthanol.



Tableau 31 : Paramètres de séparation de C1 et C2 dans la matière première

| Caractères analytiques | k'   | $\alpha$ | N      | Rs    | As   |
|------------------------|------|----------|--------|-------|------|
| C1                     | 8,50 | 1,42     | 73 634 | 13,84 | 1,01 |
| C2                     | 5,65 |          | 9 471  |       | 0,77 |

D'après le Tableau 31, tous les paramètres de rétention sont les mêmes que lors de l'extraction par le méthanol, mais les paramètres de séparation sont modifiés (N chute pour C2 et Rs reste correcte pour C1 et C2). En revanche, une simple analyse révèle une énorme perte du signal donné par les deux composés, traduisant la difficulté de l'éthanol 33 % (V : V) à extraire C1 et C2 de la résine d'encens.

Tableau 32 : Données quantitatives de C1 et C2 dans la résine d'encens

| Caractères analytiques | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | Aire relative (%) |
|------------------------|------------------|---------------|-------------------|
| C1                     | 0,078            | 0,465         | 41,04             |
| C2                     | 0,112            | 0,381         | 58,96             |

Les données résumées dans le Tableau 32 révèlent que la hauteur des deux pics avoisine 0,5 mAU, ce qui les place quasiment dans le bruit de fond.

**Ainsi, l'éthanol 33 % (V : V) ne facilite pas l'extraction des composés C1 et C2 à partir de la résine d'encens. Or, cette expérience ne permet pas de prédire les résultats théoriquement obtenus dans le produit fini car lors du process de fabrication, l'encens est macéré pendant une période prolongée, condition non testée précédemment. C'est pourquoi un nouvel essai est réalisé avec de l'encens qui a macéré pendant le même temps de fabrication que le CCAP®. Le chromatogramme de la Figure 31 et les valeurs brutes correspondant aux deux composés sont détaillées dans le Tableau 33.**

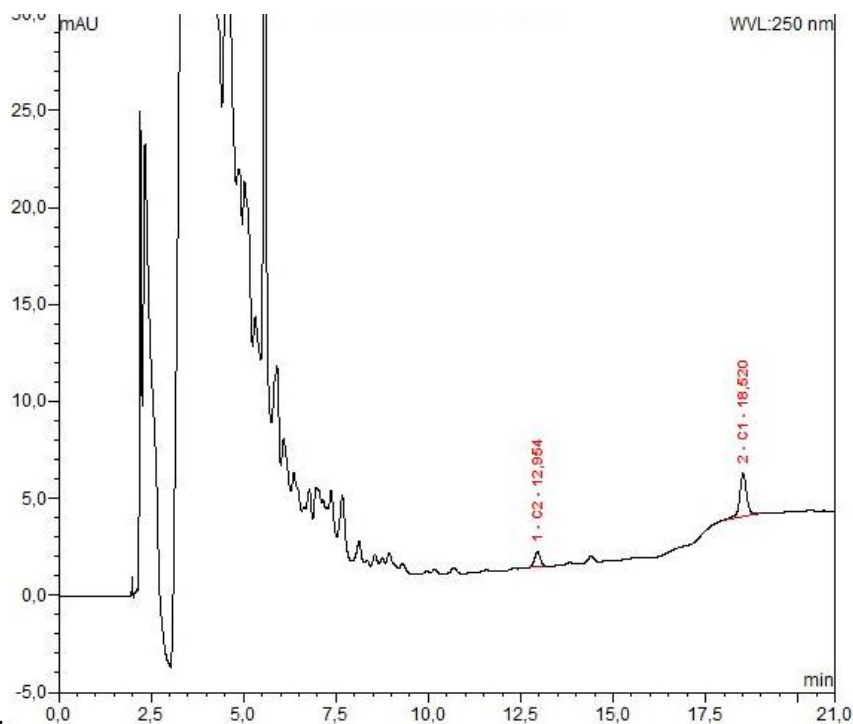


Figure 31 : Chromatogramme d'une solution d'encens macérée

Tableau 33 : Données quantitatives de C1 et C2 dans la résine d'encens

| Caractères analytiques | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | Aire relative (%) |
|------------------------|------------------|---------------|-------------------|
| C1                     | 0,477            | 2,212         | 77,31             |
| C2                     | 0,140            | 0,771         | 22,69             |

Les deux pics correspondant aux composés C1 et C2 sont quantitativement un peu plus importants que dans le cas précédent. **Le facteur temps pourrait donc intervenir favorablement dans le phénomène d'extraction des composés polyterpéniques de la résine d'encens. Les concentrations en formes cétoniques des acides  $\beta$ -boswelliques restent cependant très inférieures à celles retrouvées après extraction par le méthanol.**

A cela vient s'ajouter une autre donnée : tous les échantillons (témoins, encens macéré et CCAP®) sont filtrés avant injection dans la chaîne UHPLC-UV, afin de limiter le risque d'obstruction de la colonne par des impuretés. Il est donc important de vérifier que la molécule C1 n'est pas retenue sur le filtre, faussant ainsi potentiellement les résultats. Pour ce faire, un même échantillon d'encens est filtré trois fois successivement et entre chaque filtration, le filtrat obtenu est injecté en UHPLC-UV.

La Figure 32 représente les superpositions des chromatogrammes des différents filtrats, dont les données brutes sont détaillées et analysées dans le Tableau 34.

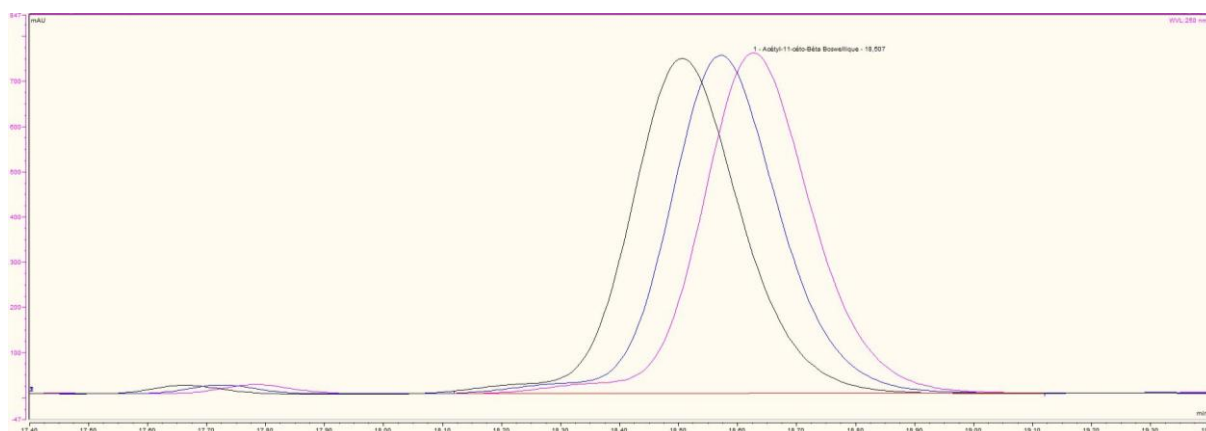


Figure 32 : Superposition des chromatogrammes représentant les pics de C1 suite à l'injection des trois filtrats

Tableau 34 : Données brutes et interprétation statistique des résultats obtenus par les trois filtrats

| N° de Filtration | Hauteur (mAU) | Aire (mAU x min) | Moyenne ( $\bar{m}$ ) | Ecart type ( $\sigma$ ) | Coefficient de variation (CV%) |
|------------------|---------------|------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Filtration 1     | 753,820       | 165,760          | 164,706               | 1,101                   | 0,669                          |
| Filtration 2     | 747,777       | 164,795          |                       |                         |                                |
| Filtration 3     | 742,736       | 163,563          |                       |                         |                                |

Les trois filtrats successifs sont de même hauteur et possèdent la même aire. Le coefficient de variation, inférieur à 15 %, démontre que le composé cétonique triterpénique C1 n'est pas retenu sur le filtre de façon significative. Par analogie structurale, nous pouvons supposer qu'il en serait de même pour C2.

Cette étude confirme la présence des deux formes cétoniques dans la matière première.

### 3. Développement de la méthode de préparation du CCAP®

Les étapes de préparation du CCAP® ont pour but de permettre de solubiliser C1 et C2 dans le méthanol, solvant sélectionné pour la préparation des solutions stocks et de faire en sorte qu'ils soient en concentration suffisante pour être dosés avec précision. Rappelons que C1 et C2 sont des marqueurs officiels de l'encens selon la Pharmacopée Européenne. Leur dosage avec précision est donc une étape importante du processus permettant de répondre aux Lignes Directrices du 19 mars 2015.

a) *CCAP® pur*

Le CCAP® pur est injecté en UHPLC-UV à 250 nm dans les mêmes conditions analytiques que les témoins. Les triterpènes apolaires, C1 et C2, sont identifiés par comparaison avec les résultats préalablement obtenus avec les témoins en vérifiant leur  $t_r$  et leur ordre d'éluion. Le chromatogramme et les données de séparation sont présentés dans la Figure 33 et le Tableau 35.

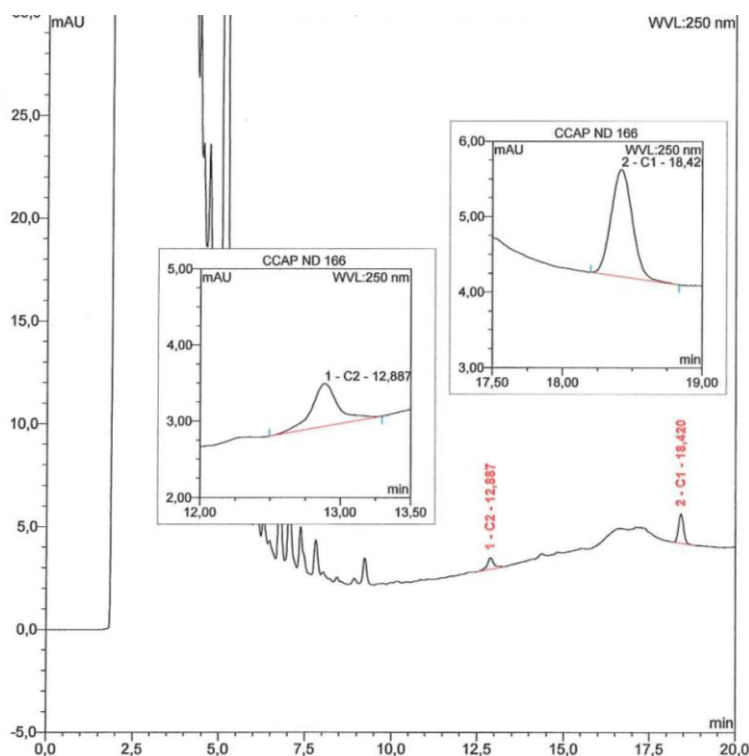


Figure 33 : Chromatogramme du CCAP® pur

Tableau 35 : Paramètres de séparation de C1 et C2 dans le CCAP® pur

| Caractères analytiques | $k'$ | $\alpha$ | N      | Rs    | As   |
|------------------------|------|----------|--------|-------|------|
| C1                     | 8,50 | 1,42     | 69 748 | 19,41 | 1,07 |
| C2                     | 5,64 |          | 31 040 |       | 1,07 |

Deux composés sont retrouvés aux  $t_r$  12,89 et 18,42 min. Leurs paramètres de rétention et de séparation sont identiques à ceux des témoins, confirmant que les deux pics retrouvés dans le CCAP® correspondent aux deux formes cétoniques. De plus, les facteurs de symétrie sont identiques à ceux

des témoins, ce qui montre l'absence du composé qui parasitait les résultats de C2 dans l'encens.

Tableau 36 : Données brutes correspondant à C1 et C2 dans le CCAP® pur

| Caractères analytiques | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | Aire relative (%) | Bruit de fond (BDF) |
|------------------------|------------------|---------------|-------------------|---------------------|
| C1                     | 0,227            | 1,308         | 78,60             | 0,302               |
| C2                     | 0,062            | 0,337         | 21,40             |                     |

Le Tableau 36 révèle que C1 est environ 4 fois plus représenté que C2 dans le CCAP® pur. De plus, en comparant la hauteur des pics donnés par les deux composés au BDF, il est à noter :

- ♣  $0,337 < 0,906$  donc la hauteur du pic correspondant à C2 est inférieure à 3 fois le BDF.

**La concentration en C2 dans le CCAP® est donc inférieure à la LOD**

- ♣  $0,906 < 1,308 < 3,02$  donc la hauteur du pic correspondant C1 est comprise entre 3 et 10 fois le BDF.

**La concentration en C1 dans le CCAP® est donc comprise entre la LOD et la LOQ**

Ces résultats mettent clairement en évidence que C1 et C2 ne sont pas suffisamment concentrés dans le CCAP® pur pour être dosés avec précision. Rappelons que ces deux composés sont dissous dans de l'éthanol 33 %, alors que les témoins sont retrouvés dans du méthanol. Il est donc nécessaire de changer le solvant et en même temps, de concentrer le CCAP® afin d'obtenir des concentrations suffisantes pour pouvoir être dosées avec précision.

### ***b) CCAP® concentré***

Le CCAP® subit une étape d'évaporation/reprise réalisée par chauffage à reflux afin de reprendre les formes cétoniques dans le méthanol et de les concentrer. Les conditions de travail sont retrouvées dans la partie « Matériels & Méthodes ». Les résultats sont donnés dans la Figure 34 et le Tableau 37.

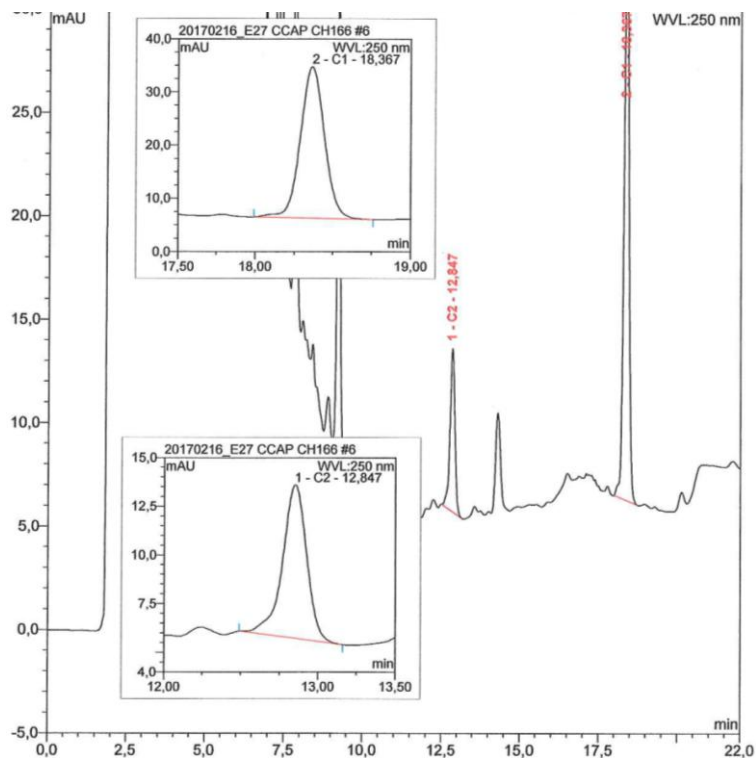


Figure 34 : Chromatogramme du CCAP® concentré

Tableau 37 : Paramètres de séparation de C1 et C2 dans le CCAP® concentré

| Caractères analytiques | k'   | N      | Rs    | As   |
|------------------------|------|--------|-------|------|
| C1                     | 8,47 | 68 282 | 19,41 | 1,03 |
| C2                     | 5,63 | 35 458 |       | 0,88 |

Les résultats confirment que le CCAP® a été concentré puisque les deux pics sont bien plus hauts que dans le cas du CCAP® pur (Figure 33). Les paramètres de rétention et séparation sont identiques à ceux des témoins, confirmant qu'il s'agit de C1 et C2. Le Tableau 38 résume les paramètres quantitatifs des pics correspondant aux deux formes cétoniques des acides  $\beta$ -boswelliques.

Tableau 38 : Données brutes correspondant à C1 et C2 dans le CCAP® concentré

| Caractères analytiques | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | Aire relative (%) | BDF   |
|------------------------|------------------|---------------|-------------------|-------|
| C1                     | 4,729            | 26,062        | 78,03             | 0,196 |
| C2                     | 1,332            | 7,314         | 21,97             |       |

En comparant la hauteur des deux pics au BDF, nous observons que  $26,062 > 7,314 > 1,96$  donc la hauteur des pics C1 et C2 est supérieure à 10 fois le BDF, ce qui les place à une concentration supérieure à la LOQ, permettant leur dosage avec précision.

Maintenant se pose la question de la répétabilité de la méthode de concentration. Comme il est possible de le voir sur les Figures 35, 36 et 37, **cette méthode semble permettre la récupération de la totalité du CCAP® présent au départ.**



Figure 35 : Photographie d'une fiole contenant le CCAP® avant distillation



Figure 36 : Photographie du ballon contenant l'extrait de CCAP® après distillation et avant reprise dans le méthanol

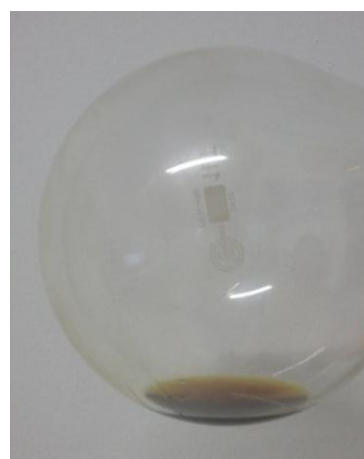


Figure 37 : Photographie du ballon contenant l'extrait de CCAP® après reprise dans le méthanol

#### 4. Validation de la méthode analytique

La méthode de dosage des deux formes cétoniques doit maintenant être validée selon les critères suivants : la linéarité, la spécificité, l'exactitude, la fidélité, la répétabilité inter-journalière et ce dans un intervalle de concentrations donné.

##### a) Linéarité/Spécificité

Afin de déterminer la linéarité et la spécificité de la méthode de dosage, deux gammes d'étalonnage différentes sont réalisées pour C1 et C2, chacune comportant cinq points et un blanc. Ces gammes sont réalisées par modification des volumes d'injection à partir de prélèvements dans une même solution stock. Cela permet d'injecter des quantités de matière différentes, en tenant compte uniquement des variations données par la méthode de dosage.

##### (1) C1

Le Tableau 39 contient les données brutes des points de gamme pour C1.

Tableau 39 : Données brutes des points de gamme injectés – C1

|                                      |       |       |       |       |       |        |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| <b>Volume injecté (µL)</b>           | 0     | 10    | 15    | 20    | 25    | 30     |
| <b>Masse injectée Théorique (µg)</b> | 0     | 0,148 | 0,222 | 0,296 | 0,370 | 0,444  |
| <b>Aire observée (mAU x min)</b>     | 0,023 | 3,515 | 5,391 | 7,233 | 9,126 | 10,956 |

- ♣ Détermination de l'équation de la droite de régression par la méthode des moindres carrés (Figure 38, Équations 7 et 8) :

Soient  $x_i$  les masses injectées théoriques et  $y_i$  les aires observées correspondantes. Il est supposé que les  $x_i$  sont connus de manière exacte. L'équation de la droite de régression se présente sous la forme  $y = ax + b$ .

Équation 7 : Pente de la droite de régression

$$a = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2}$$

Avec  $\bar{x} = 0,245$  et  $\bar{y} = 6,041$

Or,  $\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = 3,159$  et  $\sum(x_i - \bar{x})^2 = 0,128$

Donc  $a = 24,723$



Équation 8 : Ordonnée à l'origine de la droite de régression

$$b = \bar{y} - a\bar{x}$$

Donc  $b = -0,057$

Conclusion : l'équation de la droite de régression est  $y = 24,723x - 0,057$

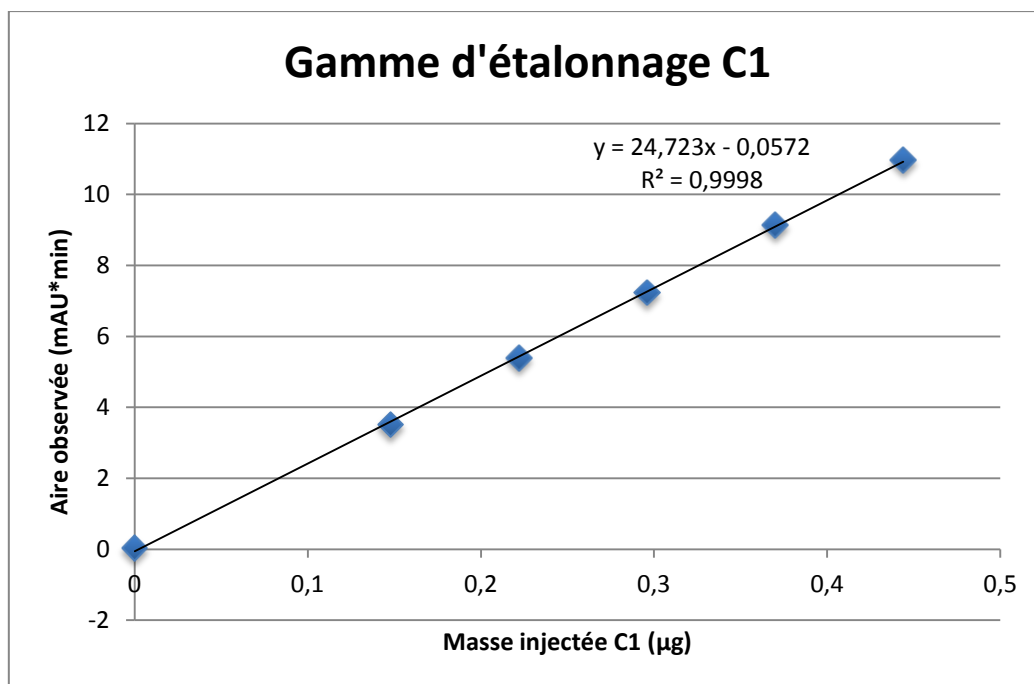


Figure 38 : Gamme d'étalonnage – C1

- ♣ Démonstration de la linéarité de la méthode ou « test d'indépendance linéaire » (Équations 9 – 12) :

Afin de démontrer la linéarité, plusieurs tests sont équivalents mais seul celui qui concerne la pente de la droite de régression est réalisé.

Soit  $\alpha$  la vraie pente de la droite de régression dans la population.

L'hypothèse ( $H_0$ ) est testée par : «  $\alpha = 0$  »

$\alpha$  est estimé par  $a$

L'échantillon est de taille  $N = 6$ , donc  $N < 30$

La normalité des distributions conditionnelles est supposée.

Un test  $t$  de Student est alors réalisé.

Équation 9 : Détermination  $t_{obs}(a)$ 

$$t_{obs}(a) = \frac{|a|}{s_a}$$

Avec :

Équation 10 : Détermination  $s_a$ 

$$s_a = \frac{\sqrt{\left(\frac{\sigma_y}{\sigma_x}\right)^2 - a^2}}{\sqrt{N-2}}$$

Équation 11 : Détermination  $\sigma_x$ 

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

Équation 12 : Détermination  $\sigma_y$ 

$$\sigma_y = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{N}}$$

Or,  $\sigma_x = 0,146$  et  $\sigma_y = 3,608$ Donc  $s_a = 0,181$ Donc  $t_{obs}(a) = 136,471$ Or, selon la table de Student,  $t_{5\%,4ddl} = 2,776$ Donc  $t_{obs}(a) > t_{5\%,4ddl}$ 

**L'hypothèse ( $H_0$ ) est donc rejetée au seuil de signification 5 %. La pente est significativement différente de 0. La méthode est donc linéaire.**

- ♣ Démonstration de la spécificité de la méthode ou « test de l'ordonnée à l'origine » (Équations 13 – 16) :

Soit  $\beta$  la vraie ordonnée à l'origine de la droite de régression dans la population.L'hypothèse ( $H_0$ ) est testée par : «  $\beta = 0$  » $\beta$  est estimé par  $b$ L'échantillon est de taille  $N = 6$ , donc  $N < 30$ 

La normalité des distributions conditionnelles est supposée.

Un test  $t$  de Student est alors réalisé.Équation 13 : Détermination  $t_{obs}(b)$ 

$$t_{obs}(b) = \frac{|b|}{s_b}$$

Avec :

Équation 14 : Détermination  $s_b$ 

$$s_b = \frac{\sqrt{\left(\left(\frac{\sigma_y}{\sigma_x}\right)^2 - a^2\right) \sum x_i^2}}{\sqrt{N(N-2)}}$$

Équation 15 : Détermination  $\sigma_x$ 

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

Équation 16 : Détermination  $\sigma_y$ 

$$\sigma_y = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{N}}$$

Or,  $\sigma_x = 0,146$  ;  $\sigma_y = 3,608$  et  $\sum x_i^2 = 0,493$

Donc  $s_b = 0,052$

Donc  $t_{obs}(b) = 1,102$

Or, selon la table de Student,  $t_{5\%,4ddl} = 2,776$

Donc  $t_{obs}(b) < t_{5\%,4ddl}$

**L'hypothèse ( $H_0$ ) ne peut donc pas être rejetée au seuil de signification 5 %. Il n'est pas mis en évidence que l'ordonnée à l'origine soit significativement différente de 0. La méthode est donc spécifique.**

(2) C2

Le Tableau 40 contient les données brutes des points de gamme pour C2.

Tableau 40 : Données brutes des points de gamme injectés - C2

| Volume injecté (μL)           | 0     | 10    | 15    | 20    | 25    | 30    |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Masse injectée Théorique (μg) | 0     | 0,070 | 0,105 | 0,140 | 0,175 | 0,210 |
| Aire observée (mAU x min)     | 0,017 | 1,708 | 2,645 | 3,541 | 4,450 | 5,348 |

- ♣ Démonstration de l'équation de la droite de régression par la méthode des moindres carrés (Figure 39, Équations 7 et 8) :

Soient  $x_i$  les masses injectées théoriques et  $y_i$  les aires observées correspondantes. Il est supposé que les  $x_i$  sont connus de manière exacte. L'équation de la droite de régression se présente sous la forme  $y = ax + b$ .

Equation 7 : Pente de la droite de régression

$$a = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2}$$

Avec  $\bar{x} = 0,117$  et  $\bar{y} = 2,952$

Or,  $\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = 0,729$  et  $\sum(x_i - \bar{x})^2 = 0,029$

Donc  $a = 25,499$

Equation 8 : Ordonnée à l'origine de la droite de régression

$$b = \bar{y} - a\bar{x}$$

Donc  $b = -0,023$

Conclusion : l'équation de la droite de régression est  $y = 25,499x - 0,023$

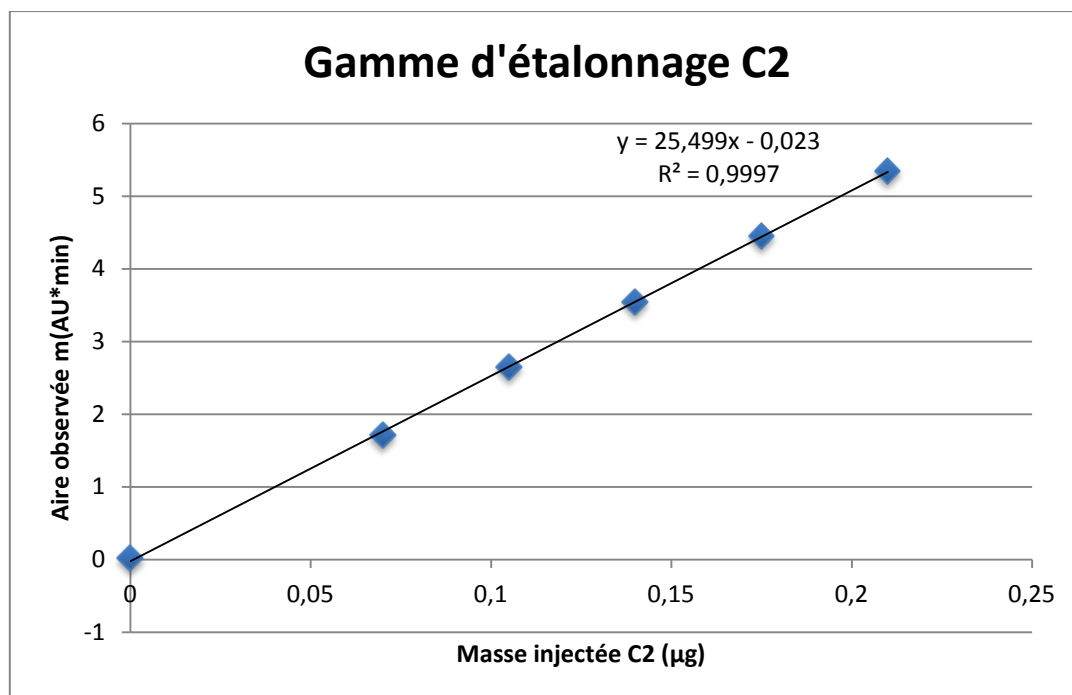


Figure 39 : Gamme d'étalonnage – C2

- ♣ Démonstration de la linéarité de la méthode ou « test d'indépendance linéaire » (Équations 9 – 12) :

Soit  $\alpha$  la vraie pente de la droite de régression dans la population.

L'hypothèse ( $H_0$ ) est testée par : «  $\alpha = 0$  »

$\alpha$  est estimé par  $a$

L'échantillon est de taille  $N = 6$ , donc  $N < 30$

La normalité des distributions conditionnelles est supposée.

Un test  $t$  de Student est alors réalisé.

Équation 9 : Détermination  $t_{obs}(a)$

$$t_{obs}(a) = \frac{|a|}{s_a}$$

Avec :

Équation 10 : Détermination  $s_a$

Équation 11 : Détermination  $\sigma_x$

Équation 12 : Détermination  $\sigma_y$

$$s_a = \frac{\sqrt{\left(\frac{\sigma_y}{\sigma_x}\right)^2 - a^2}}{\sqrt{N-2}}$$

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

$$\sigma_y = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{N}}$$

Or,  $\sigma_x = 0,069$  et  $\sigma_y = 1,760$

Donc  $s_a = 0,209$

Donc  $t_{obs}(a) = 121,783$

Or, selon la table de Student,  $t_{5\%,4ddl} = 2,776$

Donc  $t_{obs}(a) > t_{5\%,4ddl}$

**L'hypothèse ( $H_0$ ) est donc rejetée au seuil de signification 5 %. La pente est significativement différente de 0. La méthode est donc linéaire.**

- ♣ Démonstration de la spécificité de la méthode ou « test de l'ordonnée à l'origine »  
(Équations 13 – 16) :

Soit  $\beta$  la vraie ordonnée à l'origine de la droite de régression dans la population.

L'hypothèse ( $H_0$ ) est testée par : «  $\beta = 0$  »

$\beta$  est estimé par  $b$

L'échantillon est de taille  $N = 6$ , donc  $N < 30$

La normalité des distributions conditionnelles est supposée.

Un test  $t$  de Student est alors réalisé.

Équation 13 : Détermination  $t_{obs}(b)$

$$t_{obs}(b) = \frac{|b|}{s_b}$$

Avec :

Équation 14 : Détermination  $s_b$

Équation 15 : Détermination  $\sigma_x$

Équation 16 : Détermination  $\sigma_y$

$$s_b = \frac{\sqrt{\left(\left(\frac{\sigma_y}{\sigma_x}\right)^2 - a^2\right) \sum x_i^2}}{\sqrt{N(N-2)}}$$

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

$$\sigma_y = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{N}}$$

Or,  $\sigma_x = 0,069$  ;  $\sigma_y = 1,760$  et  $\sum x_i^2 = 0,110$

Donc  $s_b = 0,028$

Donc  $t_{obs}(b) = 0,810$

Or, selon la table de Student,  $t_{5\%,4ddl} = 2,776$

Donc  $t_{obs}(b) < t_{5\%,4ddl}$

L'hypothèse ( $H_0$ ) ne peut donc pas être rejetée au seuil de signification 5%. Il n'est pas mis en évidence que l'ordonnée à l'origine soit significativement différente de 0. La méthode est donc spécifique.

La méthode de dosage de C1 et C2 est donc linéaire et spécifique.

### b) Fidélité/exactitude

La fidélité et l'exactitude d'une méthode de dosage sont des paramètres importants pour sa validation. En effet, ils se déterminent par le biais des résultats donnés par l'injection de trois volumes différents, répétée cinq fois.

#### (1) C1

Les résultats sont résumés dans le Tableau 41.

Tableau 41 : Données brutes et interprétation statistique des points permettant de déterminer la fidélité et l'exactitude – C1

| C1                  |                      |                           |                     |           |          |          |       |
|---------------------|----------------------|---------------------------|---------------------|-----------|----------|----------|-------|
| Volume injecté (µL) | Masse théorique (mg) | Aire observée (mAU x min) | Masse observée (mg) | $\bar{m}$ | $\sigma$ | Rapport% | CV%   |
| 12                  | 0,178                | 4,358                     | 0,179               | 0,181     | 0,001    | 101,644  | 0,641 |
|                     |                      | 4,403                     | 0,180               |           |          |          |       |
|                     |                      | 4,414                     | 0,181               |           |          |          |       |
|                     |                      | 4,422                     | 0,181               |           |          |          |       |
|                     |                      | 4,432                     | 0,182               |           |          |          |       |
| 18                  | 0,266                | 6,675                     | 0,272               | 0,274     | 0,001    | 102,725  | 0,322 |
|                     |                      | 6,710                     | 0,274               |           |          |          |       |
|                     |                      | 6,732                     | 0,275               |           |          |          |       |
|                     |                      | 6,721                     | 0,274               |           |          |          |       |
|                     |                      | 6,704                     | 0,274               |           |          |          |       |
| 27                  | 0,400                | 10,024                    | 0,408               | 0,413     | 0,003    | 103,296  | 0,683 |
|                     |                      | 10,161                    | 0,413               |           |          |          |       |
|                     |                      | 10,187                    | 0,414               |           |          |          |       |
|                     |                      | 10,184                    | 0,414               |           |          |          |       |
|                     |                      | 10,183                    | 0,414               |           |          |          |       |

Pour évaluer l'exactitude d'une méthode, un rapport est déterminé entre la moyenne des masses observées et la masse théorique. Dans ce cas, tous les rapports ont moins de 15 % d'écart par rapport à la valeur théorique. Autrement dit, tous les rapports sont compris dans l'intervalle [85 % ; 115 %]. **La méthode est donc exacte.**

Afin d'estimer la fidélité de la méthode, un CV% est calculé pour chaque volume injecté. **Tous les CV% sont inférieurs à 15 %, ce qui démontre que la méthode est fidèle.**

(2) C2

La même expérience est réalisée avec C2 et les résultats sont résumés dans le Tableau 42.

Tableau 42 : Données brutes et interprétation statistique des points permettant de déterminer la fidélité et l'exactitude – C2

| C2                  |                      |                           |                     |           |          |          |       |
|---------------------|----------------------|---------------------------|---------------------|-----------|----------|----------|-------|
| Volume injecté (µL) | Masse théorique (mg) | Aire observée (mAU x min) | Masse observée (mg) | $\bar{m}$ | $\sigma$ | Rapport% | CV%   |
| 12                  | 0,084                | 2,081                     | 0,083               | 0,084     | 0,001    | 100,025  | 1,053 |
|                     |                      | 2,128                     | 0,084               |           |          |          |       |
|                     |                      | 2,126                     | 0,084               |           |          |          |       |
|                     |                      | 2,124                     | 0,084               |           |          |          |       |
|                     |                      | 2,139                     | 0,085               |           |          |          |       |
| 18                  | 0,126                | 3,205                     | 0,127               | 0,127     | 0,001    | 100,977  | 0,385 |
|                     |                      | 3,211                     | 0,127               |           |          |          |       |
|                     |                      | 3,232                     | 0,128               |           |          |          |       |
|                     |                      | 3,230                     | 0,128               |           |          |          |       |
|                     |                      | 3,229                     | 0,128               |           |          |          |       |
| 27                  | 0,189                | 4,729                     | 0,186               | 0,191     | 0,003    | 101,20   | 1,432 |
|                     |                      | 4,879                     | 0,192               |           |          |          |       |
|                     |                      | 4,883                     | 0,192               |           |          |          |       |
|                     |                      | 4,890                     | 0,193               |           |          |          |       |
|                     |                      | 4,890                     | 0,193               |           |          |          |       |

Tous les rapports sont compris dans l'intervalle [85 % ; 115 %], **donc la méthode est exacte.**

Tous les CV% sont inférieurs à 15 %, **donc la méthode est fidèle.**

**La méthode de dosage de C1 et C2 est donc fidèle et exacte.**

**c) Répétabilité inter-journalière**

Afin de déterminer la fidélité inter-journalière de la méthode utilisée, des mesures sont réalisées pendant trois jours successifs sur la même solution stock de C1 ou C2 ayant servie à réaliser les gammes d'étalonnage. Les résultats sont présentés dans les Tableaux 43 et 44. Un CV% a été calculé pour chaque volume injecté.

Tableau 43 : Données brutes et interprétation statistique de la répétabilité inter-journalière – C1

| Volume injecté (µL) | Masse théorique (mg) | Jour   | Aire observée (mAU x min) | $\bar{m}$ | $\sigma$ | CV%   |
|---------------------|----------------------|--------|---------------------------|-----------|----------|-------|
| 0                   | 0                    | Jour 1 | 0,023                     | 0,023     | 0,000    | 0,000 |
|                     |                      | Jour 2 | 0,023                     |           |          |       |
|                     |                      | Jour 3 | 0,023                     |           |          |       |
| 10                  | 0,148                | Jour 1 | 3,516                     | 3,577     | 0,081    | 2,271 |
|                     |                      | Jour 2 | 3,546                     |           |          |       |
|                     |                      | Jour 3 | 3,669                     |           |          |       |
| 15                  | 0,222                | Jour 1 | 5,391                     | 5,401     | 0,010    | 0,177 |
|                     |                      | Jour 2 | 5,410                     |           |          |       |
|                     |                      | Jour 3 | 5,401                     |           |          |       |
| 20                  | 0,296                | Jour 1 | 7,234                     | 7,433     | 0,336    | 4,518 |
|                     |                      | Jour 2 | 7,245                     |           |          |       |
|                     |                      | Jour 3 | 7,821                     |           |          |       |
| 25                  | 0,370                | Jour 1 | 9,127                     | 9,353     | 0,384    | 4,107 |
|                     |                      | Jour 2 | 9,137                     |           |          |       |
|                     |                      | Jour 3 | 9,797                     |           |          |       |
| 30                  | 0,444                | Jour 1 | 10,956                    | 11,248    | 0,500    | 4,445 |
|                     |                      | Jour 2 | 10,962                    |           |          |       |
|                     |                      | Jour 3 | 11,825                    |           |          |       |



Tableau 44 : Données brutes et interprétation statistique de la répétabilité inter-journalière – C2

| Volume injecté (µL) | Masse théorique (mg) | Jour   | Aire observée (mAU x min) | $\bar{m}$ | $\sigma$ | CV%   |
|---------------------|----------------------|--------|---------------------------|-----------|----------|-------|
| 0                   | 0                    | Jour 1 | 0,017                     | 0,017     | 0,000    | 0,000 |
|                     |                      | Jour 2 | 0,017                     |           |          |       |
|                     |                      | Jour 3 | 0,017                     |           |          |       |
| 10                  | 0,070                | Jour 1 | 1,708                     | 1,727     | 0,026    | 1,527 |
|                     |                      | Jour 2 | 1,715                     |           |          |       |
|                     |                      | Jour 3 | 1,757                     |           |          |       |
| 15                  | 0,105                | Jour 1 | 2,646                     | 2,686     | 0,064    | 2,374 |
|                     |                      | Jour 2 | 2,654                     |           |          |       |
|                     |                      | Jour 3 | 2,760                     |           |          |       |
| 20                  | 0,140                | Jour 1 | 3,542                     | 3,601     | 0,097    | 2,706 |
|                     |                      | Jour 2 | 3,549                     |           |          |       |
|                     |                      | Jour 3 | 3,714                     |           |          |       |
| 25                  | 0,175                | Jour 1 | 4,450                     | 4,514     | 0,101    | 2,244 |
|                     |                      | Jour 2 | 4,460                     |           |          |       |
|                     |                      | Jour 3 | 4,630                     |           |          |       |
| 30                  | 0,210                | Jour 1 | 5,349                     | 5,422     | 0,127    | 2,333 |
|                     |                      | Jour 2 | 5,350                     |           |          |       |
|                     |                      | Jour 3 | 5,569                     |           |          |       |

Tous les CV% sont inférieurs à 15 %, ce qui signifie que la **répétabilité intermédiaire (fidélité inter-journalière)** de la méthode est démontrée pour C1 et C2.

La méthode de dosage de C1 et C2 dans le CCAP® est donc validée dans l'intervalle de masse injectée [0,148 µg ; 0,444 µg] pour C1 et [0,070 µg ; 0,210 µg] pour C2.

**d) Rendement de l'étape de concentration par distillation/reprise**

Le procédé de validation précédent ne tient pas compte des variations dues aux manipulations réalisées avant injection, notamment l'étape de concentration du CCAP® par chauffage à reflux. Le but de cette expérience est de déterminer le pourcentage d'erreur imputé à l'étape de concentration par distillation/reprise, afin de savoir dans quelle mesure il est nécessaire d'en tenir compte pour la correction du calcul de la concentration en C1 et C2 dans le produit fini.

Pour cela, une solution d'encens à 1 % (seule solution disponible dans des quantités suffisantes) est diluée au 1/100<sup>ème</sup> de telle sorte que l'aire obtenue pour C1 et C2 soit dans l'intervalle de validation de la méthode de dosage. Le chromatogramme de la Figure 40 est obtenu, ainsi que les hauteurs et aires des pics correspondant aux formes cétoniques sont retrouvées dans le Tableau 45.

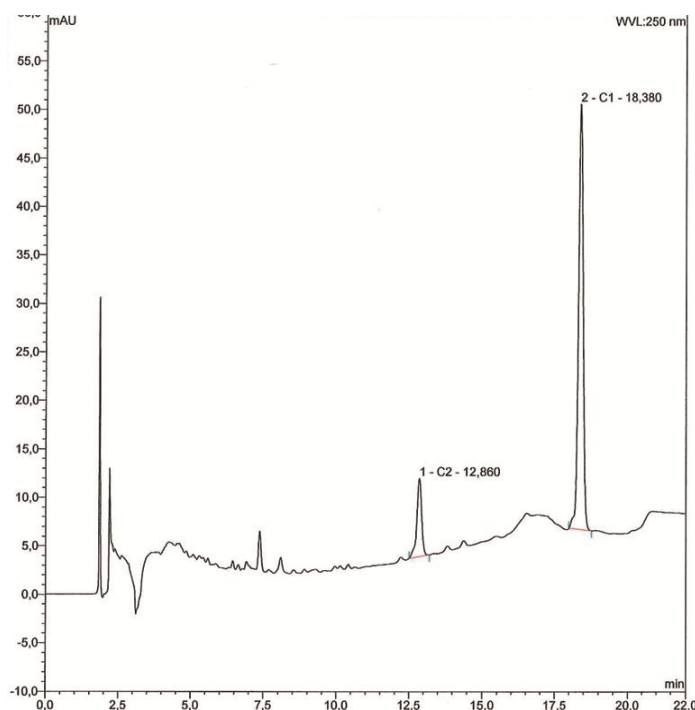


Figure 40 : Chromatogramme d'une solution d'encens avant concentration

Tableau 45 : Données quantitatives de C1 et C2 dans la solution d'encens avant concentration

| Caractères analytiques | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | Aire relative (%) | Bruit de fond |
|------------------------|------------------|---------------|-------------------|---------------|
| C1                     | 8,024            | 43,885        | 82,08             | 0,205         |
| C2                     | 1,752            | 8,039         | 17,92             |               |

Les aires de C1 et C2 sont comprises dans les intervalles de validation de la méthode de dosage : [3,515 mAU x min ; 10,956 mAU x min] pour C1 et [1,708 mAU x min ; 5,348 mAU x min] pour C2.

Ces aires correspondent aux aires théoriques qui devraient être obtenues après une étape de concentration d'un facteur  $x$  suivie d'une étape de dilution d'un facteur  $\frac{1}{x}$ .

C'est pourquoi un nouvel essai est réalisé en ce sens. 1 mL de cette solution d'encens diluée est pesé avec une balance de précision, révélant une masse de 0,859 g. Autrement dit, 100 g de cette solution représentent un volume d'environ 117 mL, qui sont introduits dans le ballon puis distillés jusqu'à obtenir une masse d'extrait de 0,09 g. 3,01 g de méthanol sont alors ajoutés à l'extrait, donnant une masse totale de la solution concentrée de 3,10 g (= 2,50 mL). La solution de départ a donc été concentrée d'un facteur  $\frac{117}{2,50} = 46,8$ .

Les étapes réalisées précédemment sur l'encens sont les mêmes que celles réalisées avec le CCAP®, et dans les mêmes proportions.

Cette même solution d'encens concentrée est alors diluée au  $\frac{1}{46,8}$  puis injectée en UHPLC-UV. Le chromatogramme de la Figure 41 est alors obtenu.

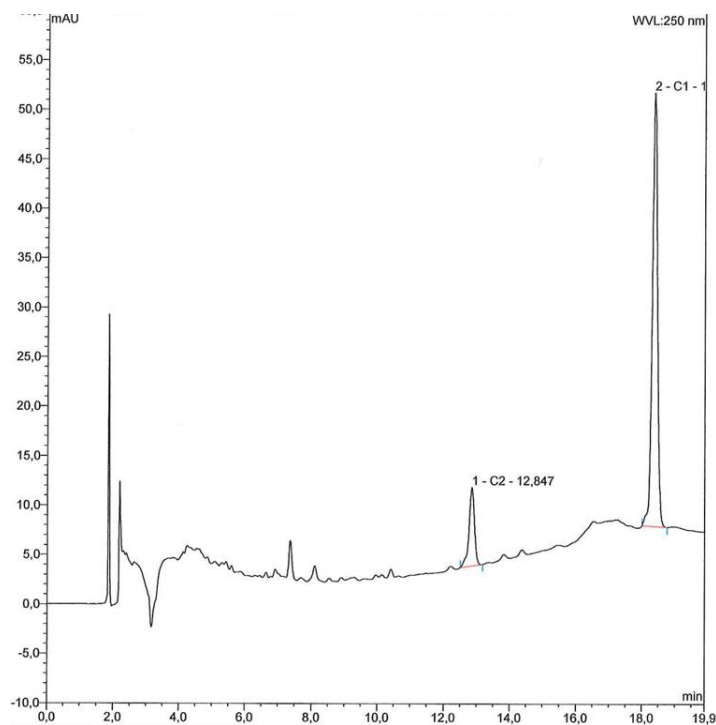


Figure 41 : Chromatogramme d'une solution d'encens concentrée puis re-diluée

Les hauteurs de pics semblent correspondre à celles de la solution d'encens avant concentration (Figure 40), révélant un faible écart lié à l'étape de concentration par distillation/reprise. Le Tableau 46 regroupe des données correspondant aux pics de C1 et C2.

Tableau 46 : Données quantitatives de C1 et C2 dans la solution d'encens concentrée puis re-diluée

| Caractères analytiques | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | Aire relative (%) | BDF   |
|------------------------|------------------|---------------|-------------------|-------|
| C1                     | 7,994            | 43,863        | 84,02             | 0,118 |
| C2                     | 1,720            | 7,948         | 15,98             |       |

En divisant les aires obtenues après concentration puis re-dilution (Tableau 46) par rapport aux aires obtenues avant concentration (Tableau 45), les résultats suivants sont obtenus.

$$\frac{\text{Aire}_{C1 \text{ après concentration/redilution}}}{\text{Aire}_{C1 \text{ avant concentration}}} = \frac{7,994}{8,024} = 99,62\%$$

$$\frac{\text{Aire}_{C2 \text{ après concentration/redilution}}}{\text{Aire}_{C2 \text{ avant concentration}}} = \frac{1,720}{1,752} = 98,17\%$$

Soit 0,38 % d'écart pour C1 et 1,83 % pour C2.

Cette expérience permet de montrer que l'étape de concentration par distillation/reprise n'entraîne qu'un écart très faible par rapport aux aires théoriques qui auraient dues être obtenues. Cette méthode est donc fiable. Ces données seront utilisées afin de corriger les valeurs obtenues lors du dosage de C1 et C2 dans le CCAP®.

## 5. Dosage

### a) Gamme d'étalonnage

Afin de doser C1 et C2 dans le CCAP®, une gamme d'étalonnage doit être réalisée le jour même pour chaque composé (Figures 42, 43 et Tableau 47).

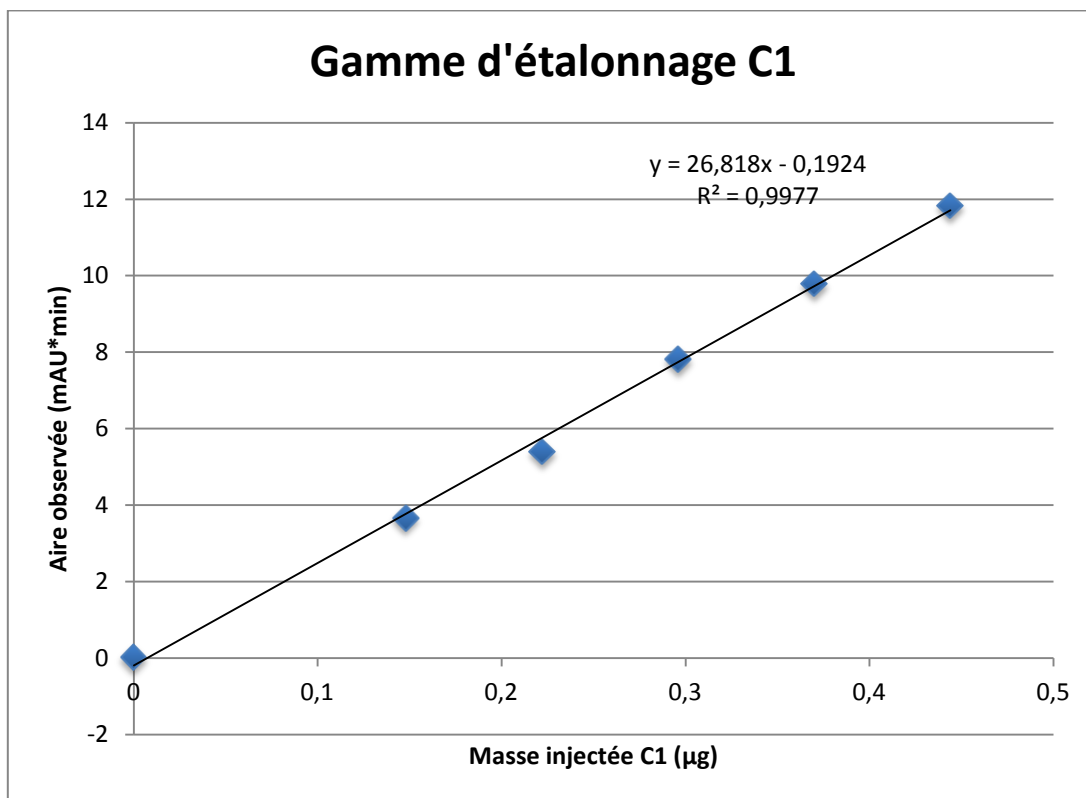


Figure 42 : Gamme d'étalonnage de C1 réalisée le jour du dosage de C1 et C2 dans le CCAP®

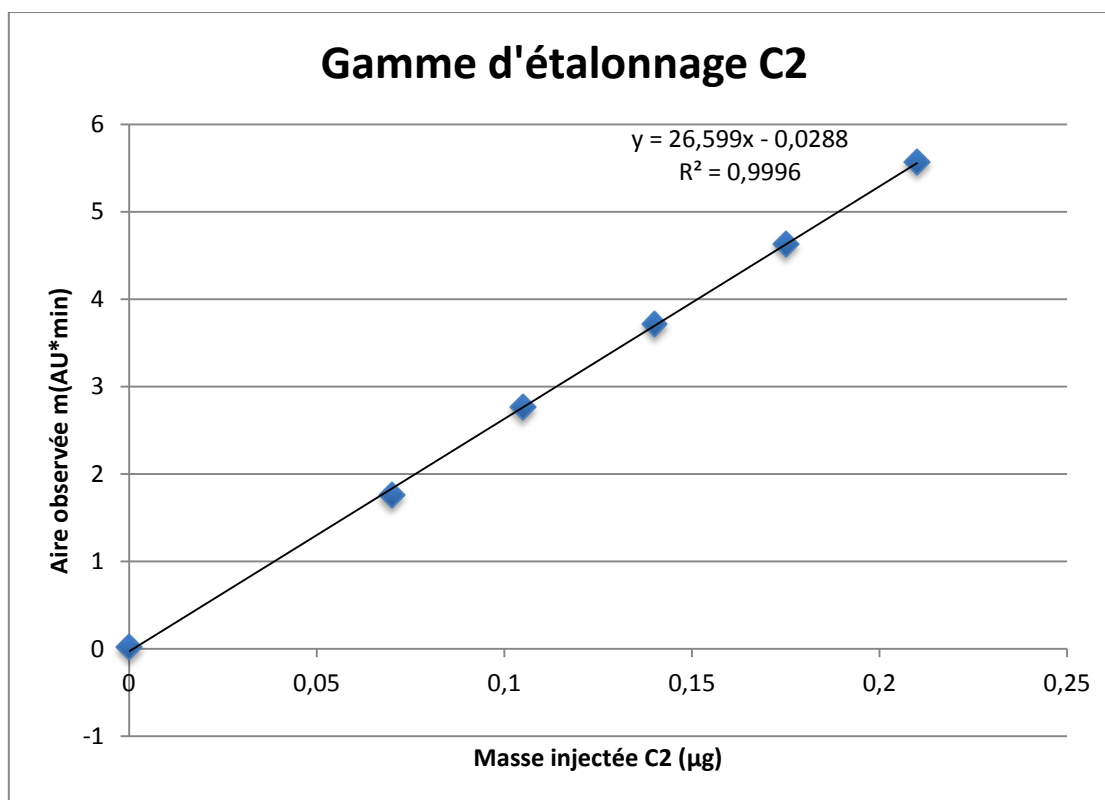


Figure 43 : Gamme d'étalonnage de C2 réalisée le jour du dosage de C1 et C2 dans le CCAP®

Tableau 47 : Données des gammes d'étalonnage de C1 et C2 réalisées le jour de leur dosage dans le CCAP®

| Volume injecté (µL) |                               | 0     | 10    | 15    | 20    | 25    | 30     |
|---------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| C1                  | Masse injectée Théorique (µg) | 0     | 0,148 | 0,222 | 0,296 | 0,370 | 0,444  |
|                     | Aire observée (mAU x min)     | 0,023 | 3,669 | 5,401 | 7,821 | 9,797 | 11,825 |
| C2                  | Masse injectée Théorique (µg) | 0     | 0,070 | 0,105 | 0,140 | 0,175 | 0,210  |
|                     | Aire observée (mAU x min)     | 0,017 | 1,757 | 2,760 | 3,714 | 4,630 | 5,569  |

Ces deux nouvelles gammes d'étalonnage permettent le calcul de l'équivalence entre l'aire observée suite à l'injection de 20 µL de CCAP® concentré et la masse correspondante en C1 et C2.

### b) Le CCAP®

Afin de se situer dans le même solvant que les témoins et à des concentrations comprises dans l'intervalle de validation de la gamme d'étalonnage, le CCAP® est concentré à l'aide de la méthode de distillation/reprise décrite dans la partie « Matériels & Méthodes » (Tableau 48). Le dosage est réalisé sur sept échantillons de CCAP® du lot CH 166.

Tableau 48 : Résultats du dosage de C1 et C2 dans le CCAP®

| Numéro de l'échantillon                       | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <b>Avant distillation</b>                     |        |        |        |        |        |        |        |
| Masse de la prise d'essai CCAP (g)            | 100,03 | 100,04 | 100,02 | 100,04 | 100,03 | 100,09 | 100,01 |
| <b>Après distillation</b>                     |        |        |        |        |        |        |        |
| Masse d'extrait (g)                           | 4,71   | 4,67   | 4,79   | 4,19   | 3,63   | 5,92   | 5,52   |
| Masse du solvant de reprise méthanol (g)      | 5,01   | 3,04   | 3,01   | 3,02   | 3,00   | 3,00   | 3,00   |
| Masse totale extrait + solvant de reprise (g) | 9,72   | 7,71   | 7,8    | 7,21   | 6,63   | 8,92   | 8,52   |

Une conversion de la masse totale de l'extrait repris dans le méthanol en volume doit être réalisée. Pour ce faire, après homogénéisation, 1 mL de l'extrait repris dans le méthanol est pesé sur une balance de précision permettant de déduire le volume de l'extrait repris dans le méthanol, comme le montre le Tableau 49.

Tableau 49 : Résultats du dosage de C1 et C2 dans le CCAP®

| Numéro de l'échantillon                               | 1      | 2     | 3     | 4     | 5     | 6      | 7     |
|---|--------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| Masse de 1mL de l'extrait repris dans le méthanol (g) | 0,864  | 0,901 | 0,938 | 0,956 | 0,923 | 0,886  | 1,005 |
| Volume de l'extrait repris dans le méthanol (mL)      | 11,249 | 8,561 | 8,316 | 7,314 | 7,182 | 10,067 | 8,477 |

Suite à l'injection de 20 µL de l'extrait repris dans le méthanol en UHPLC-UV, les résultats du Tableau 50 sont obtenus.

Tableau 50 : Résultats du dosage de C1 et C2 dans le CCAP®

| Numéro de l'échantillon | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Aire de C1 (mAU x min)  | 3,571 | 4,602 | 4,438 | 4,729 | 5,151 | 3,810 | 4,094 |
| Aire de C2 (mAU x min)  | 1,031 | 1,301 | 1,275 | 1,332 | 1,429 | 1,104 | 1,161 |

Lors de l'étape de concentration/reprise, une perte de 0,38 % pour C1 et 1,83 % pour C2 est notée (Tableaux 45 et 46). Il est donc nécessaire de corriger les aires ci-dessus en fonction de cet écart, donnant les résultats du Tableau 51.

Tableau 51 : Résultats du dosage de C1 et C2 dans le CCAP®

| Numéro de l'échantillon         | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Aire de C1 corrigée (mAU x min) | 3,557 | 4,585 | 4,421 | 4,711 | 5,131 | 3,796 | 4,078 |
| Aire de C2 corrigée (mAU x min) | 1,012 | 1,277 | 1,252 | 1,308 | 1,403 | 1,084 | 1,140 |

A partir des équations des gammes d'étalonnage, les aires corrigées de C1 et C2 sont converties en masses (Tableau 52).

Tableau 52 : Résultats du dosage de C1 et C2 dans le CCAP®

| Numéro de l'échantillon | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Masse de C1 (µg)        | 0,146 | 0,188 | 0,181 | 0,193 | 0,210 | 0,156 | 0,167 |
| Masse de C2 (µg)        | 0,041 | 0,051 | 0,050 | 0,052 | 0,056 | 0,043 | 0,046 |

Or, ces masses sont celles retrouvées dans 20 µL de CCAP® concentré. Il est donc nécessaire de convertir ces données pour avoir la masse de C1 et C2 dans le volume total de l'extrait repris dans le méthanol, comme le montre le Tableau 53.

Tableau 53 : Résultats du dosage de C1 et C2 dans le CCAP®

| Numéro de l'échantillon                | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Masse totale de C1 dans l'extrait (µg) | 82,227 | 80,380 | 75,318 | 70,535 | 75,363 | 78,465 | 70,897 |
| Masse totale de C2 dans l'extrait (µg) | 22,837 | 21,831 | 20,797 | 19,095 | 20,089 | 21,860 | 19,338 |



Ces résultats correspondent aux masses de C1 et C2 présentes dans la prise d'essai de CCAP® de départ. Il est donc nécessaire d'homogénéiser ces données pour exactement 100 g de CCAP® afin qu'elles soient comparables (Tableau 54).

Tableau 54 : Résultats du dosage de C1 et C2 dans le CCAP®

| Numéro de l'échantillon              | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Masse de C1 dans 100 g de CCAP® (µg) | 82,202 | 80,348 | 75,303 | 70,507 | 75,340 | 78,386 | 70,890 |
| Masse de C2 dans 100 g de CCAP® (µg) | 22,830 | 21,822 | 20,793 | 19,088 | 20,083 | 21,841 | 19,336 |

Ces données sont analysées afin de calculer une moyenne et un CV% (Tableau 55).

Tableau 55 : Résultats du dosage de C1 et C2 dans le CCAP®

|                                      | $\bar{m}$ | $\sigma$ | CV%   |
|--------------------------------------|-----------|----------|-------|
| Masse de C1 dans 100 g de CCAP® (µg) | 76,139    | 4,475    | 5,877 |
| Masse de C2 dans 100 g de CCAP® (µg) | 20,827    | 1,404    | 6,743 |

Les teneurs en C1 et C2 dans le produit fini sont respectivement de 76,139 µg/100 g et 20,827 µg/100 g. Les CV% sont inférieurs à 15 %. La méthode de dosage de C1 et C2 dans le CCAP® est fidèle malgré l'ajout de la méthode de concentration par distillation/reprise.

Une autre façon d'exploiter ces résultats consiste à exprimer la masse en C1 et C2 présente dans un flacon de CCAP® afin de faire un lien avec l'exposition des utilisateurs. Pour ce faire, la masse volumique du CCAP® retrouvée dans le dossier d'AMM est utilisée. Sachant qu'un flacon de CCAP® contient un volume de 60 mL, ceci correspond à une masse de CCAP® de 57,48 g.

Tableau 56 : Teneur de C1 et C2 par flacon de CCAP®

| Numéro de l'échantillon              | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Masse de C1 par flacon de CCAP® (µg) | 47,250 | 46,184 | 43,284 | 40,527 | 43,306 | 45,056 | 40,747 |
| Masse de C2 par flacon de CCAP® (µg) | 13,123 | 12,543 | 11,952 | 10,972 | 11,554 | 12,554 | 11,114 |

Les masses moyennes de C1 et C2 par flacon (60 mL) de CCAP® sont donc respectivement de 43,765 µg et de 11,972 µg. Autrement dit, les concentrations en C1 et C2 par kilogramme de CCAP® sont respectivement de 0,761 mg/kg et 0,208 mg/kg, et les concentration de ces mêmes composés par millilitre de CCAP® sont respectivement de 0,729 µg/mL et 0,200 µg/mL.

## B. Cas de B1

L'objectif de cette partie est d'identifier le troisième composé majoritaire de la résine d'encens, l'acide β-boswellique (B1). L'analyse est toujours réalisée en UHPLC-UV mais cette fois-ci avec une colonne Kinetex® qui présenterait l'avantage de réduire les  $t_r$ .

### 1. Développement de la méthode à l'aide du témoin B1

#### a) Selon le protocole de la publication de Nold (2014)

Le protocole de dosage en UHPLC-UV de l'acide β-boswellique (B1) est réalisé tel que décrit dans la publication de Nold et son équipe (2014) [96].

Une solution stock de B1 est préparée à la concentration de 13 µg/mL par dissolution de la poudre pure de B1 dans un mélange Méthanol/Eau (30/70 V : V). Les analyses du témoin sont réalisées avec une colonne Kinetex® phenylhexyle (100 mm x 3 mm x 2,6 µm). La séparation a lieu avec les phases mobiles A (H<sub>2</sub>O tamponnée) et B (ACN) en mode gradient en augmentant la proportion d'ACN de 50 à 100 % en 4,5 min puis un palier à 100 % pendant 10,5 min avec un débit de 0,6 mL/min. Le témoin ainsi qu'un blanc Méthanol/Eau (30/70 V : V) sont injectés en UHPLC-UV à 210 nm, ce qui permet d'obtenir des chromatogrammes de la Figure 44.

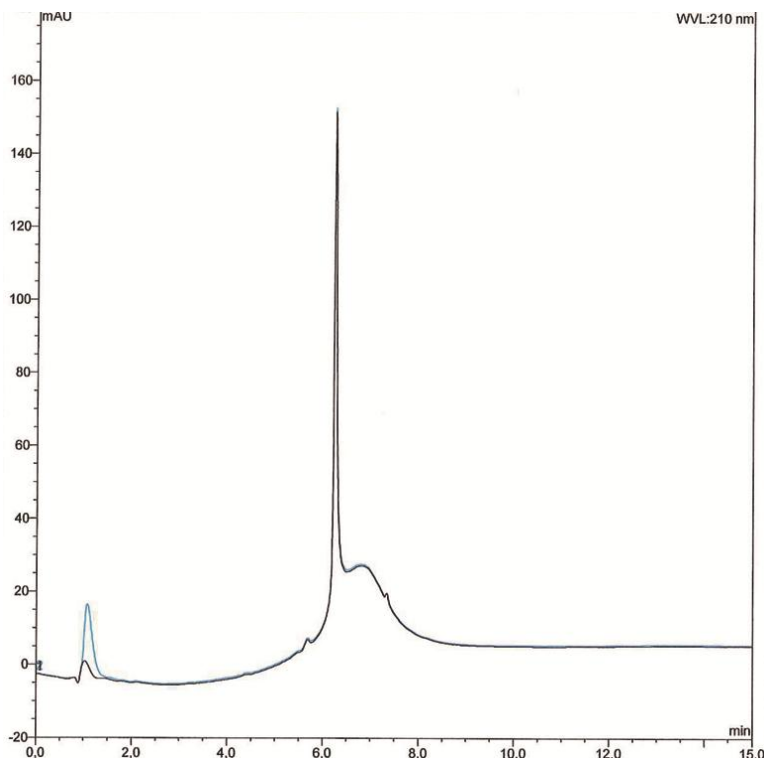


Figure 44 : Superposition des chromatogrammes d'un blanc méthanol/eau (30/70 V : V) (en noir) et d'une solution de témoin B1 dans le même mélange (en bleu)

La présence de pics parasites est observée avec le blanc. Aucun pic supplémentaire n'est retrouvé dans la solution du témoin B1, ce qui implique que **la méthode de dosage n'est pas optimisée dans ces conditions analytiques**. Pour tenter d'observer un pic correspondant à B1, le volume d'injection est augmenté de 50 %, ce qui représente un volume de 30  $\mu$ L. Le chromatogramme obtenu dans ce cas ne montre aucun changement (chromatogramme non montré).

**Il est donc nécessaire de modifier la préparation des échantillons et les paramètres analytiques afin de rendre possible l'identification et le dosage de B1.**

### *b) Optimisation de la méthode d'analyse*

Pour optimiser la méthode de dosage, le choix du solvant de reprise, des conditions de séparation et de la longueur d'onde de détection sont abordés.

#### *(1) Choix du solvant de reprise*

Suite à l'absence de pic d'intérêt dans une solution de B1 dans un mélange Méthanol/Eau (30/70 V : V), différents solvants sont alors testés : ACN, méthanol 100 % et éthanol 33 % (V : V). Les trois solutions stocks de B1 sont passées dans le système chromatographique (Figures 45 - 48).

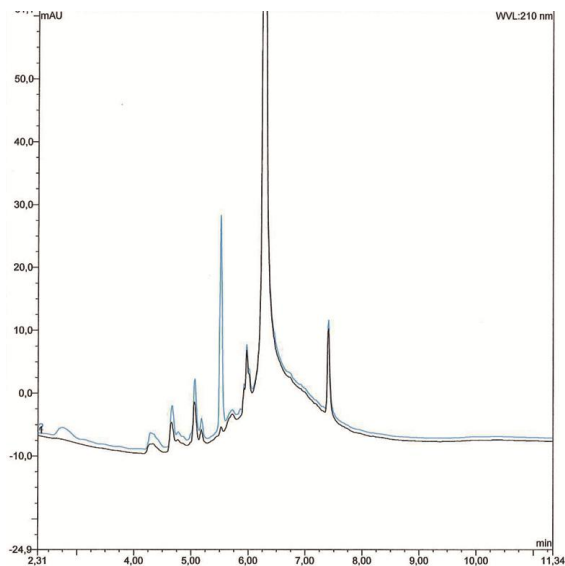


Figure 45 : Chromatogrammes d'un blanc ACN 100% (en noir) et d'un témoin B1 dissous dans de l'ACN 100% (en bleu)

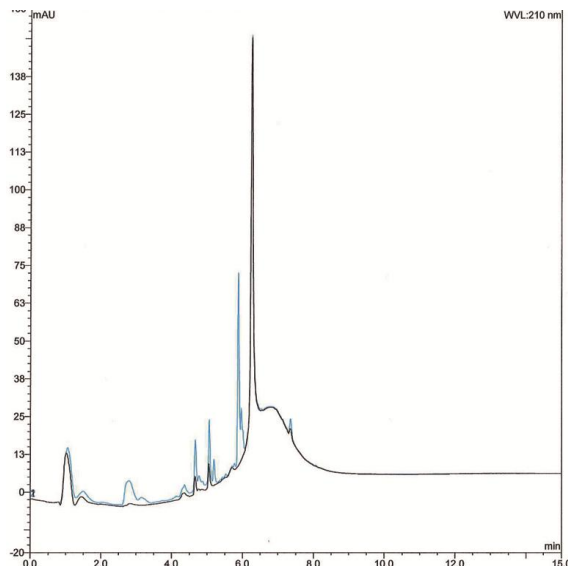


Figure 46 : Chromatogrammes d'un blanc méthanol 100% (en noir) et d'un témoin B1 dissous dans du méthanol 100% (en bleu)

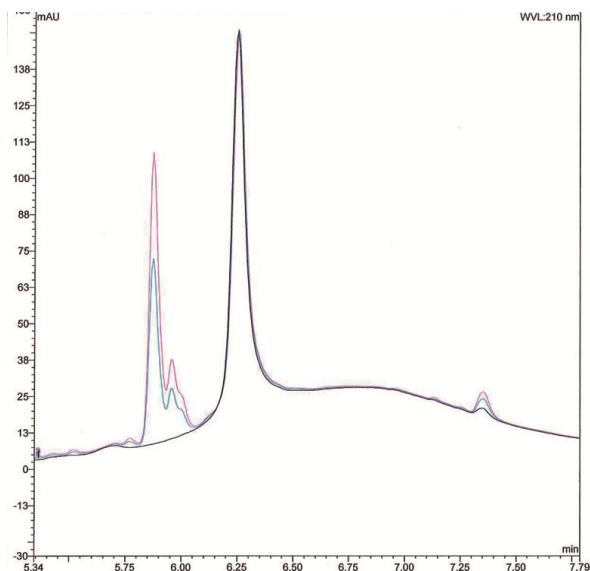


Figure 47 : Chromatogrammes correspondant à l'injection de 20 µL de la solution de témoin B1 dans du méthanol 100% (en bleu) et à 30 µL de la même solution (en rose)

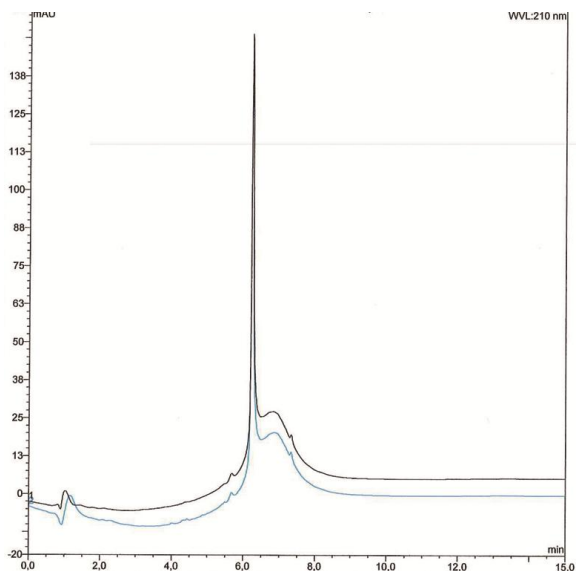


Figure 48 : Chromatogrammes d'un blanc éthanol 33% (V : V) (en noir) et d'une solution de témoin B1 dans le même solvant (en bleu)

- ♣ Solvant : ACN 100 %

Afin de se situer dans les conditions optimales pour la solubilisation et l'élution de B1, le témoin est dissous dans la phase mobile correspondant à 100 % d'ACN (pourcentage atteint dès 4,5 min de run). Malgré de nombreux pics parasites, l'injection du témoin B1 provoque l'apparition d'un nouveau pic au  $t_r$  5,55 min (Figure 45), correspondant sûrement au composé d'intérêt.

- ♣ Solvant : Méthanol 100 %

Une nouvelle expérience est réalisée en solubilisant B1 dans du méthanol 100 % (Figure 46). La présence de nombreux pics parasites est une nouvelle fois observée dans le blanc méthanol. L'injection de B1 provoque la naissance d'un nouveau pic avec un épaulement au  $t_r$  5,80 min. Afin d'identifier et de confirmer la présence de B1, le volume d'injection est augmenté de 10  $\mu$ L (Figure 47). La hauteur et l'aire du pic au  $t_r$  5,80 min augmentent avec le volume d'injection. Cette expérience prouve la présence de B1 au milieu des autres pics parasites.

- ♣ Solvant : Ethanol 33 %

Une manipulation identique est réalisée en remplaçant le solvant méthanol par de l'éthanol 33 % (V : V) afin de mimer les conditions dans lesquelles sont situées l'acide  $\beta$ -boswellique dans le CCAP<sup>®</sup>. Les pics parasites sont présents aussi bien dans le blanc que dans la solution contenant le témoin B1. Aucun pic supplémentaire ne correspond à la solution contenant B1 (Figure 48).

**Pour conclure, l'éthanol 33 % (V : V) et le méthanol (30/70 V : V) sont de très mauvais solvants de solubilisation. Le même problème a été observé dans le cas de C1 et C2, ainsi B1 n'est sûrement que peu soluble dans l'éthanol 33 % (V : V). A contrario, le méthanol 100 % et l'ACN ont donné de bons résultats. Le méthanol 100 % est sélectionné comme solvant de reprise car la solubilité de B1 est très satisfaisante, et c'est aussi le même solvant qui a permis le dosage de C1 et C2 dans le CCAP<sup>®</sup>. En revanche, l'élution supposée de B1 à un temps très proche des pics parasites me pousse à tester de nouvelles conditions chromatographiques pour optimiser la séparation de B1.**

## (2) Choix des conditions chromatographiques

Le mode d'élution gradient est simplifié au profit de l'isocratique, dans des proportions d'ACN/Eau (60/40 V : V) avec un débit de 0,8 mL/min. Les analyses du témoin sont toujours réalisées avec une colonne Kinetex<sup>®</sup> phenylhexyle (100 mm x 3 mm x 2,6  $\mu$ m). Dans ces conditions, l'injection d'un blanc méthanol et de la solution témoin B1 dans ce même solvant permet d'obtenir trois chromatogrammes (Figures 49, 50 et 51).

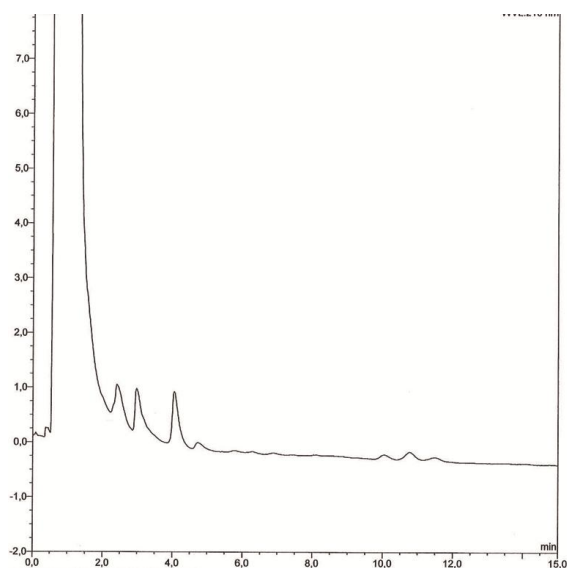


Figure 49 : Chromatogramme d'un blanc méthanol en mode isocratique

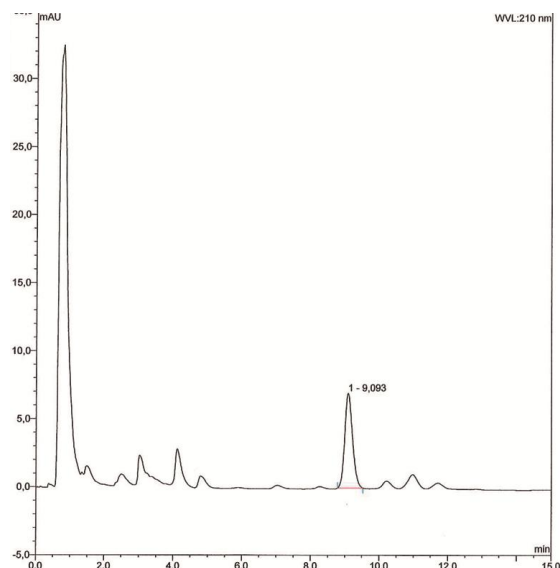


Figure 50 : Chromatogramme d'une solution de témoin B1 dissous dans du méthanol

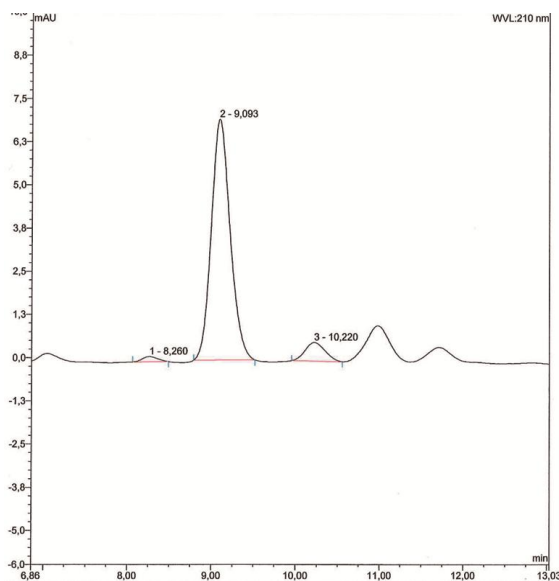


Figure 51 : Zoom sur les pics parasites 1 et 3

Le chromatogramme (Figure 50) met en évidence que le composé B1, élué au  $t_r$  9,093 min, est encadré par des pics parasites de moindre importance. La présence de ces pics est également identifiée après injection du blanc méthanol dans le système chromatographique, laissant supposer que dans ces conditions d'analyse, le méthanol absorbe à la longueur d'onde de 210 nm (Figure 49). Pour évaluer leur séparation, un zoom est alors réalisé sur le pic B1 et les pics parasites 1 et 3 (Figure 51) : B1 semble bien résolu par rapport aux deux pics parasites l'encadrant. Afin de déterminer les paramètres de séparation entre ces différents composés, les données brutes des trois pics sont résumées dans les Tableaux 57 et 58.

Tableau 57 : Paramètres chromatographiques de B1 et des pics parasites 1 et 3

| Caractère analytique | $t_r$ (min) | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | As   |
|----------------------|-------------|------------------|---------------|------|
| Pic parasite 1       | 8,260       | 0,031            | 0,149         | 1,11 |
| B1                   | 9,093       | 1,822            | 7,003         | 1,17 |
| Pic parasite 3       | 10,220      | 0,147            | 0,539         | 1,10 |

Tableau 58 : Paramètres de séparation de B1 et des pics parasites 1 et 3

| Caractères analytiques | $k'$ | $\alpha$ | N     | Rs   | As   |
|------------------------|------|----------|-------|------|------|
| Pic parasite 1         | 7,26 | 1,12     | 8 980 | 2,21 | 1,11 |
| B1                     | 8,09 |          | 7 975 |      | 1,17 |
| Pic parasite 3         | 9,22 | 1,14     | 8 376 | 2,65 | 1,10 |

La Rs entre les trois pics est très satisfaisante car les valeurs sont supérieures à 1,5. Le  $k'$  de B1 est compris entre 2 et 10, ce qui témoigne que le composé sort loin du volume mort avec un temps d'analyse acceptable.

**Ces résultats permettent de déduire que B1 est correctement résolu par rapport aux deux pics parasites les plus proches. Ces nouvelles conditions chromatographiques sont alors retenues.**

### (3) Choix de la longueur d'onde

La sensibilité de la méthode va tenter d'être améliorée en comparant les résultats obtenus à trois longueurs d'onde différentes et voisines de 210 nm : 208, 210 et 212 nm.

Après injection de la même solution témoin B1 dans les conditions chromatographiques retenues aux trois longueurs d'onde, les chromatogrammes sont reportés dans la Figure 52 et leurs paramètres sont résumés dans le Tableau 59.

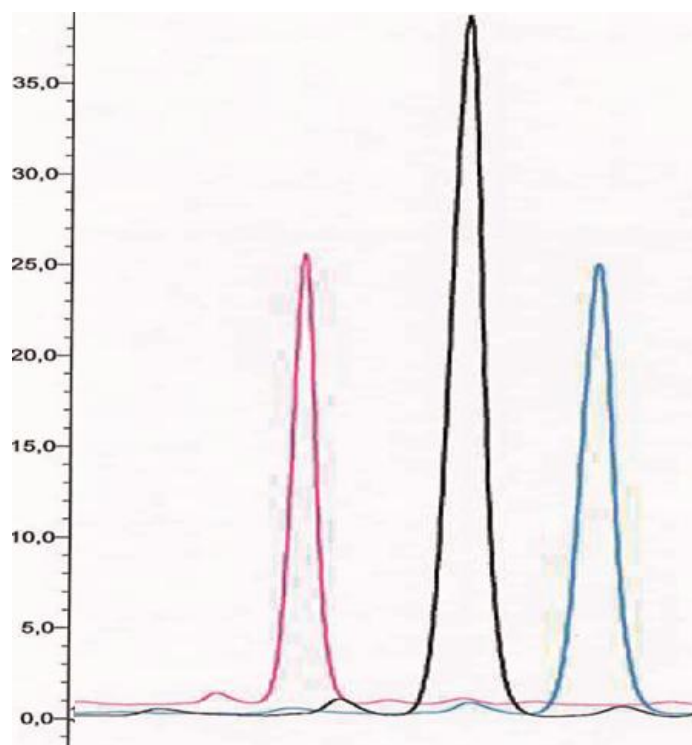


Figure 52 : Superposition des chromatogrammes d'une solution de B1 aux longueurs d'onde : 208 nm (en rose), 210 nm (en noir) et 212 nm (en bleu)

Tableau 59 : Paramètres chromatographiques de B1 à différentes longueurs d'onde

| Longueur d'onde (nm) | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | As   |
|----------------------|------------------|---------------|------|
| 208                  | 6,624            | 24,855        | 1,10 |
| 210                  | 10,341           | 38,648        | 1,09 |
| 212                  | 6,357            | 24,586        | 1,09 |



D'après le chromatogramme, la hauteur du pic la plus importante est retrouvée à 210 nm, longueur d'onde à laquelle se situe le maximum d'absorption du composé B1. Les données du Tableau 59 révèlent que lorsque la longueur d'onde varie de 210 à 208/212 nm, la hauteur et l'aire des pics diminuent d'environ 35 % témoignant d'un maximum d'absorption de B1 à 210 nm. Ce choix est conforté par de nombreuses revues bibliographiques. De plus, la symétrie des pics implique l'absence de phénomènes de rétention multiple ou de volumes morts trop importants.

**Cette longueur d'onde est donc retenue pour la suite des expérimentations.**

**En conclusion générale, pour doser B1 dans les solutions témoins, les conditions suivantes sont retenues : le choix du méthanol comme solvant de reprise, l'éluion en mode isocratique dans de l'ACN/Eau (60/40 V : V) et une détection à 210 nm. Ces conditions chromatographiques sont alors transposées sur la matière première : l'encens.**

## 2. Identification de B1 dans l'encens

Rappelons que les résines brutes sont finement broyées puis subissent une extraction de 10 min dans du méthanol à l'aide d'un bac à ultrasons. En appliquant le protocole de séparation et de détection décrit pour les témoins, deux chromatogrammes sont obtenus (Figures 53 et 54).

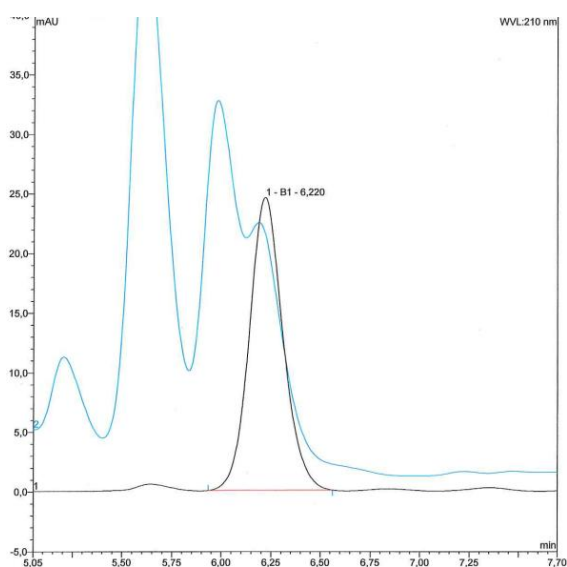


Figure 53 : Chromatogramme d'une solution de témoin B1 (en noir) et d'encens à 1% (en bleu)

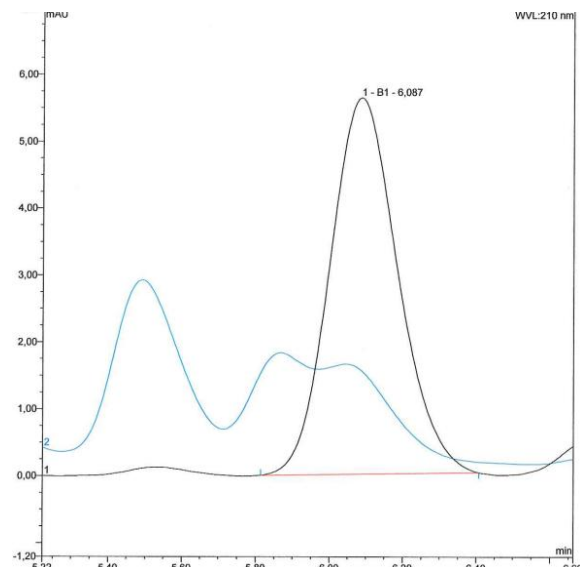


Figure 54 : Chromatogramme d'une solution de témoin B1 (en noir) et d'encens à 1% dilué au 1/100<sup>ème</sup> (en bleu)

Il est à noter que **le composé B1 est retrouvé dans l'encens mais moins bien élué que dans le cas de la solution témoin** (Figure 53). Un épaulement en début de pic est retrouvé, témoignant d'une possible co-élution de deux composés à des  $t_r$  voisins. Cette dernière hypothèse est tout à fait envisageable puisque l'échantillon est complexe et impur. Pour vérifier si ce composé est élué

simultanément au  $t_r$  de B1 (6,220 min), la solution d'encens est diluée au  $1/100^{\text{ème}}$ , ce qui permet de diminuer la concentration des composés dans la matière première (Figure 54). En effet, un pic déformé apparaît quelques secondes avant B1. Pour obtenir une meilleure résolution des pics entre eux, de nouvelles conditions analytiques pourraient être testées.

### 3. Identification et dosage de B1 dans le CCAP®

#### a) CCAP® pur

Bien que B1 soit peu soluble dans l'éthanol 33 % (V : V), une première étude est réalisée directement sur le produit fini. Le CCAP® pur est injecté en UHPLC-UV à 210 nm dans les mêmes conditions analytiques que les témoins. Le triterpène apolaire est identifié par comparaison avec les résultats préalablement obtenus avec le témoin en vérifiant son  $t_r$ . Le chromatogramme est présenté en Figure 55.

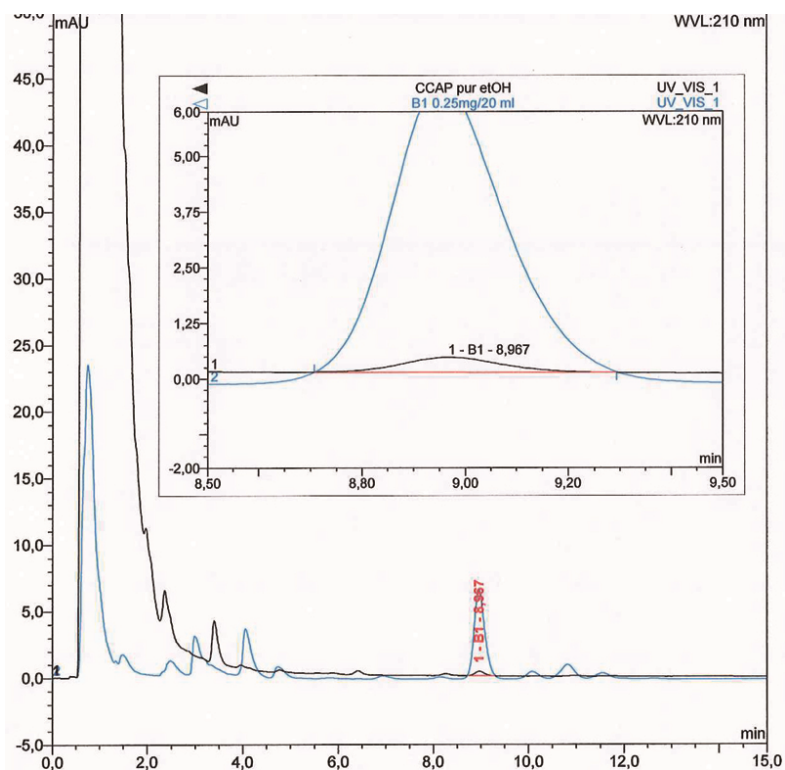


Figure 55 : Chromatogrammes du CCAP® pur (en noir) et du témoin B1 (en bleu)

Ces résultats confirment la présence de l'acide  $\beta$ -boswellique dans le CCAP® pur. Une comparaison directe des quantités de B1 dans le CCAP® pur et dans le témoin n'est pas possible, puisque les deux solvants utilisés sont différents et ne sont donc pas comparables. Il est alors nécessaire de transposer le CCAP® dans du méthanol par une étape d'évaporation/reprise sans modification de la concentration de B1.

**b) CCAP® repris dans du méthanol**

Une technique d'extraction à reflux est utilisée pour modifier le solvant du CCAP®. Les conditions de travail sont données dans la partie « Matériels & Méthodes ». Le CCAP® subit donc une étape d'évaporation/reprise dans du méthanol sans modification de concentration. Cette expérience, réalisée deux fois, permet l'injection des deux échantillons obtenus en UHPLC-UV à 210 nm. Les chromatogrammes sont reportés dans la Figure 56 et les paramètres sont résumés dans le Tableau 60.

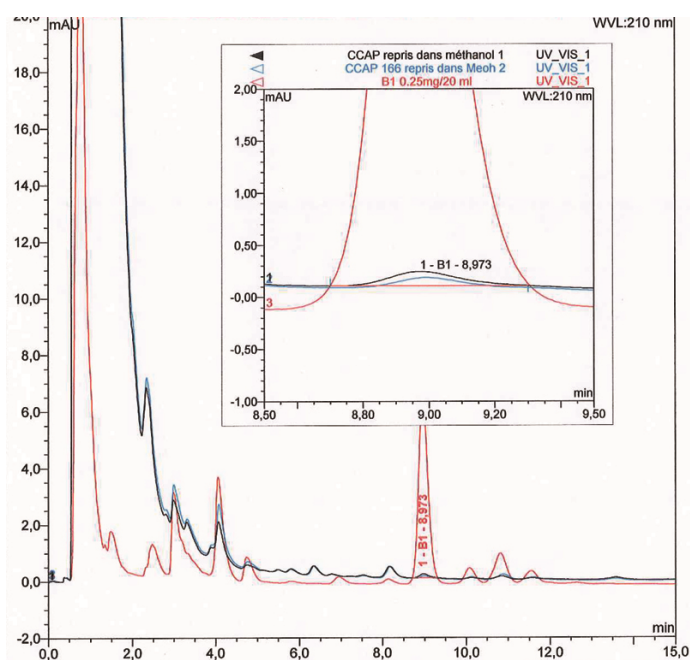


Figure 56 : Chromatogrammes de deux solutions de CCAP® reprises dans du méthanol (en noir et bleu) et d'une solution de témoin B1 (en rose)

Tableau 60 : Données brutes correspondant à B1 dans le CCAP® repris dans le méthanol et dans le témoin

| Caractère analytique            | $t_r$ (min) | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | As   | BDF   |
|---------------------------------|-------------|------------------|---------------|------|-------|
| CCAP® 1 repris dans du méthanol | 8,973       | 0,034            | 0,137         | 1,35 | 0,066 |
| CCAP® 2 repris dans du méthanol |             | 0,031            | 0,131         | 1,35 |       |
| Témoin B1                       |             | 1,779            | 6,757         | 1,08 |       |

Les chromatogrammes confirment la présence de B1 dans les deux solutions de CCAP®. La hauteur et l'aire des pics sont comparables entre les deux échantillons, confirmant que la méthode d'évaporation/reprise est fidèle. Cette comparaison a été réitérée plusieurs fois, confirmant la conclusion précédente.

D'après les données du Tableau 60, en comparant les hauteurs des pics au BDF pour le composé B1 dans les solutions de CCAP® reprises dans le méthanol, il est à noter :

- ♣  $0,137 < 0,198$  donc la hauteur du pic B1 dans le CCAP® repris est inférieure à 3 fois le BDF.

**La hauteur du pic du CCAP® repris dans le méthanol est inférieure à 3 fois le BDF, ce qui signifie que la concentration en B1 dans le CCAP® est inférieure à la LOD.**

### (1) Evaluation de la perte à l'évaporation/reprise

L'étape d'évaporation/reprise est une source potentielle de perte de matière, ce qui pourrait se traduire par une sous-estimation de la concentration de l'acide  $\beta$ -boswellique (B1) dans le produit fini. Une expérience est alors réalisée afin de déterminer la perte à l'évaporation/reprise.

Une solution stock de B1 est injectée trois fois dans le système chromatographique (échantillon non distillé). Le protocole d'évaporation/reprise est réalisé trois fois avec cette même solution stock (échantillon distillé), puis l'extrait est injecté en UHPLC-UV. Cette expérience permet ainsi de comparer plusieurs échantillons subissant ou non cette manipulation à risque d'erreur. Les résultats sont synthétisés dans le Tableau 61.

Tableau 61 : Données brutes et interprétation statistique des résultats obtenus pour les échantillons distillés et non distillés

| Type d'échantillon | Aire (mAU x min) | $\bar{m}$ | $\sigma$ | CV%   | Perte% |
|--------------------|------------------|-----------|----------|-------|--------|
| Distillé           | 1,765            | 1,760     | 0,006    | 0,323 | 1,584  |
|                    | 1,762            |           |          |       |        |
|                    | 1,754            |           |          |       |        |
| Non distillé       | 1,779            | 1,789     | 0,008    | 0,475 |        |
|                    | 1,795            |           |          |       |        |
|                    | 1,792            |           |          |       |        |

La méthode d'évaporation/reprise est fidèle sur ces 6 essais (CV% < 15 %) et la perte estimée à 1,584 % est négligeable.

Même si nous tenons compte de cette perte, la concentration en B1 dans le produit fini reste inférieure à la LOD. Une quantification précise de l'acide  $\beta$ -boswellique dans le CCAP® n'est pas nécessaire puisque B1 n'est pas le composé de référence pour répondre aux Lignes Directrices et aux autorités. C'est un élément supplémentaire visant à approfondir la présence et la quantité des composés d'intérêt du CCAP®.

## (2) Détermination de la LOD

La LOD restant donc à déterminer, une solution stock de B1 est diluée de façon à ce que la hauteur du pic soit égale à 3 fois la hauteur du BDF. Cette solution a donc une concentration égale à la LOD.

Une analyse et des calculs préalables ont permis de faire une approximation de la valeur de la LOD afin de faciliter les expériences. **L'injection répétée de solutions témoins diluées a permis de déterminer la LOD à 0,37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La concentration en acide  $\beta$ -boswellique (B1) dans le CCAP® est donc inférieure à 0,37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . De la même façon que dans le cas de C1 et C2, par simple conversion du volume de CCAP® en masse, la concentration en B1 par kilogramme de produit fini est de 0,386 mg/kg. Autrement dit, la masse d'acide  $\beta$ -boswellique contenue dans 1 flacon de CCAP® (60 mL) est de 22,20  $\mu\text{g}$ .**

## 4. Perspectives

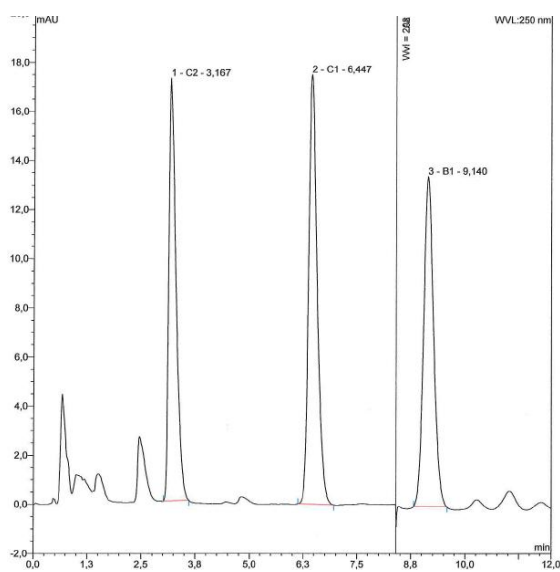


Figure 57 : Chromatogramme d'une solution témoin contenant B1, C1 et C2

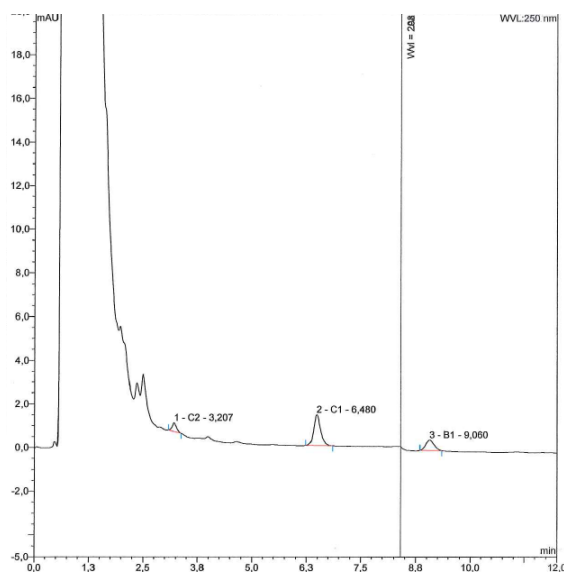


Figure 58 : Chromatogramme du CCAP® pur

Réussir à doser B1, C1 et C2 simultanément selon un même protocole est le but ultime. Un mélange des solutions témoins B1, C1 et C2 est injecté selon les conditions du protocole de dosage de B1 dans le CCAP®. Les paramètres de séparation sont identiques et ceux de détection sont modifiés tels que : 250 nm pendant les 8,4 premières minutes du run, puis 210 nm. Le chromatogramme de la Figure 57 est alors obtenu.

Le chromatogramme de la Figure 57 confirme qu'il est possible de doser les 3 composés simultanément dans les conditions décrites. Les pics semblent bien résolus. Les injections isolées des témoins B1, C1 et C2 ont permis de confirmer qu'il s'agit bien de ces composés en vérifiant leur ordre d'élution et leur  $t_r$ . De plus, le temps de l'analyse est considérablement raccourci. Il faut 10 min pour séparer les trois molécules alors qu'il en fallait presque 20 pour doser C1 et C2 uniquement.

Ces mêmes conditions d'analyse ont été appliquées sur le CCAP® pur. Le chromatogramme de la Figure 58 est alors obtenu. Il montre clairement **qu'il serait possible de doser l'acide  $\beta$ -boswellique et ses deux formes cétoniques dans le CCAP® en routine au Laboratoire Pionneau, et ce en moins de 10 min.**

## VI. Conclusion

Ce chapitre 3.2 s'est articulé autour des études analytiques issues de la bibliographie existante. Elles ont servi de point de départ à mes recherches réalisées au Laboratoire Pionneau. Ce chapitre permet d'étoffer l'étude bibliographique de la fraction résine d'encens dans le but d'apporter un maximum d'informations sur la composition chimique et la proportion des composés dans le CCAP®.

La résine d'encens est caractérisée par une grande diversité naturelle en composés polyterpéniques. Leur présence en forte proportion dans la résine et leur implication dans les études pharmacologiques et toxicologiques m'a amené à sélectionner l'acide  $\beta$ -boswellique (B1) et ses deux formes cétoniques (C1 et C2). Dans ce travail, j'ai appliqué et optimisé les protocoles déjà existants et amélioré les conditions d'analyse. Les trois composés d'intérêt ont été analysés en UHPLC-UV sur deux colonnes différentes.

L'application du protocole de la Pharmacopée Européenne édition 9.0 sur la résine d'encens a permis de mettre en exergue la présence des deux formes cétoniques de l'acide  $\beta$ -boswellique dans le CCAP®. Les chromatogrammes résultant des analyses faites avec la colonne C18 ont révélé un ordre d'élution en accord avec ce qui est annoncé dans la Pharmacopée Européenne. Les paramètres de séparation se sont avérés très satisfaisants.

Pour le composé B1, le protocole a été optimisé en appliquant une colonne différente, la Kinetex® (Phenomenex). C'est une colonne phenylhexyle dite « core-shell » avec un remplissage de silice innovant qui lui permet d'être utilisée dans des systèmes UHPLC. Elle nous a permis de pouvoir détecter dans le CCAP® le composé d'intérêt en moins de 10 min.

Les résultats de cette dernière méthode chromatographique m'ont encouragé à la transposer sur les trois composés B1, C1 et C2. Avec la colonne classique C18, la durée de l'analyse est de 30 min pour seulement les deux composés cétoniques alors qu'avec une colonne phenylhexyle, les résultats obtenus sont très encourageants pour les trois composés. En effet, le temps d'analyse est réduit à 10 min pour séparer les trois molécules du CCAP®. Les paramètres de séparation se sont avérés très corrects. Ainsi, cette méthodologie analytique peut donc être considérée comme une nouvelle approche pour la séparation et l'identification rapide des trois composés du CCAP®, ce qui sera très utile dans le cas d'un dosage en routine.

#### **Les différents acides $\beta$ -boswelliques ont été identifiés avec succès dans le CCAP®.**

Lors de l'optimisation des conditions analytiques, le méthanol a été sélectionné comme le meilleur solvant pour la préparation des témoins et l'extraction de la matière première. Pour doser les molécules d'intérêt dans le CCAP®, l'éthanol 33 % a du être remplacé par du méthanol afin de pouvoir les comparer aux témoins. Ainsi, l'évaporation du CCAP® et la reprise dans le solvant choisi a été effectuée par la technique du chauffage à reflux, méthode adaptée et prometteuse qui m'a permis également de concentrer les molécules d'intérêt. La méthode a été sélectionnée suite à des tests de répétabilité pendant lesquels les échantillons subissent cette étape.

Pour valider la méthode de dosage, la linéarité, la sensibilité, la spécificité, l'exactitude et la justesse de la méthode ont été déterminées. Le dosage des formes cétoniques a été permis par le biais des gammes d'étalonnage. Les concentrations de C1 et C2 dans le CCAP® sont donc estimées à 0,761 mg/kg ( $\approx 10^{-4}$  %) et 0,208 mg/kg ( $\approx 10^{-4}$  %) de CCAP®. Concernant l'acide  $\beta$ -boswellique, une détermination de la LOD permet de rendre un résultat approximatif mais témoignant néanmoins de sa très faible concentration dans le produit fini. La concentration de B1 dans le CCAP® est donc inférieure à 0,386 mg/kg ( $\approx 10^{-4}$  %). Chaque flacon (60 mL) de produit fini contient 43,765  $\mu$ g de C1, 11,972  $\mu$ g de C2 et au maximum 22,2  $\mu$ g de B1.

**Ainsi, le travail analytique réalisé au Laboratoire Pionneau a permis de rendre un résultat sur la quantification des trois composés dans le CCAP®. De plus, d'après les données bibliographiques sur la composition quantitative des triterpènes, nous pouvons émettre l'hypothèse que *Boswellia carterii* serait plus représenté dans le CCAP® que *Boswellia serrata*. Dans l'ordre croissant, pour *Boswellia carterii*, C1, B1 et C2 sont retrouvés, ce qui est également le cas pour le CCAP®.**

Les études citées dans le chapitre 3.1 ont révélé une très faible voire absence de toxicité de la résine d'encens et des acides  $\beta$ -boswelliques dans leur utilisation par voie topique ou systémique chez l'homme.

D'après les résultats des trois composés dosés dans le CCAP<sup>®</sup>, nous pouvons conclure que les quantités administrées chez un patient restent infimes au regard de leur DL<sub>50</sub>. En effet, l'ingestion d'un flacon entier de CCAP<sup>®</sup> correspond pour un individu de 70 kg à l'administration de 0,625  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de poids corporel pour C1, 0,171  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pour C2 et au maximum 0,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pour B1. Ces valeurs sont très loin des doses toxiques étudiées dans les revues bibliographiques. Egalement, les études de toxicité réalisées par voie topique utilisent des formulations contenant 2 à 5 % d'acides  $\beta$ -boswelliques. Le CCAP<sup>®</sup> en contient 10 000 fois moins. Nous sommes donc à des concentrations très inférieures à celles des études de toxicité dans le cas du CCAP<sup>®</sup>. Les résultats du dosage des trois composés d'intérêt permettent de confirmer que leur très faible concentration dans le produit fini implique une absence de toxicité dans le CCAP<sup>®</sup>.





## **Chapitre 4 : Oléo-gommo-résine de myrrhe : Commiphora**

### **Chapitre 4.1 : Dossier bibliographique**

Pour mener à bien ce chapitre concernant spécifiquement le deuxième excipient du CCAP®, j'ai mis en place une méthode associant une recherche bibliographique (chapitre 4.1) aux études analytiques (chapitre 4.2).

La première partie du chapitre propose une présentation générale de la myrrhe avec une description botanique de *Commiphora*, suivie d'une revue bibliographique dédiée à la production de l'oléo-gommo-résine. L'histoire de la myrrhe ainsi qu'une liste de ses utilisations et de ses propriétés sont présentées. La deuxième partie du chapitre est uniquement consacrée à sa fraction résine, dont la composition chimique est développée dans une sous-partie dédiée. Sa connaissance va permettre de dégager les mécanismes d'action des molécules la constituant. Les activités pharmacologiques et toxicologiques sont abordées dans un dernier point.

## I. Présentation générale de *Commiphora*

### A. Origine botanique et distribution géographique

La myrrhe est une oléo-gommo-résine exsudée par les espèces appartenant au genre *Commiphora*, famille des Burséracées, ordre des Sapindales dont la classification est détaillée dans le Tableau 62. Les espèces productrices de myrrhe sont notamment : *Commiphora myrrha*, *C. abyssinica*, *C. africana*, *C. guidottii*, *C. mukul*, *C. opobalsamum*, *C. erythraea* et *C. kataf* [100]. **Deux espèces rentrent dans la composition du CCAP®, *Commiphora myrrha* et *Commiphora mukul*.**

Tableau 62 : Classification phylogénétique de la myrrhe

|               |                   |
|---------------|-------------------|
| Règne         | Plantae           |
| Embranchement | Angiosperme       |
| Classe        | Rosidae           |
| Ordre         | Sapindale         |
| Famille       | Burseraceae       |
| Genre         | <i>Commiphora</i> |
| Espèces       | mukul et myrrha   |

*Commiphora myrrha*, également appelé arbre à myrrhe ou encore balsamier, porte différents noms botaniques comme *Commiphora molmol* ou *Balsamodendrum myrrha*. Originaire du Nord-Est de l’Afrique, notamment de Somalie et du Yémen, le balsamier est à présent répandu en Ethiopie, en Arabie Saoudite, en Inde, en Iran et en Thaïlande [101]. Il peut se développer sous des climats arides, sur des terrains caillouteux et pauvres en matière organique. Cet arbuste touffu, recouvert d’épines, possède de nombreuses branches. Il peut atteindre 3 mètres de haut. Son écorce est vert-foncée ou brune. Ses feuilles trifoliées regroupent des folioles inégales : la terminale est deux fois plus grande que les folioles latérales. Les fleurs jaunes-rouges sont disposées en panicules. Les fruits charnus à noyaux, ovoïdes-ellipsoïdes, sont hérissés de pointes et se fissent en deux valves (Figure 59).

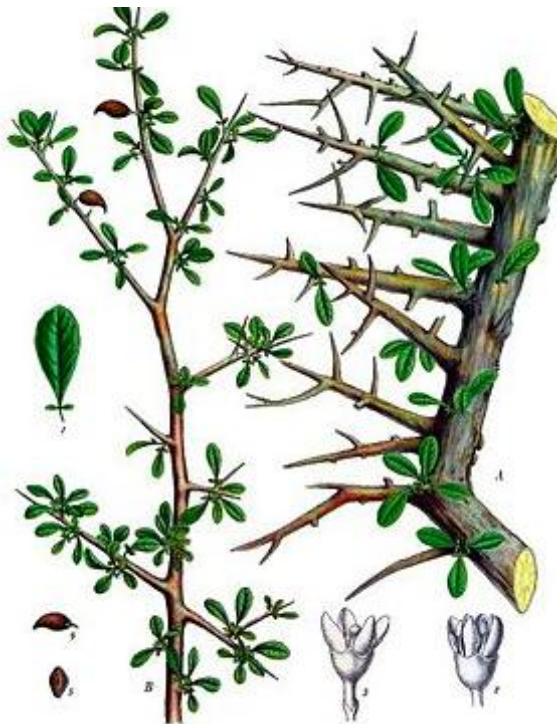


Figure 59 : Dessin et photographie de *Commiphora myrrha*

*Commiphora mukul* est connu sous d’autres noms botaniques tels que *Commiphora wightii*, *Balsamodendrum wightii* ou *Balsamodendrum mukul*. Il a pour nom commun gugulon ou guggulu ou encore guggul. C’est une plante des régions désertiques du Nord-Ouest de l’Inde et du Pakistan. L’arbuste est buissonnant à branches épineuses, avec une écorce cendrée se détachant en fins rouleaux. Il peut atteindre 2 à 3 mètres de haut. Ses feuilles sont trifoliées [102] et ses fleurs sont 4,5-mères serrées en panicules à l’extrémité des tiges, à calice velu et glanduleux et à corolle rouge brunâtre. Les fruits sont des drupes ovoïdes, rouges à maturité (Figure 60).



*Figure 60 : Photographie de Commiphora mukul*

## **B. Production d'oléo-gommo-résine**

Le genre *Commiphora* est connu pour ses exsudations naturelles d'oléo-gommo-résine visqueuse, poisseuse et collante qui durcit au contact de l'air en véritables « larmes de la repentance ». Ces concrétions friables et d'un brun-rougeâtre sont souvent recouvertes d'une efflorescence grise et âcre qui dégage une odeur mixte de citron et de romarin [103]. Cette oléo-gommo-résine est appelée la myrrhe (Figure 61). L'extrait de myrrhe est composé de 25 à 40 % de résine elle-même constituée d'esters triterpéniques, de 30 à 60 % de gomme contenant des protéoglycanes et de 2 à 10 % d'huile essentielle renfermant surtout des sesquiterpènes.



*Figure 61 : Photographie d'oléo-gommo-résine de myrrhe*

Un arbre à myrrhe mature et en bonne santé produit de 250 à 500 g (poids sec) d'oléo-gommo-résine en une saison. En hiver, il peut produire jusqu'à 700-900 g de résine [104]. L'exsudat est récolté au niveau du tronc et des branches, à intervalles réguliers (de novembre à mai), puis séché. Le gemmage, effectué sur des plantes de plus de 5 ans d'âge, correspond à une incision pratiquée sur l'écorce dont un fluide jaune pâle aromatique s'écoule (Figure 62). Le liquide recueilli va durcir lentement pour former des petits morceaux irréguliers aux teintes ambrées [105].



*Figure 62 : Photographie d'une incision réalisée sur l'écorce de l'arbre à myrrhe dont le fluide jaune s'écoule*

### **C. Historique, utilisations et propriétés**

La myrrhe, employée depuis fort longtemps, a une importance historique considérable.

Le mot myrrhe vient d'un mythe grec : Myrrha refusa de vénérer Aphrodite, déesse de l'amour. Par vengeance, la déesse l'amena à commettre l'inceste avec son père Cinyras, roi de Chypre. Quand il s'en rendit compte, il fut horrifié et voulu tuer sa fille. Les dieux, pour la protéger, la transformèrent en arbre. Ainsi, la myrrhe fut associée aux mystères de la nuit et de la mort [106] ; même de nos jours, elle symbolise la purification et la protection. En Egypte, lors des rituels sacrés et de l'embaumement des morts, des préparations à base de myrrhe étaient utilisées [107].

Selon la tradition chrétienne, la myrrhe fut l'un des trois cadeaux apportés par les Rois mages à l'enfant Jésus : « Quand ils aperçurent l'étoile, ils furent saisis d'une très grande joie. Ils entrèrent dans la maison, virent le petit enfant avec Marie sa Mère, se prosternèrent et l'adorèrent ; ils ouvrirent ensuite leurs trésors, et lui offrirent en présent de l'or, de l'encens et de la myrrhe. » (Mathieu II, 2,11). D'après la bible, après la mort de Jésus sur la croix, Nicodème apporte un mélange de myrrhe et d'aloès pour en couvrir le défunt [101].

La myrrhe est utilisée depuis des millénaires en médecine traditionnelle et dans de nombreuses civilisations. Selon Hérodote (Vème siècle avant JC) : « L'Arabie Saoudite est le seul pays qui produit de l'encens et de la myrrhe ». **En Grèce antique**, les soldats se servent de fioles de myrrhe, connues pour ses propriétés **antiseptiques** et anti-inflammatoires, **pour nettoyer les blessures** et pour prévenir une infection ou pour stopper la gangrène.

**Au Moyen-Orient**, depuis des millénaires, elle est aussi utilisée comme anti-inflammatoire pour soulager les douleurs rhumatismales. **Par voie externe, elle n'a pas d'action sur la peau saine mais astringente et antiseptique sur la peau lésée et les muqueuses**. Sa fraction contenant les huiles essentielles est parfois administrée par voie orale pour traiter les diarrhées dont la dysenterie.

**Dans la médecine indienne**, *Commiphora mukul* est considéré comme un tonique, un aphrodisiaque et un dépuratif. Il a la réputation d'améliorer les facultés intellectuelles. Il est également employé dans le traitement des ulcères buccaux, la gingivite et la pharyngite ainsi que pour les troubles digestifs et les règles douloureuses [101 ; 108]. Ses utilisations dans d'autres pathologies sont connues : l'obésité, les désordres lipidiques, les problèmes cardiovasculaires, l'arthrite, les fractures... Le pouvoir hypolipémiant de l'extrait de *Commiphora mukul* fut rapporté dans une étude indienne en 1964 [109]. Conduit sur plus de 2 ans sur des lapins avec une hyperlipidémie induite, ce travail montre que l'oléo-gommo-résine de *Commiphora mukul* prise par voie orale diminue les taux de cholestérol et de phospholipides chez les lapins, les protégeant ainsi de l'athérosclérose [109]. En 1988, le guggulipide, fraction hypolipémiante de l'oléo-gommo-résine de *Commiphora wightii*, a été mis sur le marché en Inde.

**En médecine traditionnelle chinoise**, l'oléo-gommo-résine est utilisée pour ses propriétés astringentes, **antiseptiques** et cicatrisantes, souvent en association avec d'autres plantes sur des blessures traumatiques, des irritations cutanées ou des hémorroïdes. Elle est employée pour stimuler la circulation du sang en cas d'absence de menstruations et elle peut servir d'expectorant en cas de rhume et d'autres infections des voies respiratoires [101 ; 108].

**Dans la médecine tibétaine**, la résine est destinée à traiter les maladies de la peau, les anémies, les œdèmes et les lourdeurs d'estomac. **En lotion, *Commiphora mukul* est utilisé contre les ulcères cutanés**. En gargarisme, il est employé dans le cadre des soins dentaires. Le guggul peut servir en fumigation lors d'infections des voies aériennes. L'oléo-gommo-résine trouve sa place pour lutter contre les rhumatismes, les troubles urinaires, l'obésité, la syphilis ou encore les désordres neurologiques [109].

**Dans la médecine arabopersane**, le guggul est connu pour ses propriétés anti-inflammatoires et antiarthritiques ainsi qu'en cas d'ulcères et de ballonnements.

Dans diverses Pharmacopées, l'extrait de myrrhe est appliqué en usage local dans le traitement des gingivites, des aphtes, des stomatites, des inflammations mineures de la peau ou encore des plaies bénignes. Aux États-Unis, la myrrhe fait déjà partie de la Pharmacopée officielle, employée sous forme de rince-bouche. En Europe, un draft de monographie de l'oléo-gommo-résine de myrrhe a été publié par la European Medicines Agency (EMA) en 2010. **En France, l'ANSM a reconnu les vertus de la teinture de myrrhe dans le cadre des traitements des petites plaies, en cas de nez bouché et de rhume et enfin comme antalgique dans les affections de la cavité buccale et/ou du pharynx [67 ; 110].**

Actuellement, grâce à ses propriétés mécaniques, l'oléo-gommo-résine de *Commiphora mukul* a des applications pharmaceutiques, cosmétiques et dans l'industrie des compléments alimentaires. La myrrhe sert d'excipient dans des formulations galéniques comme agent liant et désintégrant des comprimés ou encore agent de suspension et d'émulsion [109].

De plus, la myrrhe est incorporée à de nombreuses préparations médicinales destinées à traiter les inflammations légères des muqueuses de la bouche, du pharynx ainsi que pour traiter le muguet des nourrissons. Plusieurs dentifrices vendus dans les magasins de produits naturels contiennent de la myrrhe et de nombreuses poudres dentaires contenant 10 % de myrrhe sont commercialisées [67 ; 108].

L'huile essentielle de myrrhe est vendue pour ses propriétés cicatrisantes, antiseptiques, antibactériennes (dysenterie, muguet) ou encore pour son action anti-inflammatoire quand elle est appliquée par massage pour soulager des douleurs liées à l'arthrose et aux raideurs articulaires. La fraction sesquiterpénique de la myrrhe possède des propriétés anesthésiques locales. La myrrhe est également utilisée en parfumerie, entrant dans la composition des parfums de type oriental en augmentant la sensualité des notes de rose.



## II. Fraction résineuse

Dans cette deuxième partie, mon étude bibliographique s'arrête à la fraction résine de myrrhe pour les raisons évoquées au chapitre 2. La composition chimique de la myrrhe est d'abord déterminée afin de connaître les molécules actives présentes dans ces espèces. Ensuite, pour répondre à la gestion des risques énoncés précédemment dans les nouvelles Lignes Directrices, ses activités pharmacologiques et ses toxicités sont étudiées, dernier objectif de ce travail bibliographique.

Depuis les années 1940 et 1950, une connaissance plus approfondie de la composition chimique des oléo-gommo-résines est possible grâce à l'évolution des techniques chromatographiques et spectroscopiques. De nos jours, des informations sur leur exsudation, leurs fonctions dans les plantes et leur structure chimique sont disponibles. Cependant, le nombre d'articles concernant la composition chimique de cette fraction résine est moindre que dans le cas de l'encens. Tous les liens n'ont pas été faits entre les premières extractions des molécules résineuses et l'analyse chromatographique de la résine dans les années 2010.

### A. Composition chimique

Des publications anciennes s'attardent sur l'extraction des oléo-gommo-résines de myrrhe afin d'établir une liste de leurs composés. Des premiers traitements chimiques appliqués à la myrrhe ont permis d'obtenir une importante fraction soluble dans l'éther alors que seulement une petite partie y est insoluble. La fraction éthérée de la résine contient les acides  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -commiphoriques, les acides commiphoriniques et les  $\alpha$ - et  $\beta$ -heerabomyrrhols. Par contre, la fraction insoluble contient des acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -heerabomyrrholiques [111].

De nouveaux composés sont ensuite découverts dans la fraction résineuse comme par exemple l'heerboresène, la commiférine, l' $\alpha$ -amyrone et la 3-épi- $\alpha$ -amyrine. Les différentes molécules identifiées sont des stérols et leurs dérivés : le  $\beta$ -sitostérol ayant une structure proche du cholestérol et le compestérol qui est l'un des phytostérols les plus communs [111 ; 112].

Une revue scientifique récente apporte des informations détaillées sur la résine de myrrhe [110] et classe les molécules précédemment citées en trois familles chimiques : les stéroïdes, les lignanes et les guggultétrols qui appartiennent à une nouvelle famille de lipides. L'ensemble des composés présents dans la résine de *Commiphora mukul* sont classés dans les Tableaux 63, 64 et 65.

Tableau 63 : Première famille chimique isolée de *Commiphora mukul*

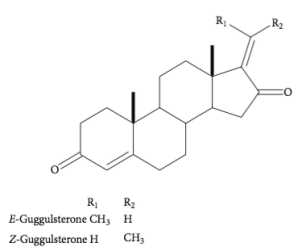
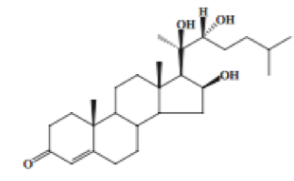
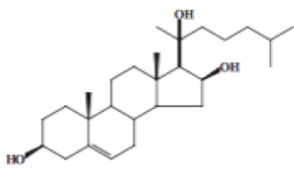
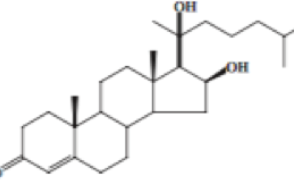
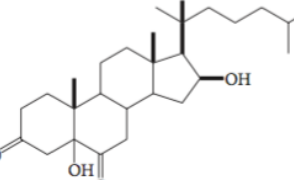
| Stéroïdes        |                    |   |
|------------------|--------------------|---|
| Famille chimique | Nom de la molécule | Structure chimique  |
| Guggulstérones   | E-guggulstérone    |  <p> <math>R_1</math>    <math>R_2</math><br/> E-Guggulsterone <math>CH_3</math>    <math>H</math><br/> Z-Guggulsterone <math>H</math>    <math>CH_3</math> </p> |
|                  | Z-guggulstérone    |   |
|                  | Guggulstérol-I     |   |
|                  | Guggulstérol-II    |    |
|                  | Guggulstérol-III   |    |
|                  | Guggulstérol-IV    |    |

Tableau 63 : Première famille chimique isolée de *Commiphora mukul*

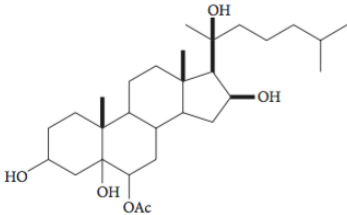
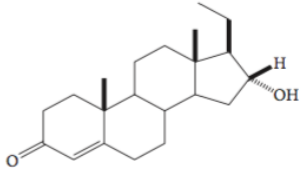
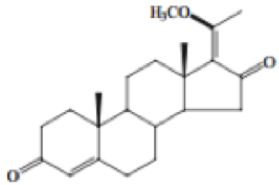
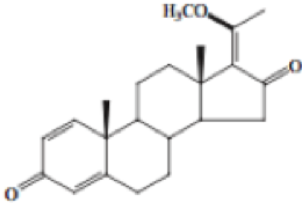
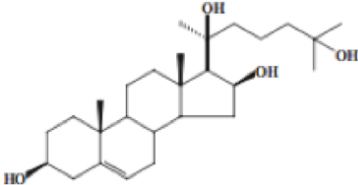
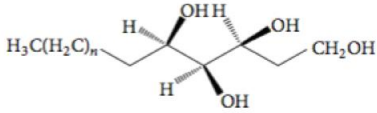
| Stéroïdes        |                        |   |
|------------------|------------------------|---|
| Famille chimique | Nom de la molécule     | Structure chimique  |
| Guggulstérones   | Guggulstérol-V         |    |
|                  | Guggulstérol-VI        |    |
|                  | Guggulstérone-M        |  |
|                  | Déhydroguggulstérone-M |  |
|                  | Guggulstérol-Y         |  |



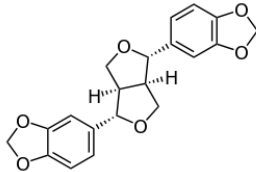
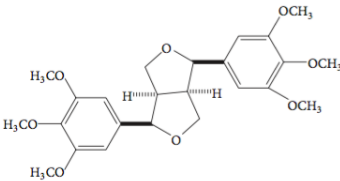
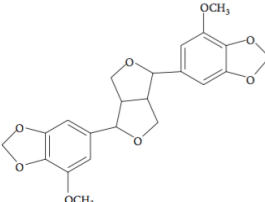
Tableau 64 : Deuxième famille chimique isolée de *Commiphora mukul*

| Guggultétrols    |                          |  |
|------------------|--------------------------|--|
| Famille chimique | Nom de la molécule       | Structure chimique   |
| Tétrols          | Octadecan-1,2,3,4-tétrol | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n \text{---} \overset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}} \text{---} \overset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}} \text{---} \overset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}} \text{---} \text{CH}_2\text{OH}$ <p>Octadecan-1,2,3,4-tétrol <math>n = 13</math><br/>           Nonadecan-1,2,3,4-tétrol <math>n = 14</math><br/>           Eicosan-1,2,3,4-tétrol <math>n = 15</math></p> |
|                  | Nonadecan-1,2,3,4-tétrol |  |
|                  | Eicosan-1,2,3,4-tétrol   |  |
|                  | Guggultétrol-18          |  <p>Guggultetrol 18 <math>n = 12</math><br/>           Guggultetrol 20 <math>n = 14</math></p>  |
|                  | Guggultétrol-20          |  |

Les guggultétrols comportent de longues chaînes de tétrols linéaires et aliphatiques avec des fonctions hydroxyles placées en C1, C2, C3 et C4. Ils sont au nombre de 5 dans la résine de myrrhe et à ce jour, peu d'études ont été réalisées sur cette deuxième famille chimique (Tableau 64).

Les lignanes sont des composés phénoliques formés de deux unités monolignols (Tableau 65). Ces unités de base servent aussi aux végétaux pour synthétiser la lignine, un long polymère ramifié, présente dans les parois des vaisseaux conducteurs. Les lignanes présentent une activité optique, ce qui n'est pas le cas de la lignine et sont extraits facilement du bois avec du méthanol [113]. Ainsi, la sésamine et la diyangambine ont été identifiées.

Tableau 65 : Troisième famille chimique isolée de *Commiphora mukul*

| Lignanes   |  |
|--|--|
| Nom de la molécule   | Structure chimique   |
| Sésamine   |    |
| Diayangambine  |    |
| 5,5-tetrahydro-1H,3H-furo[3,4-c]furan-1,4-diylbis[7(methoxy)-1,3-benzodioxole] |  |

La résine de myrrhe est donc constituée d'un mélange de stéroïdes, de guggultétrols et de lignanes. Cette dernière famille n'est pas sélectionnée pour mon étude car ses composés ne sont pas des marqueurs spécifiques de la résine de myrrhe. Si très peu d'articles parlent de la répartition quantitative des composés de la résine, les stéroïdes et notamment les E et Z-guggulstérones y sont considérés comme la fraction active. A l'heure actuelle, ils font l'objet de nombreuses recherches. Deux publications récentes intègrent d'autres molécules dans la fraction bioactive de la résine de myrrhe, telles que des phytostérols qui n'avaient jamais été identifiés auparavant. Les acides commiphoriques et commiphoriniques cités dans des publications anciennes (1967 et 1989) ne sont plus mentionnés en 2015 [110]. Il est possible que ces molécules aient tout simplement été intégrées dans une nouvelle famille chimique, sous une autre dénomination. En effet, la classification internationale des molécules chimiques a beaucoup évolué depuis la découverte des acides commiphoriques et commiphoriniques.

### III. Etude pharmacologique de l'oléo-gommo-résine et des guggulstérones

Mes recherches bibliographiques se sont concentrées sur les E- et Z-guggulstérones, composés actifs de la partie résine, utilisés pour leurs propriétés pharmacologiques. En effet, des données scientifiques de plus en plus nombreuses suggèrent que l'extrait de Commiphora posséderait des propriétés hypolipémiantes. C'est pour cela que l'oléo-gommo-résine de myrrhe, et plus précisément les E- et Z-guggulstérones, ont été testées dans un certain nombre de maladies dans lesquelles le métabolisme lipidique est impliqué, comme l'hyperlipidémie et l'hypercholestérolémie.

Dans les différents travaux, les études pharmacologiques sont menées soit sur l'extrait d'oléo-gommo-résine de myrrhe, soit sur les E- et Z-guggulstérones ou encore sur la fraction guggulipide qui correspond à un ensemble de composés stéroïdiens.

#### A. Mécanismes d'action expliquant les effets hypolipémiants

La connaissance précise des modes d'action des guggulstérones en fait des sujets de recherche en vue d'applications pour la médecine de demain. Les travaux suivants permettent d'envisager leurs mécanismes d'action hypolipémiants.

##### 1. Action sur le métabolisme des acides biliaires et du cholestérol

Les guggulstérones agiraient à plusieurs niveaux sur le métabolisme des lipides.

Tout d'abord, ces molécules semblent être des antagonistes des récepteurs farnésoïdes X (FXR), membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, appelés aussi récepteurs des acides biliaires. Chez l'Homme, le FXR est exprimé notamment dans le foie, les glandes surrénales ou encore les intestins et il est impliqué dans la régulation de nombreuses voies métaboliques (lipides, glucose, acides biliaires). De nombreux facteurs dont les guggulstérones modulent son expression. Ainsi, le FXR contrôle l'expression des gènes codants pour l'enzyme hépatique 7- $\alpha$ -hydroxylase, elle-même impliquée dans la synthèse d'acides biliaires issus du catabolisme du cholestérol. Les guggulstérones favoriseraient le catabolisme du cholestérol en acides biliaires [114 - 118]. A contrario, les guggulstérones potentialiseraient l'expression du gène codant pour la pompe d'exportation des sels biliaires, favorisant ainsi l'excrétion des acides biliaires dans les canalicules biliaires (Figure 63).

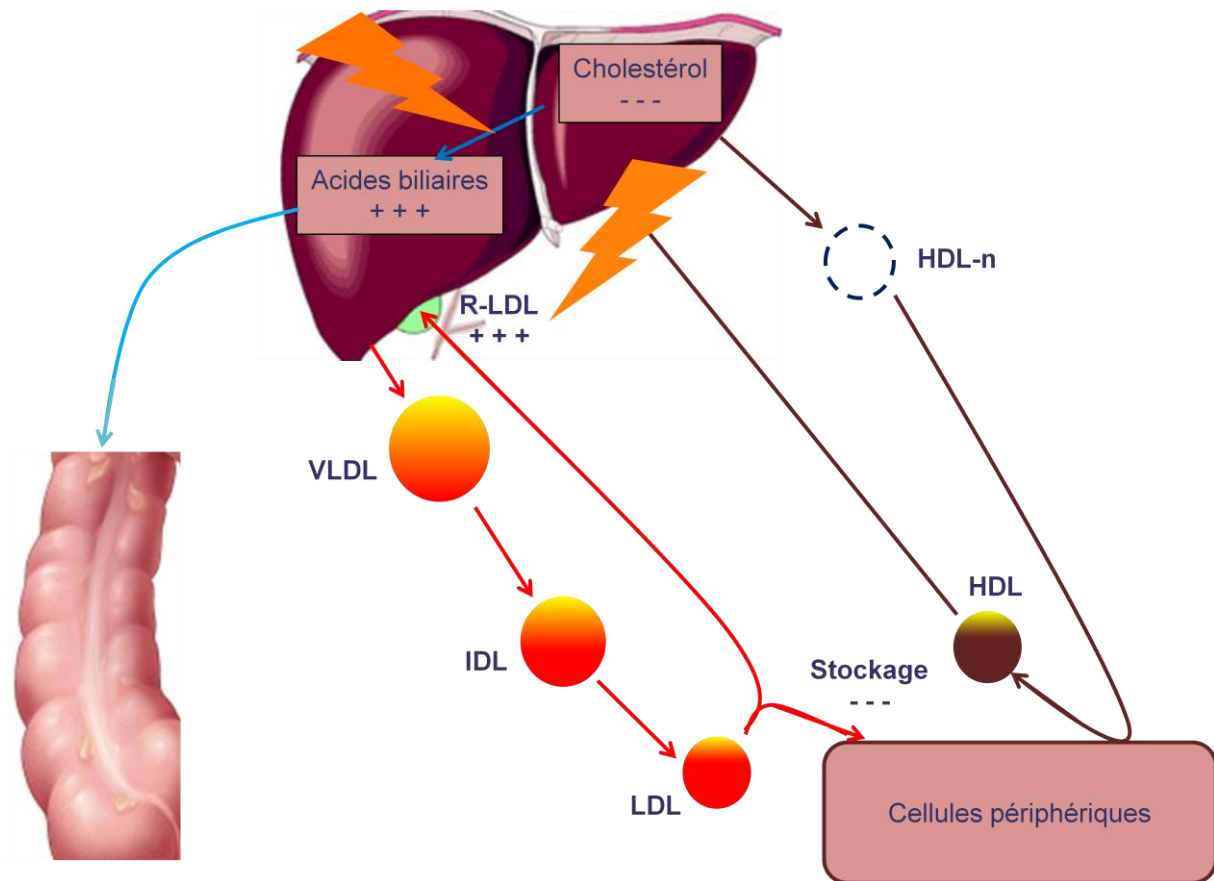


Figure 63 : Schéma simplifié de la physiologie du métabolisme lipidique. Les éclairs représentent les lieux d'action des guggulstérones

A ce jour, d'autres mécanismes impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique sont à l'étude. Les guggulstérones seraient des antagonistes des récepteurs BAR des acides biliaires et elles activeraient les récepteurs membranaires de fixation du LDL-Cholestérol au niveau hépatique. Une étude préclinique va dans le sens de cette dernière hypothèse puisqu'un traitement par du guggulipide chez le rat a entraîné une diminution des triglycérides et une augmentation du HDL-Cholestérol [114 - 118].

**Toutes ces informations tendent à avancer que les guggulstérones auraient une activité hypolipémiante.**

## 2. Action sur la fonction thyroïdienne

Chez des rats, l'administration de la Z-guggulstérone entraîne une stimulation de l'activité thyroïdienne par augmentation de la captation d'iodures par la thyroïde ainsi que des taux des enzymes thyroïdiennes (peroxydase et protéase). **La thyroïde étant impliquée dans la régulation du métabolisme lipidique, cela pourrait expliquer l'action hypolipémiante de l'oléo-gommo-résine de myrrhe.** Cette stimulation de l'activité thyroïdienne par la Z-guggulstérone ne se ferait pas par l'intermédiaire de l'axe hypothalamo-hypophysaire mais par action directe sur la glande [104].



### 3. Action sur le système catécholaminergique

D'autres travaux ont montré que les taux de catécholamines sont moins élevés chez les lapins atteints d'hypercholestérolémie que chez les lapins sains. L'administration de guggulipide chez les lapins malades entraîne une remontée des taux de catécholamines. Cette action stimulante sur le système catécholaminergique pourrait être liée aux effets hypolipémiants du guggulipide [119].

**En conclusion, il semblerait que les guggulstérones soient responsables de l'activité hypolipémiante de la fraction résine de myrrhe et ce, par leurs effets sur le métabolisme des acides biliaires et du cholestérol, et par leur action sur les fonctions thyroïdiennes et sur le système catécholaminergique. Il reste à ce jour encore beaucoup d'interrogations.**

### B. Applications des effets thérapeutiques sur différentes pathologies

Ce paragraphe porte sur les applications cliniques des propriétés hypolipémiantes des E- et Z-guggulstérones extraites de la résine de myrrhe. Les travaux cités restent des pistes de recherche. Leur liste n'est pas exhaustive et n'a pas toujours conduit à la commercialisation d'un nouveau produit de santé. Différentes voies d'administration permettent de mettre en évidence le panel d'applications possibles de ces composés en santé humaine.

De nombreuses études effectuées chez l'animal et chez l'homme ont relevé l'intérêt du guggulipide et plus particulièrement des guggulstérones. Ces molécules réduiraient les taux élevés de lipides sanguins tels que le cholestérol total, LDL-Cholestérol et triglycérides.

#### 1. Pouvoir hypolipémiant

Chez les lapins et les singes présentant une hyperlipidémie provoquée, le guggulipide diminue les taux de cholestérol et de triglycérides en augmentant le rapport HDL-Cholestérol/LDL-Cholestérol et en diminuant les lésions athéromateuses. Ce même effet est retrouvé chez l'homme. Une diminution de 10 à 30 % des taux des lipides sanguins et une baisse du rapport HDL-Cholestérol/LDL-Cholestérol (indice d'athérogénicité) sont observées [109].

D'autres expériences suggèrent que le guggulipide serait efficace dans les hyperlipidémies de type IIb et IV selon la classification de Fredrickson ainsi que dans les hypercholestérolémies familiales combinées. En effet, 400 mg de guggulipide sont administrés 3 fois par jour, pendant 4 semaines, à 21 patients présentant une hypertension artérielle, un diabète ou une autre pathologie cardiovasculaire, seules ou associées. Une diminution importante du cholestérol et des triglycérides est constatée chez 15 des 21 patients [109].

Deux guggulipides commercialisés aux Etats-Unis et en Inde ont fait l'objet d'études essayant de prouver leur efficacité.

**Dans la première étude**, les chercheurs ont testé le Guggulipid<sup>®</sup>, un complément alimentaire américain à base de guggul, chez des patients américains souffrant d'hypercholestérolémie modérée et ayant une alimentation occidentale. Les résultats montrent globalement que le Guggulipid<sup>®</sup> aurait tendance à augmenter le LDL-Cholestérol et à diminuer le HDL-Cholestérol. Néanmoins, quelques patients ont présenté une diminution du taux de LDL-Cholestérol allant jusqu'à 18 %. Des analyses secondaires ont révélé une diminution modeste des niveaux de triglycérides. Ce constat est d'ailleurs confirmé dans la littérature qui montre que Guggulipid<sup>®</sup> réduirait les taux de triglycérides de 12 à 24 % chez les patients atteints d'hypercholestérolémie primaire et d'hypertriglycéridémie [120].

**Une deuxième étude** réalisée sur une population indienne étudie l'effet de leur propre guggulipide commercialisé en Inde sous le nom de spécialité Guglip<sup>®</sup>, sur les paramètres lipidiques. Deux cents quarante cinq patients présentant une hyperlipidémie ont été traités par guggulipide. Les résultats montrent une diminution des taux de LDL-Cholestérol comprise entre 60 à 80 %, résultat bien supérieur à celui de l'étude américaine. Il a été également prouvé que le guggulipide possède une activité hypolipémiante comparable à celle du clofibrate chez 80 % des patients, expliquant l'octroi de l'AMM en 1986 pour cette spécialité Guglip<sup>®</sup>. Elle se présente sous la forme de comprimés dosés à 500 mg, indiqués dans le traitement des hyperlipidémies combinées à la posologie de 1500 mg/jour en trois administrations espacées de 8 h [109].

**Ces résultats contredisent donc les études que nous avons présentées auparavant mais cette discordance pourrait être liée à la différence de mode alimentaire entre les différentes populations étudiées. En effet, en Inde, les patients ont consommé moins de lipides et plus de fibres que ceux de l'étude américaine. De plus, les protocoles des deux essais cliniques et les deux spécialités testées sont différents, ce qui pourrait expliquer en partie la divergence dans leurs résultats. Le facteur génétique des deux populations reste un paramètre à ne pas négliger.**

## 2. Autres effets

Le guggulipide a d'autres applications, notamment la prise en charge de l'acné des peaux grasses, à des doses comprises entre 25 et 50 mg pendant 3 semaines par voie orale. Il est également employé pour traiter les rhumatismes inflammatoires articulaires et tendineux, la perte de poids, et la prévention des complications de la maladie athéromateuse [119].

Une controverse concerne l'utilisation du guggulipide dans le cadre de la perte de poids. Un rapport d'expertise de l'ANSM de juillet 2012 stipule que « Des produits qui n'ont pas été soumis à l'évaluation des autorités sanitaires sont également disponibles sur Internet. Il n'est pas démontré que le bénéfice qu'ils apportent soit supérieur aux risques qu'ils génèrent. C'est pourquoi leur

utilisation est fortement déconseillée. Il s'agit notamment des produits vendus sur Internet comme compléments alimentaires qui contiennent des plantes ou constituants isolés de plantes n'ayant pas fait l'objet d'une démonstration d'un rapport efficacité/sécurité favorable dans l'indication de la perte de poids (hydroxyévodiamine, guggulstérones, *Garcinia cambodgia*) » [121].

### C. Utilisation commerciale

Sachant que l'excipient du CCAP® est utilisé en voie externe, des crèmes commercialisées à base de myrrhe ont été recensées. Par exemple, le Sérum de Létika contient un extrait de guggul afin de réduire la profondeur et l'intensité des rides. En France, le guggul est disponible en poudre. Celle-ci est mise en capsule par de grandes marques comme Arkopharma sous le nom de gugulon®. Pas toujours accessible en pharmacie, il est facile de s'en procurer sur le marché international et sur des sites internet spécialisés dans le bien-être et la santé.

Il est important de noter que l'administration de guggulipide chez les enfants est à éviter, pendant la grossesse et en cas de troubles hépatiques chroniques ou aigus et de troubles thyroïdiens.

**En résumé, la drogue de l'arbre à myrrhe est son oléo-gommo-résine et son activité biologique sur les lipides repose donc la fraction résine. Le guggulipide, composé des E- et Z-guggulstérones, présente une activité hypolipémiante. A ce jour, différents mécanismes expliqueraient cette action sur le cholestérol : par stimulation de la fonction thyroïdienne et/ou par activation des récepteurs aux acides biliaires. Le mécanisme exact reste encore inconnu. Les effets thérapeutiques ne sont pas toujours prouvés de par la discordance entre les résultats issus de différents essais cliniques.**

## IV. Etude toxicologique de l'oléo-gommo-résine et des guggulstérones

**L'intérêt principal de cette partie est de savoir si les extraits de Commiphora et plus particulièrement les E- et Z-guggulstérones entraînent un risque sur la santé humaine de par leur potentielle présence dans les excipients du CCAP®. La littérature scientifique fournit un certain nombre d'études précliniques et cliniques me permettant de répondre à la question posée.**

A ma connaissance, aucune étude de toxicité sur la partie résine seule n'a été effectuée. Néanmoins, de nombreuses études de toxicité ont été réalisées afin de définir la DL<sub>50</sub> et la sécurité d'emploi de l'oléo-gommo-résine de myrrhe et des guggulstérones.

## A. Toxicité aiguë et subaiguë

Aucun signe visible de toxicité et aucune mortalité n'ont été observés par voie orale chez des souris jusqu'à la dose de 2 g/kg d'extrait brut de myrrhe [112].

Une étude préclinique a évalué la DL<sub>50</sub> chez la souris et le hamster. Des doses croissantes d'extrait brut de myrrhe, comprises entre 180 mg/kg et 10 000 mg/kg, ont été administrées par voie orale à ces animaux. Ainsi la DL<sub>50</sub> a été définie pour une valeur de 3,139 g/Kg [122].

Dans un esprit éthique, des chercheurs ont déterminé à partir d'un extrait de *Commiphora molmol* une dose tuant moins de la moitié des animaux testés et ont ainsi calculé par extrapolation une DL<sub>50</sub>. A partir de l'équation de régression linéaire, La DL<sub>50</sub> est estimée à 15,5 g/kg [123].

Chez le rat, le chien et le singe, la spécialité Guglip® à base de guggulstérones semble dépourvue de toxicité aiguë et subaiguë. Elle n'est ni mutagène, ni tératogène chez ces mammifères [122 ; 123].

**Ces résultats tendent à conclure que l'oléo-gommo-résine de myrrhe présente une très faible toxicité aiguë et subaiguë par voie orale.**

## B. Toxicité chronique et sécurité d'emploi

### 1. Evaluation en médecine traditionnelle

Il a été mentionné dans les textes indiens que l'administration par voie orale de l'extrait de *Commiphora mukul* peut parfois conduire à des éruptions cutanées, des menstruations irrégulières, des diarrhées, des maux de tête, des nausées légères et une toxicité hépatique [124]. Afin de limiter les effets secondaires, la médecine traditionnelle d'Inde décrit un certain nombre de procédés de purification permettant également d'améliorer l'activité thérapeutique, leurs textes ayant rapporté que le guggul doit être purifié avant d'être incorporé dans des formulations à base de plantes [125].

### 2. Evaluation lors d'essais précliniques

Une étude de toxicité chronique visant à évaluer l'innocuité de l'extrait d'oléo-gommo-résine de *Commiphora molmol* sur des animaux après administration orale a été décrite [123]. Les auteurs ont jugé les effets de l'extrait sur le poids corporel, le poids relatif des organes et les paramètres biochimiques des animaux. Des analyses histopathologiques du cœur, des poumons, du foie, des reins, de la rate, de l'estomac et des organes sexuels mâle et femelle ont été réalisées. Aucun signe de toxicité n'est signalé. De plus, son administration à des doses comprises entre 125 et 500 mg/kg n'entraîne aucune mutagénicité [123].

### 3. Evaluation lors d'essais cliniques

Les essais cliniques réalisés avec des extraits d'oléo-gommo-résine de myrrhe standardisés permettent de constater des effets secondaires transitoires tels que des éruptions cutanées, des diarrhées et des menstruations irrégulières [126]. Un autre rapport corrobore ces effets indésirables [127]. Sur 22 personnes recevant 2160 mg d'extrait de myrrhe par jour pendant 12 semaines, **10 personnes ont ressenti des effets secondaires comme des troubles gastro-intestinaux, de la fatigue et des éruptions cutanées** [127]. Ce dernier effet indésirable a été signalé dans d'autres études, en administrant 1 à 2 g de guggulipide par jour pendant un mois. Aucune toxicité digestive n'est notée dans ce travail [128].

Une dernière étude a montré que l'administration de la Z-guggulstérone à la dose de 75mg/jour pendant 4 à 12 semaines n'entraîne aucun effet indésirable [109]. **Les effets secondaires de la Z-guggulstérone tels que nausées, éructations et parfois diarrhées semblent être réduits par rapport à ceux observés par la prise d'oléo-gommo-résine.**

**En résumé, les effets indésirables énoncés précédemment sont retrouvés dans les conditions de prise par voie orale d'extrait brut de myrrhe, alors que le CCAP® est utilisé par voie topique. A ma connaissance, aucune donnée n'est accessible sur la toxicité en voie externe.**

**Il est important de rappeler que l'extrait de myrrhe est approuvé par la FDA pour l'utilisation dans l'alimentation et la santé bucco-dentaire. Cet extrait a reçu le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) et est reconnu comme ingrédient de saveur par l'EMA [90]. En cosmétologie, le dentifrice Merfluan® à base de myrrhe est déjà commercialisé. En médecine pédiatrique, la teinture de myrrhe est utilisée en Allemagne pour traiter les candidoses buccales ou le muguet, très fréquent chez le nourrisson [108]. L'utilisation d'extrait de myrrhe à des doses thérapeutiques semble donc être sans danger et non toxique.**

## V. Conclusion

Ce chapitre 4.1 concerne spécifiquement la myrrhe, deuxième excipient retrouvé dans la formulation du CCAP®. Mon travail s'est focalisé sur sa fraction résine, majoritairement présente dans le produit fini. J'ai réalisé une revue approfondie des connaissances acquises sur cette fraction pour faire un état des lieux et une actualisation de la bibliographie déjà existante.

La fraction résine de myrrhe, très riche en différents composés, peut être divisée en plusieurs familles moléculaires. Elle contient à la fois des lignanes, des guggultétrols et des stéroïdes. Il est rapporté que cette dernière famille possède des composés bioactifs. Les données bibliographiques concernant la résine de myrrhe m'amènent à miser sur les deux isomères E- et Z-guggulstérone, composés étudiés pour leurs activités pharmacologiques et donc pour évaluer leur toxicité.

Ainsi, une synthèse des études bibliographiques concernant la toxicologie des extraits d'oléo-gommo-résine de myrrhe ainsi que des E- et Z-guggulstérones a été réalisée afin de mettre en évidence le risque encouru sur la santé humaine. Les points suivants permettent de répondre à la question concernant la toxicité de la résine de myrrhe. **Acceptée comme relativement sûre, la myrrhe est utilisée comme substance naturelle aromatisante et elle est approuvée par la FDA et l'EMA. La DL<sub>50</sub> évaluée chez les rats est de 2 g/kg, ce qui témoigne d'une très faible toxicité de ce produit en cas d'ingestion. Ces données de toxicité par voie systémique permettent d'estimer l'impact sur la santé humaine d'un mésusage du CCAP® qui serait par exemple administré par voie orale à la place de la voie topique. Dans ce cas précis, nous nous attendons à une faible toxicité en cas d'ingestion. A ma connaissance, aucune donnée n'est accessible sur la toxicité par voie topique, bien que ce soit la voie d'administration indiquée dans l'AMM du CCAP®.**

Une revue bibliographique concernant des études pharmacologiques menées sur les résines de myrrhe a été rapportée dans ce manuscrit. L'idée principale qui en ressort est la variabilité et la complexité des mécanismes d'action. L'extrait de Commiphora et les E- et Z-guggulstérones interviendraient sur différentes voies du métabolisme lipidique par des modes d'action variés en inhibant ou potentialisant certains gènes codant pour des récepteurs ou des pompes d'exportation. A ce jour, les guggulstérones font l'objet d'une recherche scientifique de par leurs propriétés pharmacologiques dans le traitement des hyperlipidémies. **Cette application corrobore l'usage traditionnel des oléo-gommo-résines de myrrhe par voie interne. Ces données appuient également l'absence de toxicité de l'oléo-gommo-résine de myrrhe utilisée par voie orale.** Néanmoins, il reste encore des axes d'amélioration concernant leur utilisation en tant que complément alimentaire.

**Ce travail bibliographique a permis de répondre à mon deuxième objectif concernant le respect de l'application de la réglementation sur la gestion des risques pour les excipients utilisés dans les médicaments à usage humain.**

**Afin de compléter toutes ces données, le Laboratoire Pionneau a voulu identifier et surtout quantifier les E- et Z-guggulstérones dans le CCAP®. Les données expérimentales ainsi recueillies pourront être comparées aux données de toxicité dans la littérature (DL<sub>50</sub>).**



## **Chapitre 4 : Oléo-gommo-résine de myrrhe : Commiphora**

### **Chapitre 4.2 : Dossier analytique**



Pour appuyer et consolider ce travail de revue littéraire, j'ai entrepris un travail analytique destiné à caractériser et quantifier les deux molécules actives de la résine de myrrhe, potentiellement retrouvées dans le CCAP® : E- et Z-guggulstérones. Pour ce type de composés organiques non volatils, la technique de séparation la plus appréciée est l'HPLC. Le Laboratoire Pionneau étant équipé d'une UHPLC-UV, j'ai pu mettre au point une méthode d'identification et de quantification des composés d'intérêt de la résine de myrrhe.

Ce chapitre est construit de la façon suivante. Une partie introductive permet d'aborder les caractères physico-chimiques de ces substances. Je me suis ensuite intéressée aux techniques analytiques de la bibliographie visant à identifier et quantifier ces différentes molécules, qui ont servi de base à la sélection de l'appareillage et des conditions analytiques appliquées dans mes protocoles. Pour finir, les résultats obtenus au Laboratoire Pionneau clôturent ce chapitre.

## I. Caractéristiques physico-chimiques des E- et Z-guggulstérones

Les caractéristiques physico-chimiques des E- et Z-guggulstérones conditionnent leur extraction à partir des plantes ainsi que leur méthode de séparation et de détection.

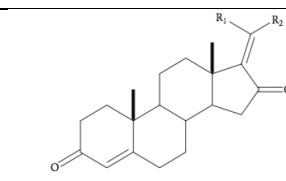
Les E- et Z-guggulstérones sont deux stéréoisomères possédant un gros squelette carboné tétracyclique, dérivant de la structure de base stéroïdienne. Elles sont agencées en 3 cycles à 6 carbones et 1 cycle à 5 carbones. La richesse en groupements carbonés au regard des groupements polaires (-OH, -COOH) confère à ces molécules un caractère fortement apolaire (Tableau 66).

Ces deux composés possèdent peu de groupements chromophores :

- ♣ 1 double liaison C=C intracyclique conjuguée avec une double liaison C=O
- ♣ 1 double liaison C=C extracyclique conjuguée avec une double liaison C=O

Les électrons  $\pi$  des doubles liaisons C=O conjuguées à la double liaison C=C sont responsables de la longueur d'onde de détection de ces molécules : la plage d'absorption oscille entre 246 et 254 nm.

Tableau 66 : Structure chimique des E- et Z-guggulstérones

| Stéroïdes        |                    |   |
|------------------|--------------------|---|
| Famille chimique | Nom de la molécule | Structure chimique  |
| Guggulstérones   | E-guggulstérone    | <br><small>E-Guggulsterone CH<sub>3</sub> H<br/>Z-Guggulsterone H CH<sub>3</sub></small> |
|                  | Z-guggulstérone    |   |

Les deux isomères étudiés sont des molécules à caractère acide, propriété essentiellement conférée par les deux doubles liaisons C=O. Ils sont très lipophiles de par leur richesse en carbones aliphatiques, justifiant ainsi une faible solubilité dans l'eau. Ils sont par contre très solubles dans l'éthanol absolu et le méthanol. Les caractéristiques physico-chimiques connues de ces deux molécules sont résumées dans le Tableau 67.

Tableau 67 : Caractéristiques physico-chimiques des E- et Z-guggulstérones

| Caractères chimiques              | E-guggulstérone                     | Z-guggulstérone                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Formule brute                     | $C_{21}H_{28}O_2$                   |                                     |
| Masse molaire moléculaire (g/mol) | 312,453                             |                                     |
| Nomenclature                      | E-4,17(20)-pregnadienne-3, 16 dione | Z-4,17(20)-pregnadienne-3, 16 dione |
| Plage d'absorption (nm)           | 246 - 254                           |                                     |

### A. Études analytiques connues en HPLC

Dans le but d'obtenir le maximum d'informations concernant les méthodes analytiques permettant leur quantification, des études bibliographiques ont été sélectionnées, dans lesquelles la résine de myrrhe est extraite selon divers processus d'extraction puis analysée selon différentes techniques analytiques telles que l'HPLC-UV.

#### 1. Extraction des différentes fractions de l'oléo-gommo-résine de myrrhe

La principale difficulté réside dans la nature même des résines, chimiquement très complexes. En effet, les résines sont constituées de nombreux composés dont certains possèdent des structures très similaires. Il est rapporté que la séparation chromatographique complète des résines est quasiment impossible et que les signaux de certains composés ne seraient pas ou partiellement résolus. Ainsi, l'objectif de ce paragraphe est de décrire des protocoles d'extraction performants de

manière à obtenir une meilleure séparation des composés en chromatographie lors de l'application sur le CCAP®.

a) *Première méthode*

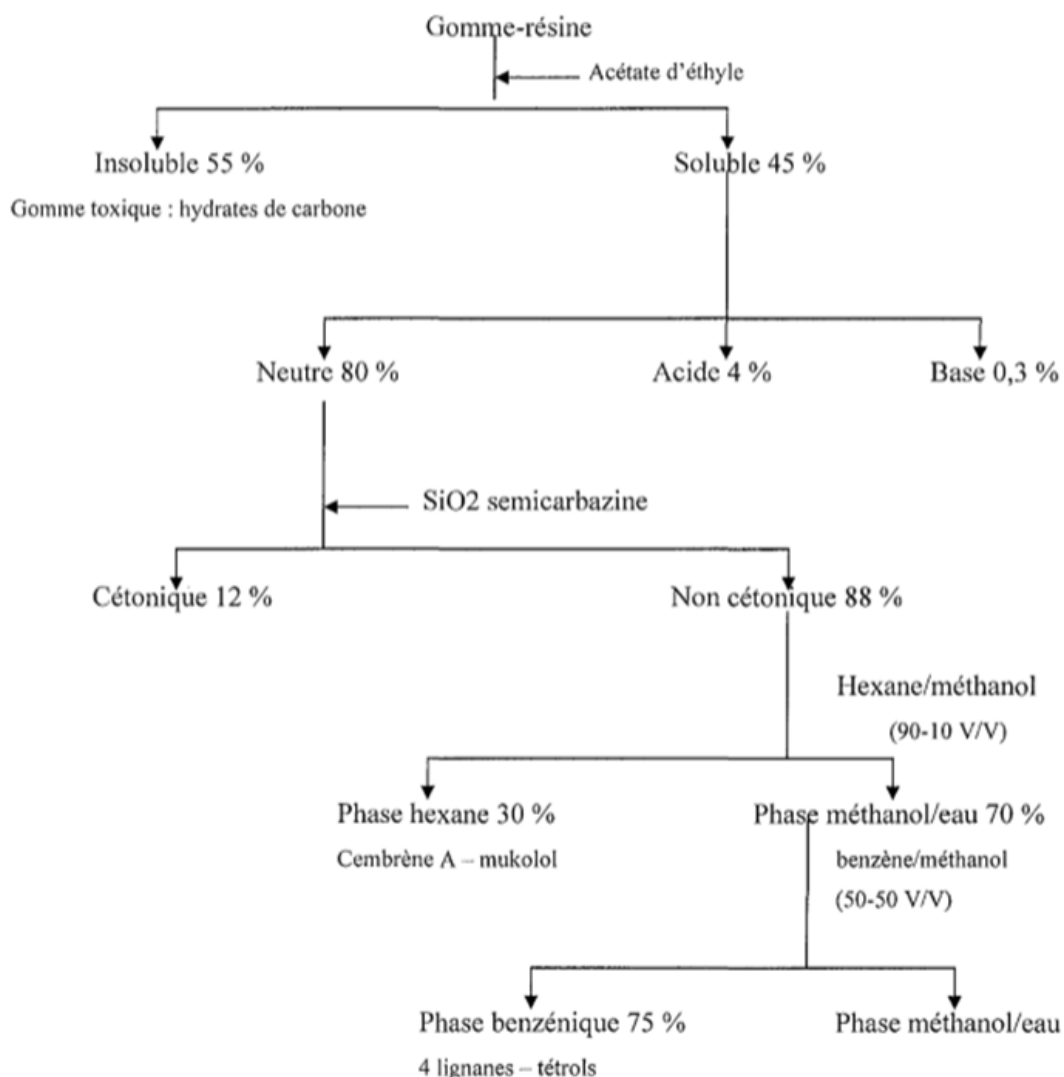


Figure 64 : Etapes d'extraction de l'oléo-gommo-résine de *Commiphora mukul* [105 ; 129]

La méthode d'extraction présentée dans la Figure 64 a été très utilisée par différentes équipes de recherche pour séparer les constituants de l'oléo-gommo-résine. Une première extraction solide-liquide sous l'action de l'acétate d'éthyle permet d'obtenir une fraction riche en guggulipide, fraction soluble de la résine. Le guggulipide correspond à la sous-fraction responsable des effets pharmacologiques et contient un mélange de différentes familles de molécules d'intérêt avec un minimum de 50 mg de guggulstérones par gramme d'extrait [105 ; 129]. Cette fraction, riche en nombreux composés, subit une suite d'extractions liquide-liquide avec des solvants différents afin d'isoler au mieux les molécules de l'oléo-gommo-résine de myrrhe.

L'application de ce protocole d'extraction sur les oléo-gommo-résines de myrrhe permet de démontrer la complexité de la fraction résine et met en évidence une fraction guggulipide riche en guggulstérones. De plus, cette méthode m'offre des informations importantes pour améliorer l'identification et la quantification des composés d'intérêt.

## 2. Deuxième méthode

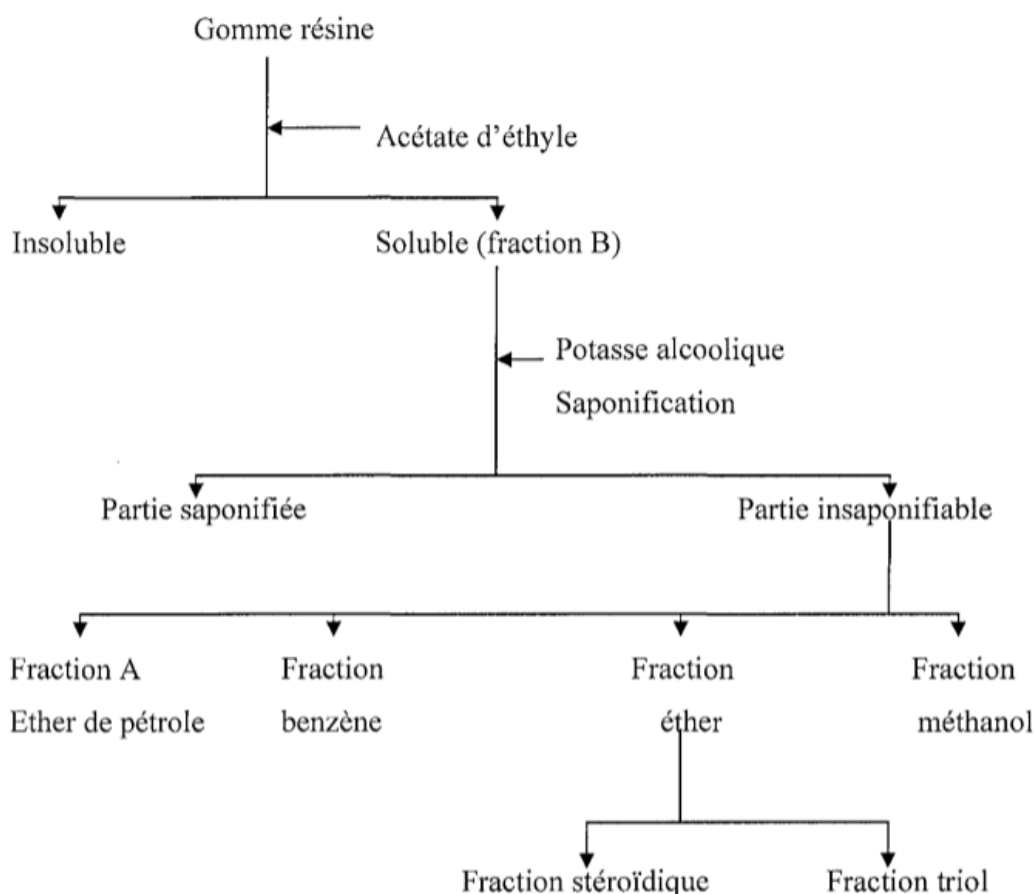


Figure 65 : Etapes d'extraction de l'oléo-gommo-résine de *Commiphora mukul* [109]

L'oléo-gommo-résine de *Commiphora mukul* est de nouveau soumise à l'action de l'acétate d'éthyle, ce qui permet de séparer deux parties : la gomme, insoluble dans l'acétate d'éthyle et la partie résine, soluble dans ce solvant (Figure 65). La fraction B soluble dans le premier solvant correspond au guggulipide, famille composée des E- et Z-guggulstérones, des guggulstérols I, II et III ainsi que de lignanes. Afin d'isoler au mieux les différents composés de la résine, une suite d'extractions liquide-liquide sont réalisées en suivant le même principe mais avec des solvants de nature différente comme par exemple l'ether ou encore la potasse alcoolique. Cette dernière sert à réaliser une saponification (ou hydrolyse alcaline) permettant d'extraire des sous-fractions de composés d'intérêt. La fraction A, extraite par l'ether de pétrole, contient des diterpènes, de la sésamine et de la Z-guggulstérone [109].

En résumé, ces deux expériences montrent l'importance de la purification des composés chimiques de la myrrhe, qui s'appuie sur des protocoles assez lourds faisant intervenir une succession d'extractions liquide-liquide. Les extraits ainsi isolés peuvent être analysés.

### 3. Identification et quantification des guggulstérones en HPLC-UV

L'HPLC-UV est une technique séparative couplée à une détection UV permettant l'analyse de la résine de myrrhe. La préparation des échantillons et les conditions analytiques employées sont présentées afin de retirer les informations les plus pertinentes pour l'application d'un protocole de dosage des guggulstérones dans le CCAP®.

L'oléo-gommo-résine de *Commiphora wightii* est broyée jusqu'à obtenir une poudre, puis mélangée dans de l'éther pendant 8 h selon la méthode de Soxhlet. Le surnageant est concentré et séché. L'extrait est repris dans de l'acétone. La solution est filtrée sur membrane de porosité 0,45 µm, avant d'être injectée dans le système chromatographique [130].

La résine de *Commiphora wightii* est analysée par HPLC-UV en phase inverse, avec une colonne C18 (Nucleosil 250 mm x 4,60 mm x 2,6 µm) selon une méthode en gradient, avec un débit de 0,6 mL/min. La colonne est placée dans une enceinte thermostatée à 35°C. La phase mobile binaire est composée de proportions variables d'ACN et d'eau bi-distillée. 0,3 % d'acide trifluoroacétique (TFA) est ajouté pour tamponner l'eau. Les molécules sont détectées en UV à 250 nm. Le chromatogramme est représenté dans la Figure 66.

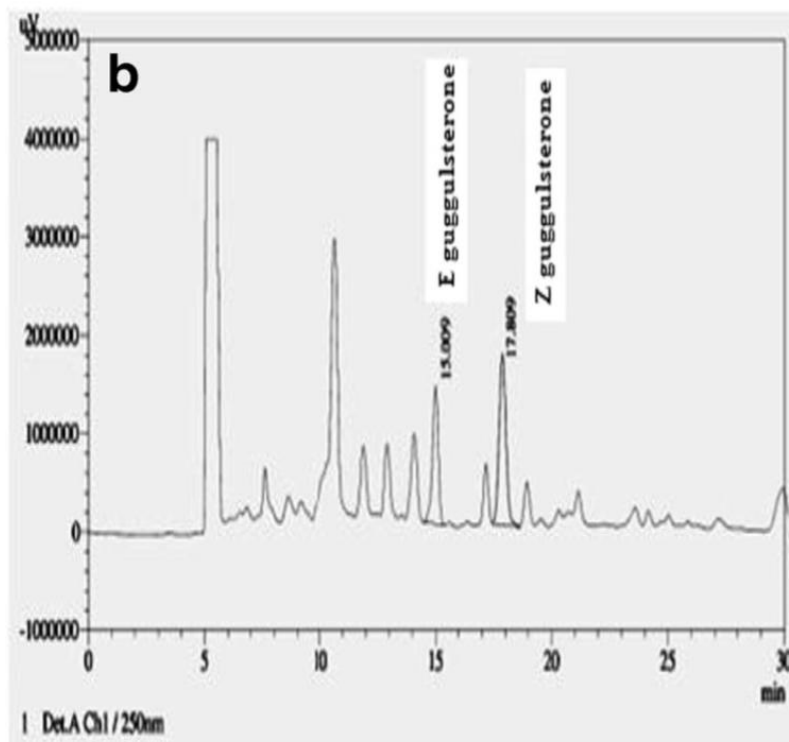


Figure 66 : Chromatogramme de résine de myrrhe en HPLC-UV détectée à 250 nm avec la colonne Nucleosil

Suite à l'injection de la solution de myrrhe en HPLC-UV, deux pics correspondant aux E- et Z-guggulstérones sont séparés avec des  $t_r$  respectifs de 15,0 min et de 17,8 min. Il faut noter que la LOQ est comprise entre 1 et 9  $\mu\text{g/mL}$ .

Une étape d'extraction préalable est indispensable pour identifier et doser les E- et Z-guggulstérones par HPLC-UV. Des études analytiques montrent que ces composés bioactifs sont présents à hauteur de 2 % dans la résine de myrrhe. La sélection des meilleurs paramètres analytiques est optimisée par une recherche bibliographique plus approfondie qui apparaît dans le Tableau 68.

#### 4. Comparaison des méthodes de dosage des guggulstérones

La comparaison de trois méthodes de dosage présentées dans le Tableau 68 permet de d'observer la similitude des méthodes employées [130 - 132].

Tableau 68 : Méthodes de dosage des deux isomères de guggulstérones

| Publications            | Mesrob et al. 1998<br>[131]                                    | Musharraf et al. 2012<br>[132]                               | Kulhari et al. 2015<br>[130]                                 |
|-------------------------|--|--|--|
| Méthode                 | HPLC/UV phase inverse  |  |  |
| Colonne                 | C18, 150 mm x 4,6 mm<br>x 5 $\mu\text{m}$                      | C18, 50 mm x 4,6 mm<br>x 1,8 $\mu\text{m}$                   | C18, 250 mm x 4,6 mm<br>x 2,6 $\mu\text{m}$                  |
| Mode d'élution          | Gradient   |  |  |
| Phases mobiles          | A : ACN<br>B : Eau tamponnée                                   | A : ACN<br>B : Eau tamponnée                                 | A : ACN – TFA 0,03%<br>B : Eau – TFA 0,03%                   |
| Débit de phases mobiles | 1,2 mL/min   | 1 mL/min   | 2 mL/min   |
| Longueur d'onde         | 245 nm   | 251 nm   | 250 nm   |
| $t_r$                   | E-Guggulstérone :<br>46,5 min<br>Z-Guggulstérone :<br>56,9 min | E-Guggulstérone :<br>6,5 min<br>Z-Guggulstérone :<br>8,5 min | E-Guggulstérone :<br>15 min<br>Z-Guggulstérone :<br>17,8 min |

Comme l'indique le Tableau 68, les résines de Commiphora sont analysées en HPLC-UV en phase inverse, sur une colonne C18. Le mode d'élution choisi est un mode gradient avec un débit compris entre 1 et 2 mL/min. La phase mobile binaire est composée de proportions variables d'ACN et d'eau bi-distillée. Pour améliorer la résolution des composés, un ajout de TFA ou d'acide acétique est employé. L'identification des guggulstérones requiert une plage d'absorption comprise entre 245 et 251 nm. **En revanche, une seule équipe procède à la validation de la méthode d'identification et de quantification en HPLC-UV selon les Lignes Directrices ICH [130].**

**J'ai choisi pour débiter ce travail d'appliquer voire de mettre au point si nécessaire le protocole de dosage des E- et Z-guggulstérones en se basant sur les articles scientifiques de Mesrob et Musharraf [131 ; 132].**

## II. Matériels

**De la même façon que dans le cas de l'encens, j'ai utilisé pour cette étude des guggulstérones un appareil UHPLC-UV puisque le Laboratoire Pionneau en possède un. Afin de régler aux mieux les paramètres analytiques, il est important de s'attarder sur certains points techniques.**

### A. Techniques chromatographiques : UHPLC-UV

Les principes du fonctionnement de l'appareil ainsi que les analyses des données chromatographiques sont expliquées de façon détaillée dans le chapitre 3.2. Seuls quelques points pertinents concernant le matériel sont importants à expliciter dans le cas de l'identification et du dosage des deux isomères.

#### 1. Principe de fonctionnement de l'appareil

L'UHPLC-UV correspond à une technique analytique permettant d'identifier et quantifier des composés en solution dans un mélange, combinant une méthode de séparation physique par chromatographie liquide ultra haute performance avec un mode de détection par spectrophotométrie UV.

##### a) Méthode de séparation par UHPLC

Pour l'analyse des E- et Z-guggulstérones, j'ai choisi de travailler en phase inverse car les molécules étudiées ont un caractère fortement apolaire.

Dans ce travail d'identification et de dosage des deux guggulstérones, une seule colonne est utilisée, constituée de silice greffée à des groupements apolaires phenylhexyles : une colonne Kinetex® de Phenomenex, de dimensions 100 mm x 3 mm x 2,6 µm. Ce choix permet de diminuer le temps d'analyse car il est possible de travailler avec un débit de phase mobile important [95]. De plus, la nature des groupements greffés est adaptée à ma thématique. **Les groupements phenylhexyles**

greffés permettent une meilleure rétention et séparation d'hydrocarbures aromatiques, ce qui est le cas des guggulstérones. Ces avantages ont été utiles pour identifier C1, C2 et B1 dans le CCAP®. En effet, les trois composés d'intérêt de l'encens ont été élués en 10 min et bien résolus. Pour la résine de myrrhe, la difficulté se situe au niveau de l'isomérisation des deux composés. Leur séparation risque d'être contraignante et l'utilisation de la colonne Kinetex® permet de se placer dans les meilleures conditions pour les analyser.

L'objectif de ce travail de thèse est de tester et optimiser les conditions analytiques par UHPLC en réduisant notamment la durée d'analyse et en améliorant la résolution des deux composés d'intérêt.

### *b) Mode de détection UV*

Tous les renseignements concernant le mode de détection UV sont développés dans le chapitre 3.2.

D'après la littérature, la longueur d'onde de départ est fixée à 250 nm.

## **2. Analyse des données chromatographiques**

L'analyse des données qualitatives et quantitatives est la même que pour l'encens. Toutes les informations utiles sont renseignées dans le chapitre 3.2.

## **B. Echantillons utilisés lors de l'étude**

### **1. Témoins**

Les E- et Z-guggulstérones ont été commandées chez Sigma-Aldrich. Elles se présentent sous la forme d'une poudre de couleur blanche dont les puretés sont respectivement de 95 et 89 %.

### **2. Matière première : la myrrhe**

La myrrhe, en tant que matière première, est disponible au Laboratoire Pionneau. Il s'agit d'exsudats de type oléo-gommo-résine bien connus d'un point de vue chimique, récoltés en Somalie puis importés en France. Elle est commercialisée par la société EMIGA implantée à Marseille. Ces concrétions me servent de contrôle puisque la présence des composés d'intérêt dans la matière première me permet d'appréhender les résultats lors de l'identification et du dosage dans le CCAP® (Figure 67). Deux lots d'oléo-gommo-résines de myrrhe ont été étudiés : MYR 13 et MYR 14.

### **3. Le CCAP®**

Plusieurs lots de CCAP® ont été utilisés dans cette étude : CH 164 et CH 166. Ces lots de CCAP® ont été fabriqués respectivement en août et décembre 2016 avec le même lot de myrrhe (Figure 68).





Figure 67 : Photographie de l'oléo-gommo-résine de *Commiphora carterii*



Figure 68 : Photographie du produit fini, le CCAP®

### III. Méthodes

L'objectif visé est de reproduire les protocoles de la littérature [131 ; 132] pour le genre botanique *Commiphora* et le transposer ensuite sur la matière première et le CCAP®. Un travail de mise au point du protocole d'identification et de dosage des deux isomères E- et Z-guggulstérone est également réalisé. L'accent est mis sur l'amélioration des conditions opératoires afin d'optimiser la séparation des deux formes, la durée d'analyse et la sensibilité de la méthode.

#### A. Préparation des échantillons

##### 1. Préparation des témoins

###### a) Selon les données bibliographiques [130 - 132]

Une solution stock de la E-guggulstérone est préparée à la concentration de 22  $\mu\text{g/mL}$  à partir d'environ exactement 0,440 mg de poudre, pesé sur une balance de précision puis dissous dans 20 mL de méthanol de qualité HPLC.

Une solution stock de la Z-guggulstérone est préparée à la concentration de 14,50  $\mu\text{g/mL}$  à partir d'environ exactement 0,290 mg de poudre, pesé sur une balance de précision puis dissous dans 20 mL de méthanol de qualité HPLC.

Une solution fille contenant les deux témoins est préparée par mélange de deux volumes identiques des solutions stocks des E- et Z-guggulstérone, donnant respectivement des concentrations finales de 11  $\mu\text{g/mL}$  et 7,25  $\mu\text{g/mL}$ . Cette solution est donc diluée au demi par rapport aux solutions stocks.

Après homogénéisation, toutes les solutions sont filtrées sur membrane de porosité 0,45 µm (membrane en nylon de diamètre 13 mm) avant injection en UHPLC-UV. Ces solutions sont conservées à une température de 4°C.

**Ces solutions sont utilisées dans toutes les expérimentations, servant de témoins pour la matière première et le CCAP®.**

### *b) Optimisation de la préparation du témoin Z*

Pour se situer dans la même matrice que le CCAP®, une nouvelle solution stock de Z-guggulstérone est préparée à partir d'un solvant différent : l'éthanol 33 %. Environ exactement 0,310 mg de poudre de Z-guggulstérone est pesé sur une balance de précision puis mis en solution dans 20 mL d'un mélange Ethanol/Eau (33/67 V : V) de qualité HPLC, formant ainsi une solution stock de concentration 15 µg/mL.

Après homogénéisation, la solution est filtrée sur membrane de porosité 0,45 µm avant injection en UHPLC-UV. Cette solution est conservée à une température de 4°C.

## **2. Préparation de la matière première : myrrhe**

### *a) Dans le méthanol*

Les échantillons solides d'exsudat sont broyés de manière homogène dans un mortier avec un pilon, formant une poudre fine de couleur rougeâtre. Environ exactement 0,1 g de myrrhe pulvérisée est pesé à l'aide d'une balance de précision, puis dissous dans 9 mL de méthanol. Pour faciliter la dissolution, le mélange est traité dans un bain aux ultrasons à la fréquence de 40 kHz pendant 10 min en agitant à 3 ou 4 reprises. L'ensemble est complété à 10 mL de méthanol puis décanté pendant 20 min. Le surnageant est filtré sur une membrane de porosité 0,45 µm, avant injection en UHPLC-UV.

### *b) Selon l'AMM du CCAP®*

Pour s'approcher du procédé de fabrication du CCAP®, les conditions de l'AMM sont respectées. Une prise d'essai en grammes de myrrhe broyée est mélangée dans de l'éthanol 33 % (V : V). L'échantillon est mélangé plusieurs fois par retournement et conditionné dans des flacons ambrés. La solution est filtrée sur membrane de porosité 0,45 µm, avant injection en UHPLC-UV.

Le surnageant est prélevé à des jours différents pour visualiser la variation des concentrations en guggulstérone au cours du temps.

Cette macération est réalisée sur deux lots de myrrhe : MYR 13 et MYR 14.

### 3. Préparation des échantillons de CCAP®

Plusieurs lots de CCAP® sont utilisés dans cette étude : CH 164 et CH 166. Ils ont été fabriqués respectivement en août et décembre 2016 à partir du même lot de myrrhe (MYR 14).

#### a) Pur

Environ exactement 2 g de CCAP® (lots CH 164 et CH 166) sont prélevés et filtrés sur membrane de porosité 0,45 µm puis injectés en UHPLC-UV.

#### b) Repris dans le méthanol

##### (1) Evaluation de l'erreur liée à l'évaporation reprise

Exactement 11 mL de la solution stock de la Z-guggulstérone dissoute dans de l'éthanol 33 % sont chauffés à reflux pendant 10 min dans des conditions opératoires précises : le ballon doit être immergé dans un bain marie à une température de 90°C, avec une vitesse de rotation de 90 tours/min. La solution est évaporée jusqu'à obtenir un extrait d'une masse finale d'environ exactement 0,31 g. Un volume de méthanol est ajouté afin d'obtenir un volume final de 11 mL, n'entraînant aucune dilution ou concentration de l'extrait. La solution est filtrée sur membrane de porosité 0,45 µm, avant injection en UHPLC-UV.

##### (2) Application sur le CCAP®

Exactement 11 mL de la solution de CCAP® (lot CH 166) sont chauffés à reflux pendant 10 min dans des conditions opératoires précises : le ballon doit être immergé dans un bain marie à une température de 90°C, avec une vitesse de rotation de 90 tours/min. La solution est évaporée jusqu'à obtenir un extrait d'une masse finale d'environ exactement 0,34 g. Un volume de méthanol est ajouté afin d'obtenir un volume final de 11 mL, n'entraînant aucune dilution ou concentration de l'extrait. La solution est filtrée sur membrane de porosité 0,45 µm, avant injection en UHPLC-UV.

## B. Techniques chromatographiques

#### a) Méthode de séparation

Pour réaliser l'identification et la quantification des E- et Z-guggulstérone sur la matière première et le CCAP®, il a été choisi de travailler sur un système chromatographique de type UHPLC-ultimate 3000 (Dionex – Thermo Scientific) (Figure 69).



Figure 69 : Photographie de l'UHPLC Ultimate 3000

(1) Protocoles déjà publiés

(a) Protocole 1 [131]

Les analyses des solutions stocks sont réalisées avec une colonne Kinetex® phenylhexyle (100 mm x 3 mm x 2,6 µm). La séparation a lieu avec les phases mobiles A (H<sub>2</sub>O tamponnée avec 1 % d'acide acétique) et B (ACN) en mode gradient en augmentant la proportion d'ACN de 64 % à 100 % en 66 min avec un débit de 1,2 mL/min. Les données du gradient sont résumées dans le Tableau 69.

Tableau 69 : Données du gradient du protocole 1

| Intervalle (min) | Phase mobile A (% V : V) | Phase mobile B (% V : V) |
|------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0-30             | 36                       | 64                       |
| 30-50            | 36 à 45                  | 64 à 55                  |
| 50-56            | 45                       | 55                       |
| 56-66            | 100                      | 0                        |
| 66-67            | 100 à 36                 | 0 à 64                   |
| 67-76            | 36                       | 64                       |

*(b) Protocole 2 [132]*

Les analyses des solutions stocks sont réalisées avec une colonne Kinetex® phenylhexyle (100 mm x 3 mm x 2,6 µm). La séparation a lieu avec les phases mobiles A (H<sub>2</sub>O tamponnée avec 1 % d'acide acétique) et B (ACN) en mode gradient en augmentant la proportion d'ACN de 40 % à 100 % en 11 min avec un débit de 0,6 mL/min pendant la première minute suivi d'un débit de 1 mL/min. Les données du gradient sont résumées dans le Tableau 70.

*Tableau 70 : Données du gradient du protocole 2*

| Intervalle (min) | Phase mobile A (% V : V) | Phase mobile B (% V : V) |
|------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0-2              | 60 à 57                  | 40 à 43                  |
| 2-8              | 57 à 50                  | 43 à 50                  |
| 8-10             | 50 à 5                   | 50 à 95                  |
| 10-11            | 5 à 0                    | 95 à 100                 |
| 11-15            | 0                        | 100                      |
| 15-16            | 0 à 60                   | 100 à 40                 |

*(2) Optimisation de la méthode d'analyse*

Une colonne Kinetex® phenylhexyle (Phenomenex) en acier inoxydable d'une longueur de 10 cm et d'un diamètre interne de 3 mm est utilisée. La colonne est placée dans une enceinte thermostatée à 25°C. La phase stationnaire est composée de billes de silice modifiées chimiquement par greffage de résidus phenylhexyles sur les groupes silanols. La granulométrie de la phase stationnaire est de 2,6 µm. Dans ce travail, la phase mobile binaire est composée de proportions variables d'ACN (phase B) et d'eau (phase A), tous de qualité HPLC, plaçant la méthode en mode gradient. De manière à améliorer la résolution des signaux correspondant des composés, un ajout d'acide acétique dans des proportions de 1 % est réalisé dans la phase A. Le temps d'analyse de ce travail est de 30 min et la pression d'environ 550 bars. Il est décidé de travailler avec un débit de 0,8 mL/min. Les données du gradient sont résumées dans le Tableau 71.

Tableau 71 : Données du gradient optimisé

| Intervalle (min) | Phase mobile A (% V : V) | Phase mobile B (% V : V) |
|------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0-14             | 90                       | 10                       |
| 14-20            | 90 à 30                  | 10 à 70                  |
| 20-26            | 30 à 90                  | 70 à 10                  |
| 26-30            | 90                       | 10                       |

Ce même protocole de séparation est utilisé pour tous les échantillons : témoins, myrrhe, CCAP®.

### *b) Mode de détection*

#### (1) Selon les données de la littérature

La détection UV est le mode de détection utilisé pour l'analyse des produits naturels possédant un ou plusieurs chromophores. Cette méthode de détection est rapide, reproductible, sensible et non destructive.

Les longueurs d'onde ont été choisies conformément à l'étude bibliographique et en s'appuyant sur les caractères physico-chimiques. Comme les E- et Z-guggustérones possèdent deux doubles liaisons C=O conjuguées, la longueur d'onde classique de détection des noyaux aromatiques est fixée à 250 nm.

Les données sont acquises via le logiciel Chromeleon® version 6.8 qui les transforme en résultats directement utilisables : intégration des pics, calculs de paramètres de séparation et rétention.

#### (2) Optimisation des paramètres de détection de la Z-guggulstérone

Le composé de référence Z-guggulstérone possède des groupements chromophores dont les longueurs d'absorption caractéristiques se situent entre 248 nm et 254 nm. Le choix de la longueur d'onde d'excitation de chaque composé se porte généralement sur la longueur d'onde qui correspond à l'absorption maximale en UV et à laquelle les autres composés du mélange absorbent le moins. Pour la Z-guggulstérone, le maximum de détection est testé à différentes longueurs d'onde : 246, 248, 250, 252 et 254 nm.

### C. Dosage dans le CCAP® : sensibilité

La LOD est la plus petite quantité ou concentration d'une substance à analyser qui puisse être détectée mais non suffisante pour pouvoir être quantifiée avec précision. La détermination graphique est l'estimation de la LOD basée sur le rapport signal sur bruit. Il faut comparer la hauteur du pic d'intérêt au BDF. Lorsque la concentration d'un échantillon avoisine la LOD, ce rapport est égal à 3.

La LOQ est la plus petite quantité ou concentration d'une substance à analyser qui puisse être dosée avec une certitude suffisante. Elle se calcule de la même façon que la LOD et le rapport doit être égal à 10.

Une solution stock de la Z-guggulstérone à la concentration de 14,5 µg/mL a été diluée jusqu'à ce que la hauteur du pic obtenu avoisine 3 ou 10 fois la valeur du BDF. Cette solution a donc une concentration égale à la LOD ou la LOQ.

En parallèle, la solution de CCAP® reprise dans le méthanol est filtrée sur une membrane de porosité 0,45 µm, avant injection en UHPLC-UV.

## IV. Résultats

La présentation des résultats s'articule de la façon suivante. Tout d'abord, la méthode de préparation des témoins (E- et Z- guggulstérone) est développée, c'est-à-dire qu'un travail de sélection des meilleures conditions analytiques pour l'identification et la quantification des deux composés est mis en œuvre. Une fois tous ces paramètres optimisés, ils sont transposés sur la matière première puis sur le produit fini afin de permettre le dosage des deux isomères dans le CCAP®.

### A. Développement de la méthode analytique à partir des témoins

#### 1. Identification des deux isomères

Le but de ce travail est d'identifier puis séparer les deux isomères, en se basant sur deux articles scientifiques. Mon premier défi est de reproduire le protocole de l'article scientifique de Mesrob [131] dédié notamment à l'extraction et la séparation des deux formes des guggulstérone à partir de l'oléo-gommo-résine de *Commiphora mukul*, espèce rentrant dans la composition du CCAP®.

##### a) Selon le protocole 1 [131]

Deux solutions stocks des E- et Z-guggulstérone sont préparées respectivement à la concentration de 22 µg/mL et 14,50 µg/mL conformément au protocole de Mesrob [131]. Ces deux solutions stocks sont donc obtenues par dissolution du témoin dans du méthanol. Les analyses sont réalisées avec une colonne Kinetex® phenylhexyle (100 mm x 3 mm x 2,6 µm). La séparation a lieu avec les phases

mobiles A (H<sub>2</sub>O tamponnée avec 1 % acide acétique) et B (ACN) en mode gradient en augmentant la proportion d'ACN de 64 % à 100 % en 66 min et avec un débit de 1,2 mL/min. Les témoins sont injectés en UHPLC-UV à 250 nm, ce qui permet d'obtenir le chromatogramme de la Figure 70.

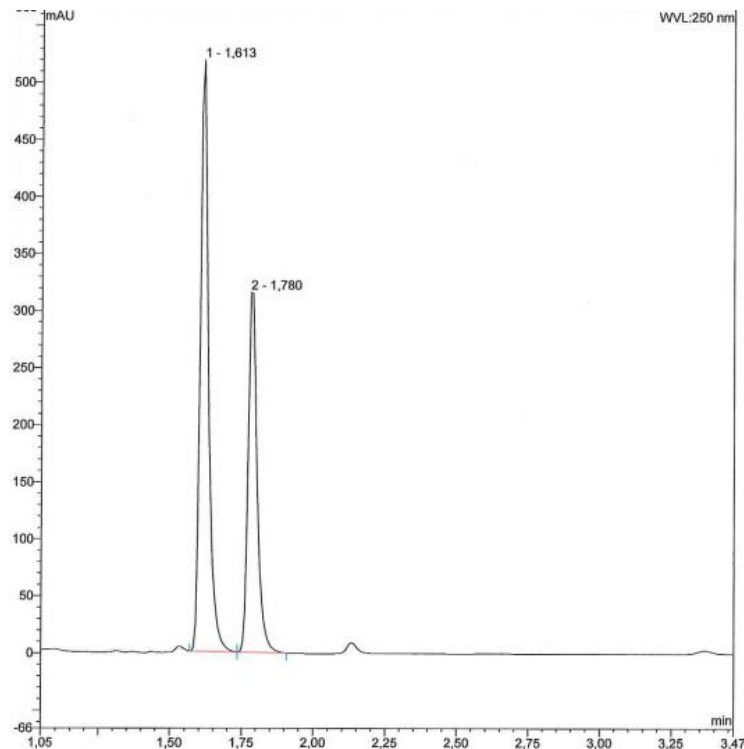


Figure 70 : Chromatogramme d'un mélange des E- et Z-guggulstérone selon le protocole 1

Ce chromatogramme montre que les E- et Z-guggulstérone sont éluées respectivement à 1,613 et 1,780 min. L'injection séparée des solutions stocks confirme cet ordre d'éluion. Les deux formes semblent présenter une bonne solubilité dans le méthanol. Par rapport aux données déjà publiées, l'ordre d'éluion des deux pics reste inchangé. Les données chiffrées des paramètres de rétention sont présentées dans le Tableau 72.

Tableau 72 : Paramètres de séparation des E- et Z-guggulstérone selon le protocole 1

| Caractères analytiques | k'   | $\alpha$ | N      | Rs   | As   |
|------------------------|------|----------|--------|------|------|
| E-guggulstérone        | 2,23 | 1,163    | 16 201 | 3,18 | 1,44 |
| Z- guggulstérone       | 2,56 |          | 17 142 | 3,18 | 1,66 |



Les résultats bruts permettent d'avancer que les deux composés ne sont pas suffisamment retenus. En effet, les  $t_r$  ne sont pas adaptés à cette étude car les composés sortent trop près du volume mort ( $k'$  proche de 2), malgré que les deux composés soient correctement séparés l'un de l'autre ( $R_s \approx 3$ ). De plus, l'As supérieur à 1 traduit un retard d'élution des composés.

**Ce protocole est donc difficilement transposable sur la matière première et sur le CCAP<sup>®</sup>, car ce sont des milieux riches en composés et les deux isomères des guggulstérones ne sont pas assez retenus pour être séparés correctement dans ces mélanges plus complexes.**

Ce protocole met en œuvre une phase mobile constituée en grande partie d'ACN, solvant apolaire qui a tendance à favoriser une élution rapide des composés stéroïdiens. Afin d'améliorer la rétention, il serait envisageable de diminuer le pourcentage d'ACN dans la phase mobile. C'est pourquoi le protocole de Musharraf et son équipe (2011) a été sélectionné [132]. J'ai donc choisi de tester ce nouveau protocole avant de débiter une optimisation de méthode.

### *b) Selon le protocole 2 [132]*

Deux solutions stocks des E- et Z-guggulstérones sont préparées respectivement à la concentration de 22  $\mu\text{g/mL}$  et 14,50  $\mu\text{g/mL}$  conformément au protocole de Musharraf [132]. Les deux solutions stocks sont donc obtenues par dissolution du témoin dans du méthanol. Les analyses sont réalisées avec une colonne Kinetex<sup>®</sup> phenylhexyle (100 mm x 3 mm x 2,6  $\mu\text{m}$ ). La séparation a lieu avec les phases mobiles A ( $\text{H}_2\text{O}$  tamponnée avec 1 % d'acide acétique) et B (ACN) en mode gradient en augmentant la proportion d'ACN de 40 % à 100 % en 11 min avec un débit de 0,6 mL/min pendant la première minute suivi d'un débit de 1 mL/min. Les témoins sont injectés en UHPLC-UV à 250 nm, ce qui permet d'obtenir le chromatogramme de la Figure 71. Les données chiffrées des paramètres de rétention sont présentées dans le Tableau 73.

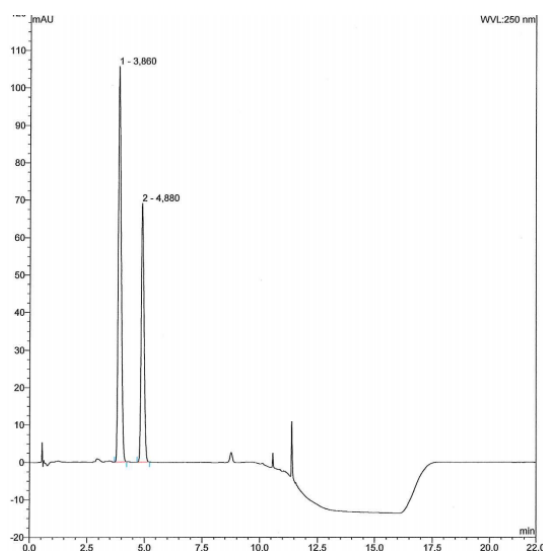


Figure 71 : Chromatogramme d'un mélange des E- et Z-guggulstérones selon le protocole 2

Tableau 73 : Paramètres de séparation des E- et Z-guggulstérones selon le protocole 2

| Caractères analytiques | k'   | $\alpha$ | N    | Rs   | As   |
|------------------------|------|----------|------|------|------|
| E-guggulstérone        | 6,06 | 1,308    | 4113 | 4,31 | 1,75 |
| Z- guggulstérone       | 7,92 |          | 6978 | 4,31 | 1,46 |

Ce chromatogramme montre que les E- et Z-guggulstérones sont éluées respectivement à 3,860 et 4,880 min. L'injection séparée des solutions stocks confirme cet ordre d'élution.

Les paramètres chromatographiques restent concordants avec une bonne séparation des deux composés entre eux ( $R_s > 1,5$  et  $2 < k' < 10$ ). Ils sont un peu plus retenus que dans le protocole 1 du fait que le pourcentage d'ACN soit ici un peu plus faible, expliquant certainement l'augmentation des  $t_r$  des composés. Ceci appuie l'hypothèse selon laquelle il serait intéressant de jouer sur cette phase mobile pour augmenter la rétention des deux composés et permettre ainsi une transposition ultérieure sur la matière première et le produit fini.

**Ainsi, la méthode de séparation et d'identification des E- et Z-guggulstérones reste à améliorer. La suite de ce travail consiste à tester et à optimiser les paramètres analytiques pour les deux témoins, en commençant par la composition de la phase mobile.**

## 2. Optimisation des paramètres analytiques

### a) Optimisation de la méthode de séparation

En vue d'optimiser les paramètres de séparation des deux isomères, une quinzaine de conditions chromatographiques ont été testées dans lesquelles les pourcentages de phases mobiles, les compositions des tampons, le mode d'élution et les débits sont modifiés (résultats non montrés). Un seul protocole est retenu.

Tous les échantillons sont préparés de la même façon que dans les deux références bibliographiques [131 ; 132] c'est-à-dire que les substances témoins sont dissoutes dans du méthanol. Les analyses sont réalisées avec une colonne Kinetex® phenylhexyle (100 mm x 3 mm x 2,6  $\mu$ m). La séparation a lieu avec les phases mobiles A (H<sub>2</sub>O tamponnée avec 1 % d'acide acétique) et B (ACN) en mode gradient en augmentant la proportion d'ACN de 10 % à 70 % en 7 min avec un débit de 0,8 mL/min. Les deux solutions témoins sont passées dans le système chromatographique à la longueur d'onde de

250 nm (Figures 72 et 73). Les données chiffrées des paramètres de rétention sont présentées dans le Tableau 74.

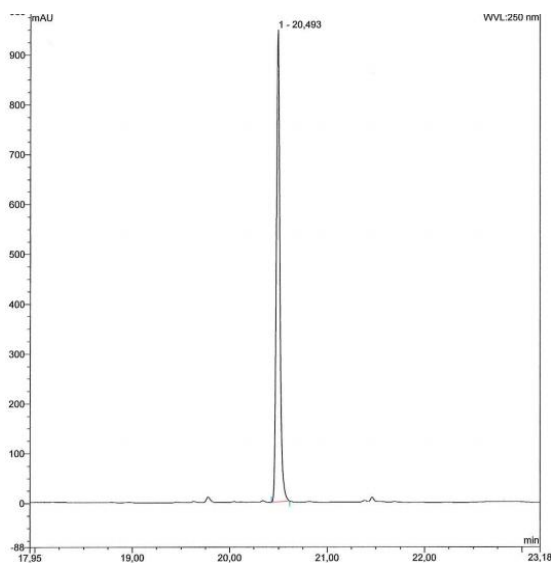


Figure 72 : Chromatogramme de la E-guggulstérone selon le protocole optimisé

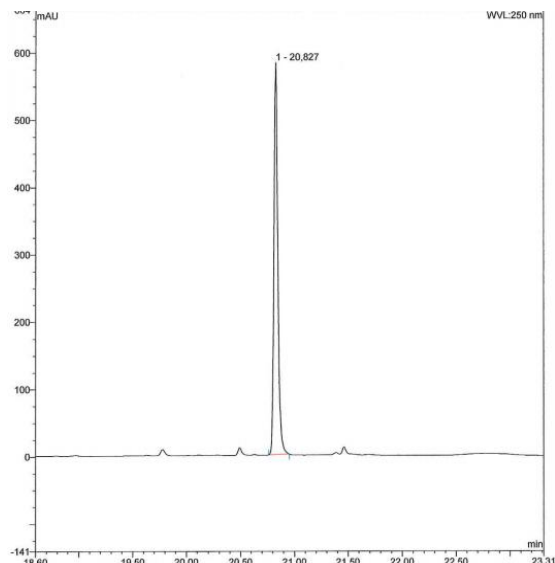


Figure 73 : Chromatogramme de la Z-guggulstérone selon le protocole optimisé

Tableau 74 : Paramètres chromatographiques des E- et Z-guggulstérone selon le protocole optimisé

| Composé          | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | k'    | As   |
|------------------|------------------|---------------|-------|------|
| E-guggulstérone  | 38,908           | 946,908       | 26,21 | 1,23 |
| Z- guggulstérone | 24,084           | 582,775       | 26,66 | 1,28 |

Dans les deux chromatogrammes, les E- et Z-guggulstérone sont éluées respectivement à 20,493 et 20,827 min. Les résultats confirment que les deux isomères sont bien retenus ( $k' \gg 2$ ). Néanmoins, les pics présentent une légère asymétrie ( $As \approx 1,20$ ) de moindre importance que celle constatée dans les deux protocoles testés dans cette étude. La sensibilité de la méthode semble très correcte puisque les hauteurs des pics sont assez importantes. **Le facteur de rétention  $k'$  est cette fois-ci intéressant car les pics sortent loin du volume mort avec un temps d'analyse acceptable (26 min), permettant ainsi une transposition ultérieure sur la matière première et sur le produit fini.**

Une solution fille contenant un mélange des E- et Z-guggulstérone diluées au demi par rapport aux solutions stocks de départ est préparée afin d'observer la séparation du mélange. Ainsi, les concentrations finales des E- et Z-guggulstérone sont respectivement de 11 µg/mL et 7,25 µg/mL. Après injection des solutions stocks des témoins séparés et de la solution fille, les chromatogrammes peuvent être superposés (Figure 74).

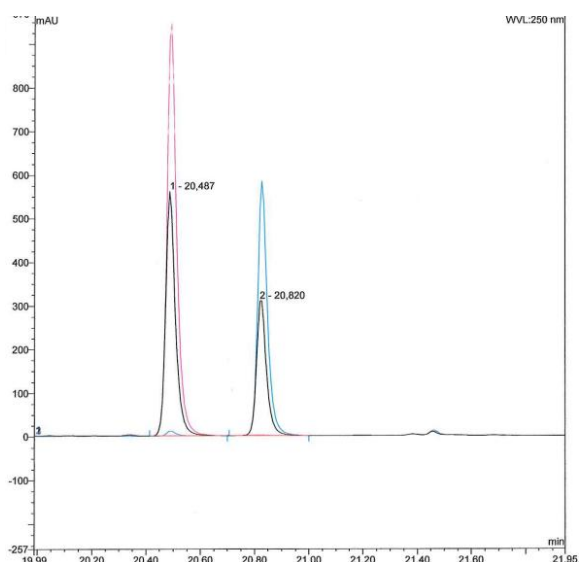


Figure 74 : Chromatogramme de la solution stock de la E-guggulstérone (en rose), de la Z-guggulstérone (en bleu) et du mélange (en noir)

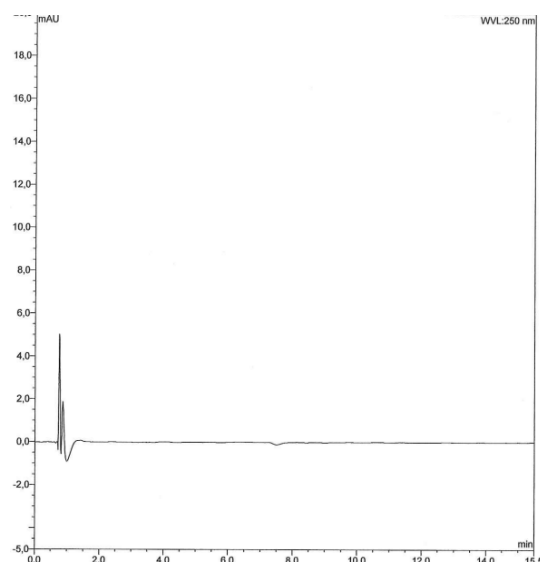


Figure 75 : Chromatogramme d'un blanc méthanol

La E-guggulstérone est éluée en premier, suivie de la Z-guggulstérone avec des  $t_r$  de 20,487 min et 20,820 min respectivement. L'identification des deux isomères en mélange a pu être confirmée en superposant les chromatogrammes des témoins obtenus de façon isolée. **Ainsi, les chromatogrammes révèlent un ordre d'élué inchangé avec des  $t_r$  identiques. Aucune déformation de pics n'est notée.** Pour valider une bonne séparation entre deux pics, les paramètres à vérifier sont le facteur de rétention, la sélectivité, la résolution et l'efficacité.

Tableau 75 : Paramètres de séparation du mélange des deux isomères selon le protocole optimisé

| Caractères analytiques | $k'$  | $\alpha$ | N         | $R_s$ | $A_s$ |
|------------------------|-------|----------|-----------|-------|-------|
| E-guggulstérone        | 26,21 | 1,019    | 1 810 831 | 5,39  | 1,34  |
| Z- guggulstérone       | 26,66 |          | 1 738 457 |       | 1,41  |

Les données organisées dans le Tableau 75 révèlent que les paramètres chromatographiques sont concordants avec une bonne séparation des deux composés entre eux. Un seul problème est noté : les pics ne sont pas complètement symétriques du fait que l'As soit supérieur à 1, révélant un retard d'élution de ces composés. Pour améliorer ce facteur, des variations des pourcentages du tampon et la nature du tampon lui-même sont modifiés (chromatogrammes non montrés). Ces changements n'ont eu aucun impact sur l'As. **Le tampon sélectionné restera donc l'acide acétique dans des proportions de 1 % pour la suite des expériences.**

Il est important de réaliser une dernière vérification. Un blanc contenant uniquement du méthanol est injecté dans le système chromatographique (Figure 75). Aucun pic n'est retrouvé après le volume mort démontrant que le méthanol n'absorbe pas à la longueur d'onde de 250 nm et qu'il n'y a pas eu de contamination du matériel.

**En conclusion, l'étude des témoins m'a permis de sélectionner un protocole de séparation en mode gradient dont les conditions chromatographiques sont résumées dans le Tableau 76.**

*Tableau 76 : Données du gradient optimisé*

| Intervalle (min) | Phase mobile A (% V : V) | Phase mobile B (% V : V) |
|------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0-14             | 90                       | 10                       |
| 14-20            | 90 à 30                  | 10 à 70                  |
| 20-26            | 30 à 90                  | 70 à 10                  |

**Le temps d'analyse est de 26 min, ce qui est tout à fait acceptable.**

**En ce qui concerne la préparation des témoins, seul le méthanol est testé comme solvant de reprise. Pour valider la totalité du protocole d'identification des deux isomères, il reste à étudier la dissolution des témoins dans un autre solvant et la variation de la longueur d'onde pour gagner en sensibilité. La suite de ce travail consiste donc à l'optimisation de ces deux paramètres cités. Etant donné la faible quantité de témoins disponible, l'optimisation des paramètres est effectuée avec un seul des deux isomères, la Z-guggulstérone.**

**b) Choix de la longueur d'onde**

J'ai pu constater que les longueurs d'onde de détection choisies pour les deux isomères oscillent entre 246 et 254 nm [130 – 132]. Pour avoir une méthode de dosage la plus sensible possible, la Z-guggulstérone est testée dans cette gamme de longueurs d'onde avec une fenêtre de 2 nm. Les analyses sont toutes réalisées selon le protocole optimisé. La Figure 76 représente les superpositions des chromatogrammes aux différentes longueurs d'onde dont les paramètres sont résumés dans le Tableau 77.

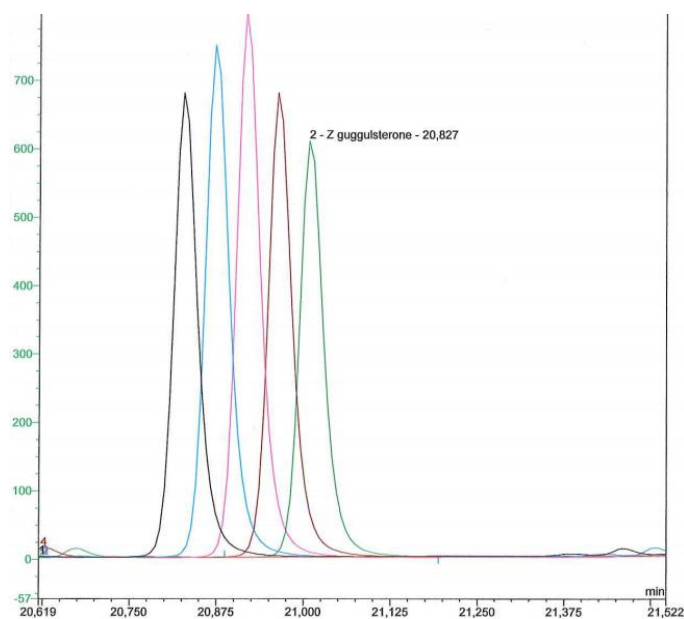


Figure 76 : Chromatogrammes de la Z-guggulstérone aux différentes longueurs d'onde : 246, 248, 250, 252 et 254 nm (de gauche à droite)

Tableau 77 : Paramètres chromatographiques de la Z-guggulstérone à différentes longueurs d'onde

| Longueur d'onde (nm) | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | As   |
|----------------------|------------------|---------------|------|
| 246                  | 28,503           | 678,628       | 1,32 |
| 248                  | 31,512           | 748,782       | 1,33 |
| 250                  | 33,414           | 797,193       | 1,31 |
| 252                  | 28,123           | 679,001       | 1,32 |
| 254                  | 25,767           | 608,213       | 1,31 |

D'après le chromatogramme 76 et le Tableau 77, la hauteur du pic la plus importante est retrouvée à la longueur d'onde de 250 nm. Lorsque celle-ci varie de 246 nm à 254 nm, la hauteur et l'aire des pics varient eux-aussi jusqu'à 23 %, avec un maximum d'absorption pour la Z-guggulstérone à 250 nm. Cependant, tous les pics présentent une certaine asymétrie qu'il faudra prendre en compte lors des intégrations des chromatogrammes.

**Pour la suite de ma recherche, la longueur d'onde est donc fixée à 250 nm.**

### *c) Choix du solvant de reprise*

Il reste maintenant à comparer les solvants de reprise afin de savoir s'il est possible d'améliorer la sensibilité de la méthode ou de faciliter la transposition à la matière première et au CCAP®.

Afin d'être dans des conditions comparables entre les substances de référence et le CCAP®, les deux isomères doivent être dissous dans le même solvant. Actuellement, le méthanol est sélectionné comme solvant de dissolution des témoins avant injection dans le système chromatographique. Or, le CCAP® est constituée d'éthanol 33 % (V : V), solvant non comparable avec le méthanol sans démonstration préalable. Il faut donc comparer les chromatogrammes obtenus après passage de deux solutions stocks de la Z-guggulstérone, dissoute d'abord dans du méthanol puis dans de l'éthanol 33 % (V : V) (Figure 77). La synthèse des paramètres chromatographiques pour chaque solvant de reprise est retrouvée dans le Tableau 78.

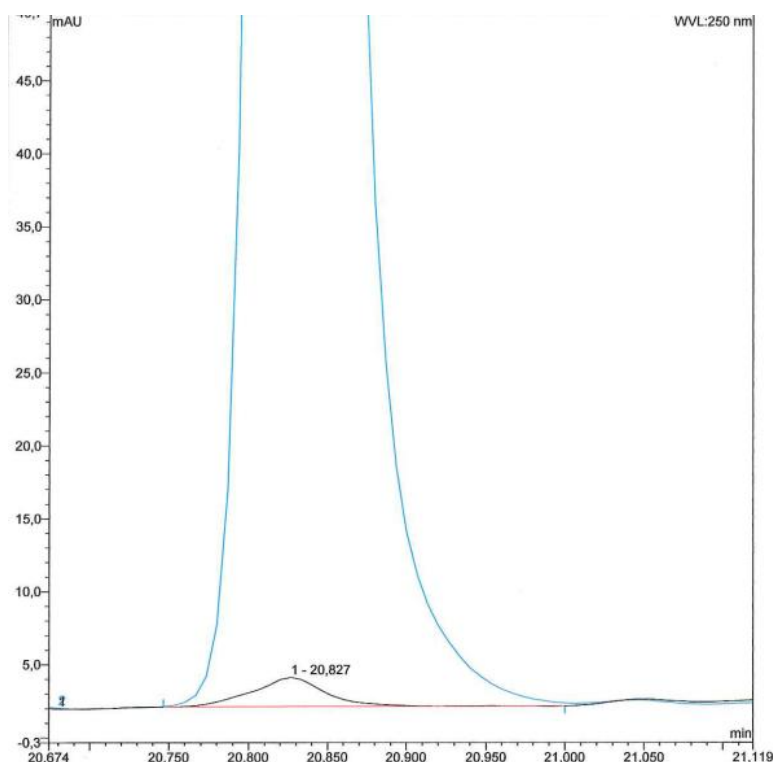


Figure 77 : Chromatogrammes de la Z-guggulstérone dissoute dans du méthanol (en bleu) ou dans de l'éthanol 33 % (en noir)

Tableau 78 : Paramètres chromatographiques du témoin Z-guggulstérone dissous dans deux solvants différents

| Solvant      | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | As   |
|--------------|------------------|---------------|------|
| Méthanol     | 13,205           | 308,997       | 1,32 |
| Ethanol 33 % | 0,108            | 2,011         | 1,01 |

La superposition de ces deux chromatogrammes et les données du tableau montrent que les aires et les hauteurs des pics sont complètement différentes bien qu'une même quantité soit injectée dans les deux cas. En effet, le pic correspondant à l'éthanol 33 % est beaucoup moins haut (2 mAU) que celui obtenu avec le méthanol (309 mAU). Les deux méthodes ne sont donc pas comparables. La perte de sensibilité de la méthode dans l'éthanol 33 % serait due à une moins bonne solubilité de la Z-guggulstérone dans ce solvant, ce qui était prévisible au vue de la structure chimique apolaire de ce stéroïde. **Le méthanol est donc choisi pour la suite de cette étude.**

**A ce stade du raisonnement, il est judicieux de ne pas risquer une perte de sensibilité supplémentaire en sélectionnant l'éthanol 33 % car de très faibles concentrations des deux isomères sont attendues dans le CCAP®. Ce choix du méthanol implique que le CCAP® devra subir une étape d'évaporation/reprise avant injection dans la colonne chromatographique pour rester dans des conditions comparables aux témoins et pour éviter un biais dans le dosage des molécules.**

**En résumé, les conditions analytiques sélectionnées pour la suite des expériences comprennent une élution en mode gradient, une détection à 250 nm et un solvant d'injection représenté par le méthanol.**

### **3. Développement de la méthode analytique de la matière première : myrrhe**

La monographie de la myrrhe et plus particulièrement de l'espèce *Commiphora mukul* est retrouvée dans la Pharmacopée Européenne version 9.2 [133]. Pour cette plante, la méthode de référence pour les autorités est la chromatographie sur couche mince permettant d'identifier deux substances de référence : l'anéthole et le thymol. Ces molécules sont des constituants chimiques de la fraction huile essentielle. **Je ne peux donc pas me baser sur cette monographie car elle n'est pas adaptée à cette problématique puisque je me focalise sur la partie résine. Cette fraction n'est pas abordée dans la Pharmacopée Européenne. C'est dans ce sens que la première partie de mon travail a été enrichissante car elle m'a permis de sélectionner des marqueurs actifs de la résine de myrrhe.**



L'encens et la myrrhe sont des exsudats de type oléo-gommo-résine dont la composition chimique de la fraction résine est constituée d'un ensemble de polyterpènes représenté notamment par les acides  $\beta$ -boswelliques et les guggulstérones. **Leurs similarités structurales ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques me permettent de partir de la monographie de l'encens pour extraire ces composés apolaires de l'oléo-gommo-résine de myrrhe.**

L'extraction par un procédé ou bien par un solvant donné peut être déterminante pour sélectionner un groupe précis de molécules. Dans ce travail, il est question d'étudier l'influence de deux processus d'extraction différents sur la matière première : la méthode d'extraction telle que décrite dans la Pharmacopée Européenne de l'encens et celle correspondant au dossier d'AMM du CCAP®.

### a) *Extraction par le méthanol*

Rappelons que les résines brutes de myrrhe sont finement broyées puis subissent une extraction de 10 min dans du méthanol à l'aide d'ultrasons. Les protocoles de séparation et de détection sont les mêmes que ceux des témoins. Les résultats obtenus par UHPLC-UV à 250 nm sont rassemblés dans la Figure 78.

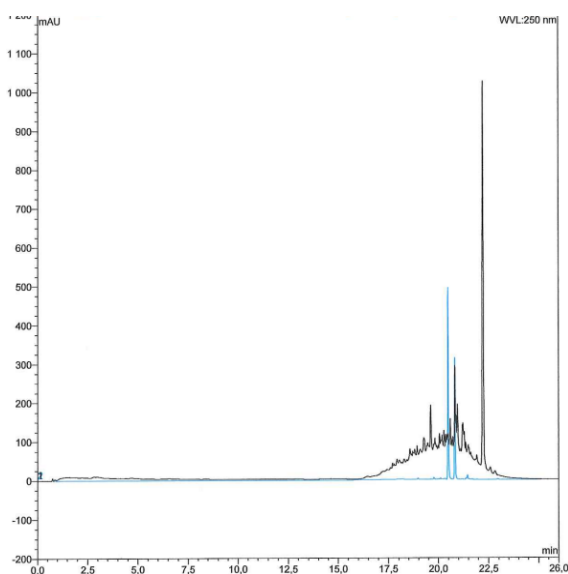


Figure 78 : Chromatogramme d'une solution de myrrhe à 1 % extraite avec du méthanol

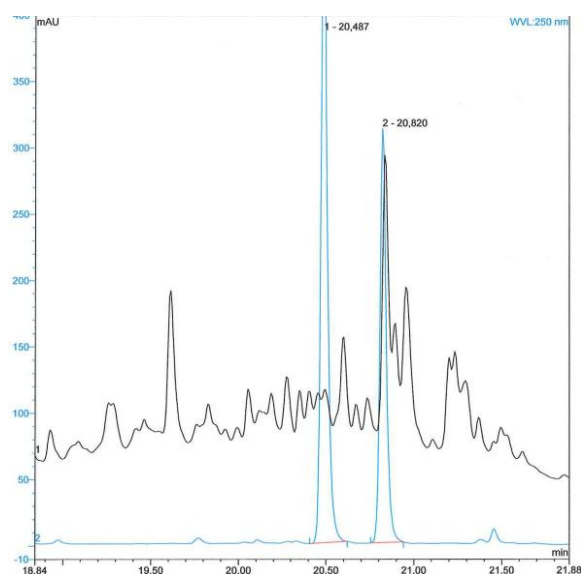


Figure 79 : Zoom du chromatogramme d'une solution de myrrhe à 1 % extraite avec du méthanol

Tableau 79 : Paramètres de séparation des E- et Z-guggulstérones dans la matière première

| Caractères analytiques | k'    | $\alpha$ | N         | Rs   | As   |
|------------------------|-------|----------|-----------|------|------|
| E-guggulstérone        | 26,32 | 1,017    | 2 248 655 | 6,31 | 1,25 |
| Z- guggulstérone       | 26,79 |          | 2 254 735 |      | 0,96 |

Une analyse globale du chromatogramme est réalisée en se basant sur le gradient décrit auparavant. Pendant les 15 premières minutes, quelques composés très polaires sortent, puis la ligne de base dérive simultanément avec l'augmentation des proportions d'ACN dans la phase mobile. Entre 17 et 23 min, un groupe de composés apolaires est élué qui doit certainement inclure les deux formes des guggulstérones. En se focalisant sur la partie d'intérêt (Figure 79), deux pics sortent aux  $t_r$  de 20,487 et 20,820 min. Ils présentent les mêmes  $t_r$  et les mêmes paramètres de rétention et séparation que les témoins, laissant penser que les deux formes sont bien retrouvées dans la matière première (Tableau 79).

Entre 20 et 21 min, de nombreux pics apparaissent et se chevauchent. En effet, ils n'ont pas le temps de revenir à la ligne de base que le composé suivant est déjà élué. Pour la E-guggulstérone, le premier pic enchâssé crée une déformation du second pic. Pour la forme Z, bien que le pic soit aussi superposé, sa plus grande hauteur permet de confirmer qu'il s'agit bien de la Z-guggulstérone.

Tableau 80 : Données quantitatives des E- et Z-guggulstérones dans la résine de myrrhe

| Caractères analytiques | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | Aire relative (%) |
|------------------------|------------------|---------------|-------------------|
| E-guggulstérone        | 0,431            | 13,407        | 6,84              |
| Z- guggulstérone       | 5,871            | 175,030       | 93,16             |

L'aire relative de la E-guggulstérone dans la matière première avoisine les 7 % alors que celle de la forme Z est de 93 % (Tableau 80). Le manque de séparation des différents composés de la résine ne permet pas réellement de donner une proportion fiable. **Néanmoins, la forme Z- guggulstérone semble être plus présente dans la résine que la forme E.**

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce résultat :

- ♣ Soit les ultrasons couplés au méthanol ne sont pas une technique suffisante pour extraire les deux formes
- ♣ Soit la E-guggulstérone est réellement présente en très faible quantité dans la myrrhe

Ce travail m'a amené à tester de nombreuses méthodes de séparation en UHPLC-UV, en passant du mode isocratique en mode gradient, en faisant varier les pourcentages des deux phases mobiles (résultats non montrés). Aucune modification n'a permis une meilleure séparation des composés de la matière première. Dans le dossier bibliographique, la séparation des composés de l'oléo-gommo-résine correspond à une succession d'extractions liquide-liquide. Ce travail n'a pu être réalisé de cette façon par manque de matériel. Je pense donc que l'étape d'extraction est un facteur limitant et reste à optimiser.

**Ainsi, la matière première utilisée dans la fabrication du CCAP® semble être constituée des deux formes de guggulstérone avec une plus forte proportion de Z que de E.**

### *b) Selon l'AMM du CCAP®*

La méthode d'extraction du dossier d'AMM présente une particularité consistant en une macération dans de l'éthanol 33 % (V : V) pendant une longue période. Dans cette expérience, toutes les étapes de l'extraction sont similaires, seule la durée de l'extraction diffère du procédé de fabrication du CCAP® : elle est beaucoup plus courte (quelques minutes). Après injection dans le système chromatographique, le chromatogramme obtenu est retrouvé dans la Figure 80.

Une simple analyse du chromatogramme révèle une énorme perte du signal donné pour les deux isomères, traduisant une difficulté de l'éthanol 33 % à extraire les composés de la résine de myrrhe. Les  $t_r$  sélectionnés (20,50 et 20,840 min) correspondent aux substances de référence. En revanche, la hauteur des pics est moins importante (Tableau 81) que précédemment avec le méthanol (Tableau 80).

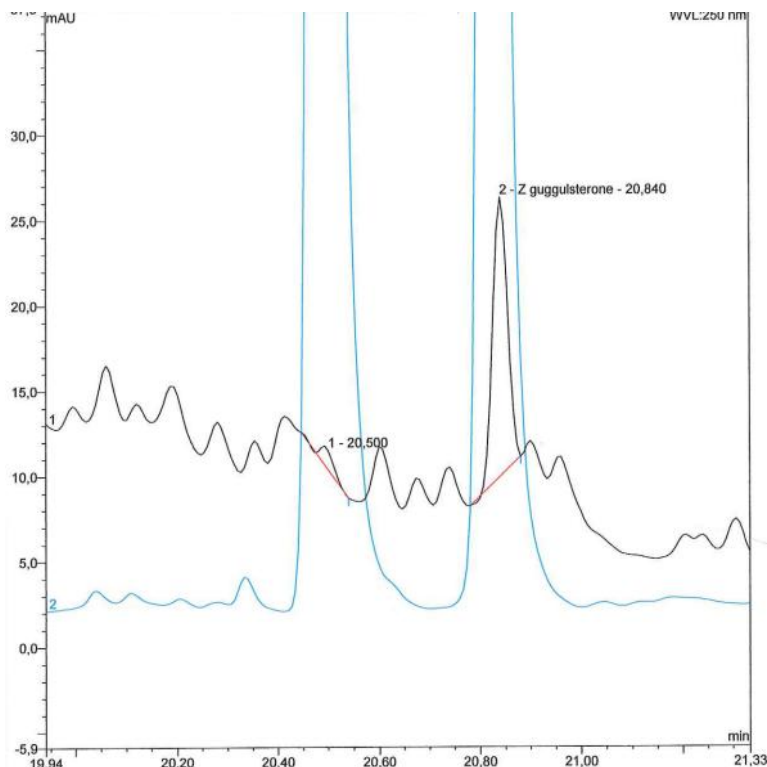


Figure 80 : Chromatogramme d'une macération de myrrhe dans de l'éthanol 33 % (en noir) et des témoins (en bleu)

Tableau 81 : Données issues des chromatogrammes des E- et Z- guggulstérone dans de l'éthanol 33 %

| Caractères analytiques | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | As   |
|------------------------|------------------|---------------|------|
| E-guggulstérone        | 0,017            | 0,528         | 0,75 |
| Z- guggulstérone       | 0,391            | 11,305        | 1,04 |

L'éthanol 33 % ne facilite donc pas l'extraction des deux isomères à partir de la résine de myrrhe. Mais dans le cas de cette expérience, le résultat est obtenu après seulement quelques minutes de contact avec le solvant. C'est pourquoi un nouvel essai est réalisé avec de la myrrhe qui a macéré pendant plusieurs jours, permettant de mettre en évidence ou non une différence d'extraction des composés d'intérêt par le solvant. Ces conditions permettent de prédire des résultats théoriquement obtenus dans le produit fini car lors du processus de fabrication, la myrrhe est macérée dans l'éthanol 33 % pendant une période prolongée. Les paramètres temps et solvant d'extraction sont testés afin de mieux prédire la présence de ces deux composés dans le CCAP® (Tableau 82).

Tableau 82 : Comparaison des paramètres chromatographiques des deux composés d'intérêt après plusieurs jours de macération dans l'éthanol 33 %

| Caractères analytiques |                           | J1     | J2     | J3     |
|------------------------|---------------------------|--------|--------|--------|
| E-guggulstérone        | Hauteur (mAU)             | 0,652  | 0,755  | 1,144  |
|                        | Aire observée (mAU x min) | 0,021  | 0,024  | 0,033  |
| Z-guggulstérone        | Hauteur (mAU)             | 11,796 | 13,659 | 16,352 |
|                        | Aire observée (mAU x min) | 0,404  | 0,468  | 0,558  |

Les données du Tableau 82 relèvent une cinétique d'extraction des composés au cours du temps. Le rendement d'extraction, déterminé à partir des aires des pics, est significativement différent pour une durée de 24 h ou de 72 h de macération. Pour les deux isomères, les données chiffrées confirment que la macération pendant une plus longue période telle que dans le procédé de fabrication du CCAP® permettrait une meilleure extraction du composé à partir de la résine de myrrhe. De plus, cette expérience appuie l'hypothèse de la prépondérance de la forme Z dans l'oléogommo-résine de myrrhe.

**L'interprétation de ces derniers résultats révèle que la nature du solvant, le procédé d'extraction employé et le temps de macération semblent influencer significativement les résultats du dosage des composés stéroïdiens recherchés.**

**Le procédé de fabrication du CCAP® implique l'éventuelle existence de faibles concentrations des deux isomères dans le produit fini. De plus, viennent s'ajouter les difficultés d'extraction des deux composés par l'éthanol 33 %. A ce stade du raisonnement, je suppose que seule la forme Z pourra être identifiée et dosée dans le CCAP®.**

#### **4. Développement de la méthode analytique dans le CCAP®**

Rappelons que les E- et Z- guggulstérone pourraient être choisies comme marqueurs de la résine de myrrhe dans le CCAP®. Leur dosage est donc une étape importante du processus permettant de répondre aux Lignes Directrices du 19 mars 2015.

a) *CCAP® pur*

Le CCAP® pur est injecté en UHPLC-UV à 250 nm dans les mêmes conditions analytiques que les témoins. Les deux molécules apolaires sont identifiées par comparaison avec les résultats préalablement obtenus avec les témoins en vérifiant leur  $t_r$  et leur ordre d'élué. Le chromatogramme est présenté dans la Figure 81.

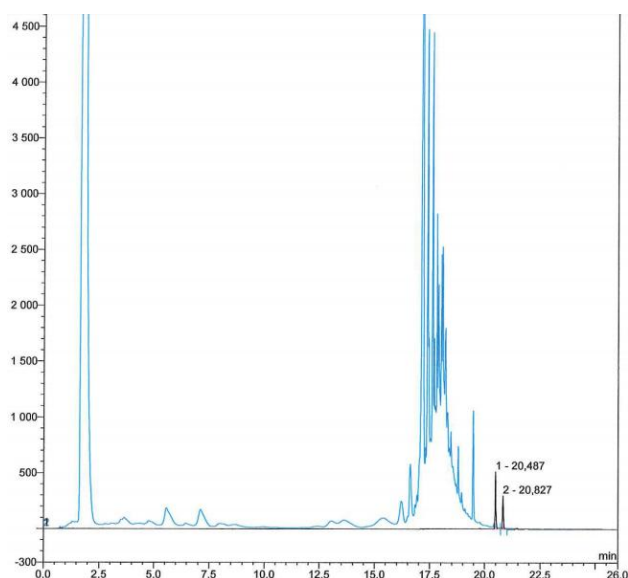


Figure 81 : Chromatogramme du CCAP® pur

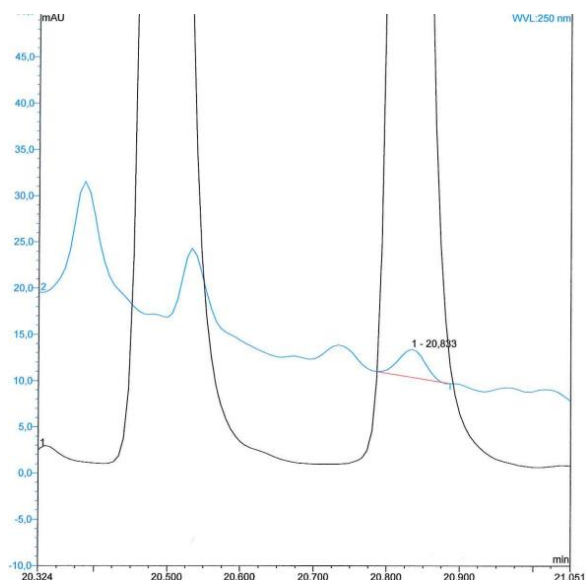


Figure 82 : Zoom du chromatogramme du CCAP® pur

Tableau 83 : Paramètres de rétention de la Z-guggulstérone dans le CCAP® pur

| Caractères analytiques | $k'$  | N         | As   |
|------------------------|-------|-----------|------|
| Z-guggulstérone        | 26,62 | 1 757 526 | 0,88 |

En regardant le chromatogramme dans sa globalité (Figure 81), le profil du CCAP® est quelque peu différent de celui de la matière première (Figure 78). **Les deux substances de référence sont éluées juste après le pic qui apparaît à 17,5 min.**

Pendant les 15 premières minutes, les composés les plus polaires sortent de la colonne. Puis, entre 16 et 20 min, pendant l'augmentation des proportions d'ACN, une grande quantité de composés sont élués. Ce n'est que dans la descente du gradient qu'apparaissent les deux isomères aux  $t_r$  respectifs de 20,487 min et 20,827 min, temps correspondant à ceux des témoins.

En se focalisant sur la partie d'intérêt (Figure 82), un isomère est identifié avec certitude : la Z-guggulstérone qui a un  $t_r$  de 20,827 min et des paramètres analytiques (Tableau 83) en parfaite cohérence avec ceux du témoin.

En ce qui concerne la E- guggulstérone, un décalage est observé entre le pic correspondant au témoin et le pic identifié dans le CCAP<sup>®</sup>. Ce décalage peut être du soit à une mauvaise séparation soit à une déformation du pic. J'émetts l'hypothèse que cet isomère ne serait pas présent dans le CCAP<sup>®</sup>. Afin de vérifier cette théorie, une petite quantité de poudre du témoin E-guggulstérone est rajoutée au CCAP<sup>®</sup>, qui est ensuite réinjecté en UHPLC-UV. Le chromatogramme de la Figure 83 est alors obtenu.

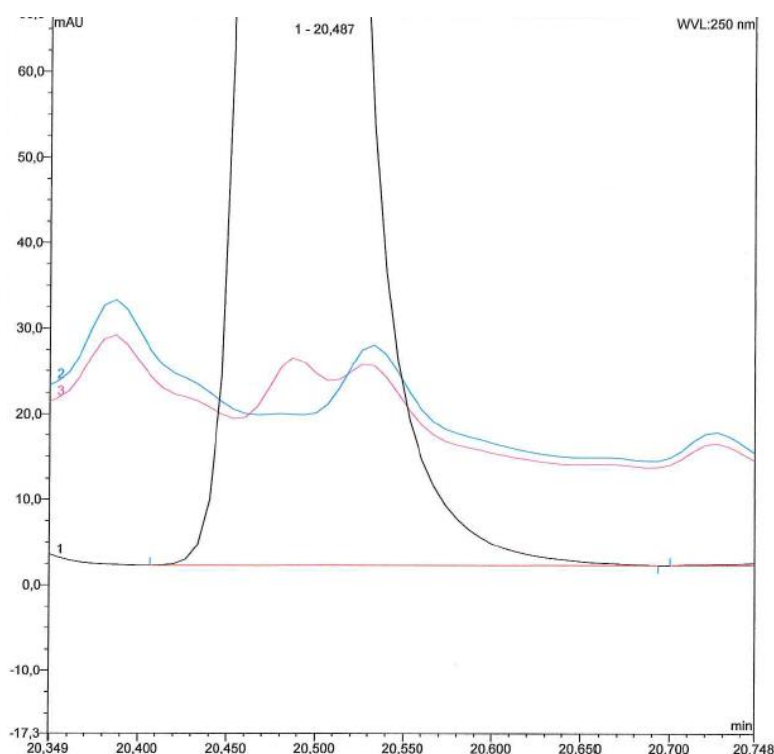


Figure 83 : Chromatogramme du CCAP<sup>®</sup> pur (en bleu), de la solution stock de la E-guggulstérone (en noir) et du CCAP<sup>®</sup> pur avec ajout de E-guggulstérone (en rose)

Après l'injection du CCAP<sup>®</sup> avec ajout de E-guggulstérone, un nouveau pic apparaît au  $t_r$  de la substance témoin, correspondant au composé d'intérêt. Cela signifie que la E- guggulstérone n'est pas présente dans le CCAP<sup>®</sup> pur ou en quantité infinitésimale.

Deux lots de CCAP<sup>®</sup> pur (CH 164 et CH 166) sont injectés dans le système chromatographique et les données brutes du pic correspondant à l'isomère recherché sont résumées dans le Tableau 84.

Tableau 84 : Données brutes de la Z-guggulstérone de 2 lots de CCAP® pur

| Caractères analytiques | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | As   |
|------------------------|------------------|---------------|------|
| CH 166                 | 0,124            | 3,034         | 0,93 |
| CH 164                 | 0,123            | 3,138         | 0,88 |

Force est de constater que la concentration en Z-guggulstérone est similaire d'un lot de CCAP® à l'autre.

Ces résultats mettent clairement en évidence que seule la forme Z-guggulstérone est retrouvée dans le CCAP®. De plus, cet isomère est présent en concentration suffisante pour être dosé. L'étape de concentration disparaît donc du procédé. Il reste néanmoins à résoudre le problème du dosage qui ne peut pas être réalisé dans la matrice d'origine. Rappelons que le composé est dissous dans de l'éthanol 33 % alors que la Z-guggulstérone est retrouvée avec du méthanol dans les solutions témoins. Désormais, le méthanol ayant été sélectionné au détriment de l'éthanol 33 %, le CCAP® devra subir une étape d'évaporation/reprise avant injection dans la colonne chromatographique.

#### *b) Evaluation de l'erreur liée à l'évaporation/reprise*

Pour déterminer la précision de la technique d'évaporation/reprise dans le méthanol à partir du CCAP®, une expérience est réalisée sur le témoin Z-guggulstérone.

Pour cela, une nouvelle solution stock est fabriquée à partir d'une masse d'environ exactement 0,310 mg de poudre pure, dissoute dans 20 mL d'éthanol 33 % (V : V), donnant une concentration finale de 15,5 µg/mL. Exactement 11 mL de cette solution sont distillés par évaporateur rotatif puis repris dans un volume exact de méthanol QSP 11 mL. Cette solution est donc évaporée/reprise, puis injectée dans le système chromatographique (Figure 84). En parallèle, une solution de Z-guggulstérone est fabriquée à partir de méthanol à la concentration de 12,5 µg/mL. Cette solution non évaporée/non reprise me sert de comparaison (Figure 84).

La comparaison de ces deux solutions me permet d'évaluer l'erreur liée à l'étape d'évaporation/reprise.



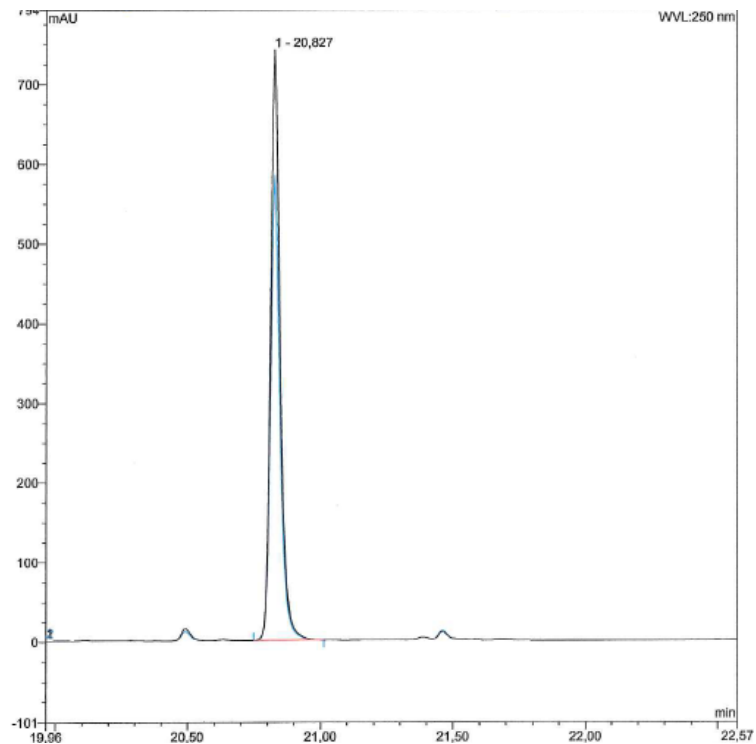


Figure 84 : Superposition des chromatogrammes de la solution stock à 12,5 µg/mL de la Z-guggulstérone (en bleu) et de la solution évaporée et reprise dans le méthanol (en noir)

Les deux pics sortent aux mêmes tr. Par contre, les hauteurs et les aires diffèrent entre les deux solutions, ce qui est normal puisqu'elles ne sont pas de concentration comparable. Les résultats bruts sont données dans le Tableau 85.

Tableau 85 : Comparaison des données brutes des deux solutions témoins évaporée/non évaporée

| Solution stock           | Concentration théorique (µg/mL) | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | As   |
|--------------------------|---------------------------------|------------------|---------------|------|
| Evaporée/reprise         | 15,5                            | 30,839           | 741,101       | 1,31 |
| Non évaporée/Non reprise | 12,5                            | 24,290           | 583,530       | 1,28 |

Après avoir recalculé l'aire du pic de la solution évaporée/reprise dans les mêmes conditions de concentration que la solution comparative, une aire de 24,870 mAU x min est obtenue, très proche de l'aire de la solution non évaporée/non reprise.

Un pourcentage d'erreur peut être déterminé :

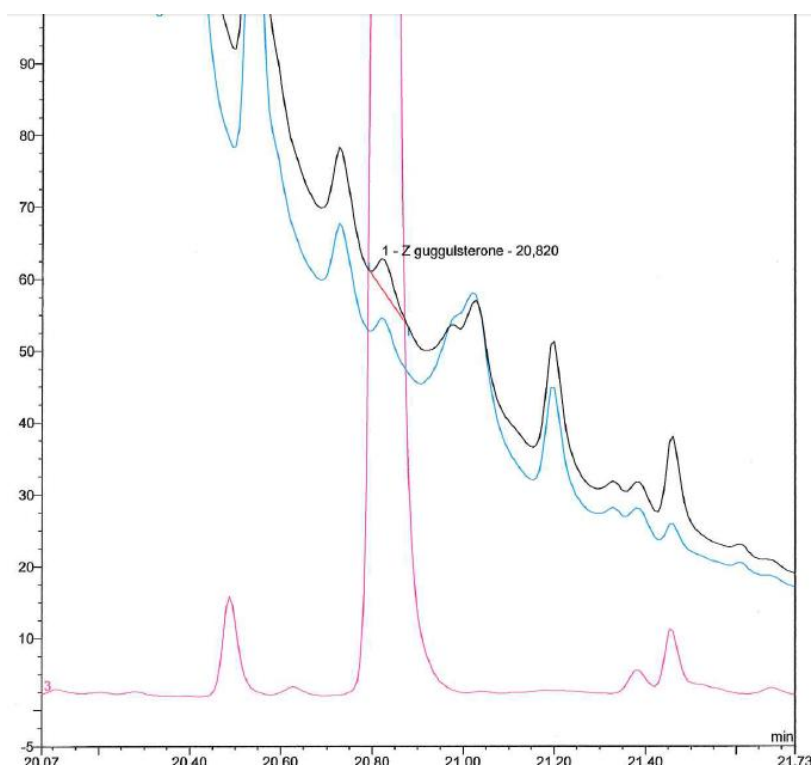
$$\% \text{ erreur} = \frac{24,870}{24,290} \times 100 - 100 = 2,389 \%$$

**Le très faible pourcentage d'erreur entre la solution non évaporée/non reprise et la solution évaporée/reprise montre que cette technique permet de rendre un résultat fiable.**

### *c) Dosage de la Z-guggulstérone dans le CCAP®*

#### *(1) Protocole*

Le même protocole d'évaporation/reprise est réalisé avec le CCAP®. Exactement 11 mL de CCAP® sont évaporés puis repris dans du méthanol QSP 11 mL. La solution est alors injectée dans le système chromatographique permettant de générer les chromatogrammes de la Figure 85.



*Figure 85 : Superposition des chromatogrammes du témoin (en rose) et de deux échantillons de CCAP® repris dans du méthanol (en noir et en bleu)*

Le chromatogramme permet de confirmer la présence de la Z-guggulstérone dans le CCAP® et les résultats bruts sont résumés dans le Tableau 86.

Tableau 86 : Données quantitatives de la Z-guggulstérone dans le CCAP®

| Caractère analytique | Aire (mAU x min) | Hauteur (mAU) | As   | BDF   |
|----------------------|------------------|---------------|------|-------|
| Z-guggulstérone      | 0,202            | 4,654         | 0,95 | 0,896 |

En se basant sur le BDF du lot CH 166 du CCAP® utilisé comme référence dans ces expériences, les données peuvent être analysées de la façon suivante :

- ♣  $3 \times BDF = 2,688$
- ♣  $10 \times BDF = 8,960$

La hauteur du pic correspondant à la Z-guggulstérone dans le CCAP® est donc comprise entre 3 et 10 fois le BDF, ce qui signifie que sa concentration est située entre la LOD et la LOQ. Il est alors nécessaire de déterminer ces deux paramètres.

## (2) Détermination de la LOD et LOQ

Une solution de témoin Z-guggulstérone est diluée de façon à ce que la hauteur du pic soit égale à 3 fois et 10 fois le BDF. Ces solutions filles ont donc une concentration respectivement égales à la LOD et la LOQ.

Une analyse et des calculs préalables ont permis de faire une approximation de la valeur de la LOD et de la LOQ afin de faciliter l'expérimentation. Pour cela, l'injection répétée de solutions de témoins diluées a permis de fixer la LOD à 45 ng/mL et la LOQ à 258 ng/mL. **La concentration en Z-guggulstérone dans le CCAP® est donc comprise entre 45 et 258 ng/mL. Par simple conversion du volume de CCAP® en masse, nous obtenons une concentration en Z-guggulstérone par kilogramme de CCAP® comprise entre 0,047 mg/kg et 0,269 mg/kg. Autrement dit, un flacon de CCAP® (60 mL) en contient entre 2,7 µg et 15,48 µg.**

## V. Conclusion

Les études analytiques proposées dans la littérature ont montré que la myrrhe est une plante riche en molécules très diverses et parmi la famille des stéroïdes, les E- et Z-guggulstérones sont des molécules bioactives. Ces deux isomères ont donc été sélectionnés comme marqueurs dans le but de les identifier et de les quantifier dans le CCAP®.

Dans ce travail, j'ai appliqué et optimisé les protocoles déjà existants et amélioré les conditions d'analyse. Les deux composés ont été analysés en UHPLC-UV sur une colonne Kinetex®.

L'étude analytique entreprise a porté en premier lieu sur les deux solutions témoins, ce qui m'a permis de choisir les conditions opératoires les plus appropriées pour l'identification des deux formes dans le CCAP®. Les chromatogrammes ont révélé un ordre d'élution et des temps de rétention corrects. Les paramètres de séparation se sont avérés très satisfaisants. Suite à l'injection de CCAP® pur dans le système chromatographique, la forme E-guggulstérone n'est pas retrouvée. Si cette forme y existe, ce n'est qu'à l'état de trace. **Seul l'isomère Z-guggulstérone a pu être identifié.**

Lors de l'optimisation des conditions analytiques, le méthanol a été sélectionné comme le meilleur solvant pour la préparation des témoins et l'extraction de la matière première. Pour doser la molécule d'intérêt dans le CCAP®, l'éthanol 33 % a été remplacé par le méthanol afin de pouvoir la comparer aux témoins. L'étape d'évaporation/reprise via l'évaporateur rotatif s'est avéré une méthode efficace et facile à mettre en œuvre afin de reprendre le CCAP® dans le même solvant que les témoins. Une expérience a révélé un pourcentage négligeable de perte de matière lors de l'étape d'évaporation/reprise. Dans ce travail, il a été choisi de ne pas concentrer le CCAP® car l'isomère est retrouvé en concentration suffisante pour rendre une valeur approchée.

En effet, la hauteur du pic correspondant à la forme Z du composé d'intérêt se situe entre 3 et 10 fois le BDF, plaçant la concentration de ce composé entre la LOD et la LOQ. Leur détermination permet de rendre un résultat approché témoignant de la très faible concentration en composé d'intérêt dans le produit fini. **La concentration de cet isomère est donc comprise entre 45 ng/mL et 258 ng/mL, ce qui correspond à des quantités par flacon de CCAP® situées entre 2,7 et 15,48 µg. Pour un individu de 70 kg, l'ingestion d'un flacon entier de CCAP® correspondrait à une administration entre 0,039 µg/kg de poids corporel et 0,221 µg/kg, valeurs infimes au regard de la DL<sub>50</sub> et des doses toxiques provoquant des effets indésirables chez l'homme. Il n'y a pas de données de toxicité par voie topique, bien qu'il soit peu probable que la myrrhe utilisée à une aussi faible concentration par voie topique puisse engendrer une toxicité alors qu'elle n'en provoquerait pas par voie orale.**

**Ainsi, la Z-guggulstérone est présente en concentration infime dans le CCAP® au regard de sa toxicité, laissant supposer une absence d'effets indésirables lors de l'utilisation du produit fini par voie topique chez l'homme.**



## **Conclusion Générale**

L'industrie pharmaceutique est actuellement régie par des exigences strictes qui doivent être appliquées tout au long du cycle de vie du médicament. Elle doit notamment mettre en place un système qualité performant et précis, permettant de garantir la maîtrise de chacune de ses activités. A partir de référentiels connus, chaque entreprise se doit de définir les moyens et les méthodes spécifiques pour atteindre le résultat escompté et maîtriser les risques liés à la fabrication, la distribution et l'utilisation du médicament, et ce dans le but de garantir la sécurité du patient. Les BPF correspondent au référentiel qualité opposable par les autorités réglementaires. La dernière version des BPF inclut des Lignes Directrices concernant la gestion du risque appliquée aux excipients, le 30 décembre 2016. Mon travail de thèse s'inscrit dans la problématique actuelle du Laboratoire Pionneau qui est de répondre à ces Lignes Directrices. Après lecture de ce document officiel, le Laboratoire Pionneau répond déjà à certains points, notamment sur le suivi des matières premières (achat, importation et stockage, choix des fournisseurs, analyses), le tout conformément aux BPF. Mes recherches se focalisent sur le chapitre 2 de ces Lignes Directrices stipulant que le titulaire de l'autorisation de fabrication doit tenir compte de l'utilisation et de la fonction des excipients. Il doit répondre aux éléments suivants :

- ♣ la forme pharmaceutique et l'utilisation du médicament contenant l'excipient
- ♣ la fonction de l'excipient dans la formule
- ♣ la proportion de l'excipient dans la composition du médicament
- ♣ la consommation journalière de l'excipient par le patient
- ♣ les effets connus ou potentiels sur les caractéristiques essentielles pour la qualité du médicament

Cette thèse représente donc un travail entièrement consacré à l'étude de l'encens et de la myrrhe. Pour répondre aux différents points cités, deux axes ont été développés.

- ♣ Les études bibliographiques ont permis d'avoir une connaissance chimique, pharmacologique et toxicologique des composés majoritaires et/ou bioactifs de la fraction résine, fraction la plus abondante dans le CCAP®. Ces éléments auraient été suffisants pour répondre à la demande des autorités.
- ♣ Pour être plus précis, le Laboratoire Pionneau a voulu confirmer la présence et évaluer la quantité de ces composés dans le CCAP®, par le biais d'études analytiques.

Chacun des axes du chapitre 2 des Lignes Directrices est abordé individuellement.

- ♣ La forme pharmaceutique et l'utilisation du médicament contenant l'excipient

Médicament d'usage traditionnel et à base de plantes (autorisé n°CIP : 3400930252659), il appartient à la catégorie des antiseptiques (classe ATC D08AX), répondant donc aux normes antiseptiques. Il se présente sous la **forme d'une solution pour application cutanée**. Non soumis à prescription obligatoire, ses deux indications thérapeutiques sont le **traitement d'appoint des ecchymoses et des contusions ainsi que l'antiseptie des plaies superficielles et peu étendues**.

- ♣ La fonction de l'excipient dans la formule

Deux genres de plantes soit quatre espèces entrent dans la formulation de ce médicament : l'encens (*Boswellia serrata* et *Boswellia carterii*) et la myrrhe (*Commiphora myrrha* et *Commiphora mukul*). L'encens et la myrrhe en sont les excipients de **fonction aromatisante** (1 % chacun).

- ♣ La consommation journalière de l'excipient par le patient

Le CCAP® s'applique sur la lésion à l'aide d'une compresse 2 à 4 fois par jour pendant 5 jours.

- ♣ La proportion de l'excipient dans la composition du médicament

L'encens et la myrrhe sont des oléo-gommo-résines. Ce nom indique que ce sont des concrétions constituées de trois fractions dont leurs proportions sont connues. La fraction huile essentielle est retrouvée dans des proportions de 5 à 10 %, la gomme atteint un pourcentage compris entre 30 à 65 % et la fraction résine se situe entre 30 à 60 %.

Les informations collectées ont permis de connaître la composition chimique de la **fraction huile essentielle** (limonène, furanodesma-1,3-diène) **et gomme** (galactose, arabinose). **De par leurs propriétés physico-chimiques et la technique de fabrication du CCAP®, la présence des molécules des deux fractions est exclue de la composition des excipients dans le CCAP®. Si elles y sont présentes, ce n'est qu'à l'état de trace.** Ces informations sont complétées par des pistes préliminaires réalisées en GC-FID au Laboratoire Pionneau qui n'ont pas permis d'identifier ces huiles essentielles dans le CCAP®. A contrario, les composés de la fraction résine sont les représentants des deux excipients dans le produit fini. L'encens est constitué majoritairement d'acides  $\beta$ -boswelliques et les guggulstérones sont des molécules bioactives de la résine de myrrhe.

Les études analytiques réalisées au Laboratoire Pionneau ont permis de rendre des résultats sur l'identification et la quantification des différents composés du CCAP®. C1 et C2 sont donc quantifiées à 0,73  $\mu\text{g/mL}$  et 0,20  $\mu\text{g/mL}$  de CCAP®. La concentration de B1 est inférieure à 0,37  $\mu\text{g/mL}$ . La Z-guggulstérone dans le CCAP® a une concentration comprise entre 45 ng/mL et 258 ng/mL. **L'ordre de**



**grandeur de ces différentes concentrations est donc extrêmement faible.**

- ♣ Les effets connus ou potentiels sur les caractéristiques essentielles pour la qualité du médicament

**Les études de toxicologie de la gomme et des huiles essentielles réalisées par voie topique et systémique permettent de conclure sur l'absence de toxicité de ces deux fractions dans le CCAP®.** Toutes les DL<sub>50</sub> sont supérieures au seuil de toxicité conventionnellement admis, corroborant l'absence d'effets indésirables lors des études précliniques et cliniques.

L'éventuelle toxicité de la résine d'encens et de myrrhe est déterminée par les valeurs des DL<sub>50</sub> ainsi que par l'utilisation en médecine traditionnelle. Les DL<sub>50</sub> ont été évaluées pour les deux plantes supérieures à 2 g/kg, ce qui témoigne d'une très faible toxicité en cas d'ingestion. Ces valeurs sont comparées aux concentrations obtenues lors des dosages. En cas d'administration par voie orale d'un flacon entier (60 mL) de CCAP® chez un individu de 70 kg, la dose ingérée exprimée par kilogramme de poids corporel est estimée inférieure à 0,3 µg/kg pour B1, égale à 0,625 µg/kg pour C1 et 0,171 µg/kg pour C2, et comprise entre 0,039 et 0,221 µg/kg pour la Z-guggulstérone. **Toutes ces concentrations sont considérablement inférieures à celles utilisées dans les différentes études de toxicité de la littérature, ce qui indique l'absence de toxicité de tous ces composés. Les concentrations des molécules éventuellement toxiques sont très inférieures à la DL<sub>50</sub> (d'un facteur 10<sup>7</sup>). Egalement, deux études cliniques étudiant les effets indésirables induits par l'application par voie topique d'acides β-boswelliques ont révélé une très bonne tolérance.**

Aux Etats-unis, l'oléo-gommo-résine d'encens fait partie des listes des substances sûres et son utilisation est autorisée par la FDA en tant qu'additif alimentaire. En France, l'ANSM a reconnu les vertus de la teinture de myrrhe dans le cadre des traitements des petites plaies, en cas de nez bouché et de rhume et enfin comme antalgique dans les affections de la cavité buccale et/ou du pharynx. L'extrait de myrrhe est approuvé par la FDA pour l'utilisation dans l'alimentation et la santé bucco-dentaire. Cet extrait a reçu le statut GRAS et est reconnu comme ingrédient de saveur par l'EMA.

D'autres informations ont permis d'étoffer ces premiers résultats. L'absence de toxicité du CCAP® est démontrée par l'usage depuis plus de 150 ans. De plus, le Laboratoire Pionneau a effectué des études de cytotoxicité et mutagénicité en 2015. Pour cela, un milieu de culture contenant 5 mg/mL de CCAP® n'entraîne pas de toxicité sur la culture cellulaire. Des doses (5000, 1500, 500, 150, et 50 µg/boite) préparées à partir d'une solution de CCAP® n'engendrent pas d'activité mutagène vis-à-vis de quatre souches de *Salmonella typhimurium* et d'une souche d'*Escherichia coli*. **La solution de CCAP® pour application cutanée n'est ni cytotoxique ni mutagène.**

**D'après des fiches de données de sécurité de l'encens et de la myrrhe, aucune mention n'est signalée concernant la toxicité. De plus, la réglementation REACH annonce qu'aucune précaution n'est à prendre pour les composés chimiques issus de l'encens et la myrrhe. Ainsi, il n'y a pas de réglementation toxicologique sur les molécules constitutives des deux plantes.**

Ainsi, ma thèse a permis de répondre aux parties qui n'étaient pas encore maîtrisées par le Laboratoire Pionneau. Ce document s'inclut dans le cadre de la maîtrise de la gestion du risque des excipients. Le titulaire de l'autorisation de fabrication conservera sur place cette documentation relative à l'évaluation/la gestion du risque aux fins de la détermination des BPF appropriées concernant les excipients.

Les principes de gestion du risque de la qualité sont ici utilisés pour évaluer les risques liés à la qualité, la sécurité et la fonction de chaque excipient. **En effet, l'analyse du risque lié à l'utilisation de l'encens et la myrrhe en tant qu'excipient dans le CCAP® a permis de démontrer l'absence de toxicité de ces deux oléo-gommo-résines lors d'une utilisation par voie topique.**



## **Références Bibliographiques**

- [1] - Bonnes Pratiques de Fabrication Partie III - ICH Q9 et ICH Q10
- [2] - Lignes directrices du 19 mars 2015 relatives à l'évaluation formalisée du risque visant à déterminer les bonnes pratiques de fabrication appropriées pour les excipients utilisés dans les médicaments à usage humain (2015/C 95/02)
- [3] - <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/glossair/glossair.php>
- [4] - The International Pharmacopeia, Fourth Edition 2013 (incl. First, Second and Third Supplements)
- [5] - ANSM, Qu'est ce que la pharmacopée ?  
[http://ansm.sante.fr/Activites/Pharmacopée/QuJestJceJqueJlaJPharmacopée/\(offset\)/1](http://ansm.sante.fr/Activites/Pharmacopée/QuJestJceJqueJlaJPharmacopée/(offset)/1)
- [6] - AFSSAPS, Bonnes Pratiques de Fabrication ; bulletin officiel N° 2011/8 bis
- [7] - Chardonnet A., Thibaudon D. (2003), « Le guide du PDCA de DEMING, progrès continue et management ». Paris, éditions d'organisation ; p 62
- [8] - Comité OMS d'experts des spécifications relatives aux bonnes pratiques de fabrication des produits pharmaceutiques (1992). OMS, Série de rapports techniques, N° 823, annexe 1 ; Genève
- [9] - Roché Y. (Mars 2011), « Aspects théoriques des nouveaux concepts de gestion de la qualité ICH Q8, ICH Q9 et ICH Q10 : vers un référentiel universel ». Paris, France
- [10] - The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Quality Guidelines (09/11/2005). Quality Risk Management Q9 version 4
- [11] - Gouch P.H., Lilly E. and company (2004), ICH Q9 « Quality Risk Management ». An Industry View
- [12] - Lexique définitions normalisées (ISO 9000), Extraits du document AFNOR (Association Française de Normalisation), NF EN ISO 9000 (10/2005). [www.afnor.fr](http://www.afnor.fr)
- [13] - Règlement REACH. <https://echa.europa.eu/fr/regulations/reach>
- [14] - Monographie de l'encens de la Pharmacopée Européenne (2016), version 9.0, Tome 1
- [15] - Hillis W.E. (1987), « Heartwood and Tree Exsudates ». Springer-Verlag ; New York Inc.

- [16] - Al-Harrasi A., Al-Saidi S. (2008), « Phytochemical Analysis of the Essential Oil from Botanically Certified Oleogum Resin of *Boswellia sacra* (Omani Luban) ». *Molecules* ; 13(9) : 2181-2189
- [17] - Cordemoy H.J. (1911), « Les Plantes à Gommés et à Résines ». Octave Doin et Fils ; Paris
- [18] - Langenheim J.H. (2004), « Plant Resins : Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany ». *Annales of Botany* ; 93(6) : 784–785
- [19] - Santiago-Blay J., Lambert J. (2007), « Aux sources de l'ambre : l'analyse spectroscopique des matières exsudées par les végétaux actuels constitue le fondement d'une identification chimique et botanique des ambres et des autres résines fossiles ». *Pour la science* ; 356 : 70-75
- [20] - Konno K. (2011), « Plant latex and other exudates as plant defense systems : Roles of various defense chemicals and proteins contained therein ». *Phytochemistry* ; 72 : 1510-1530
- [21] - Ramos M.V., Grangeiro T.B., Freire E.A., Sales MP, Souza D.P., Araújo E.S., Freitas C.D.T. (2010), « The defensive role of latex in plants : detrimental effects on insects ». *Arthropod-Plant Interac* ; 4 : 57-67
- [22] - Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M. (2001), « Botanique-Pharmacognosie, Phytothérapie-Homéopathie ». *Le préparateur en pharmacie, Dossier 2, Ted & Doc* ; Paris
- [23] - Nabors M.W. (2009), « Biologie végétale. Structures, fonctionnement, écologie et biotechnologies ». Traduction de Sallés G. Pearson Education France ; Paris
- [24] - De Silva T. (1995), « Development of essential oil industries in developing countries ». United Nations Industrial Development Organization Vienna ; Austria
- [25] - Niebler J., Buettner A. (2016), « Frankincense Revisited, Part I : Comparative Analysis of Volatiles in Commercially Relevant *Boswellia* Species ». *Chemistry and Biodiversity* ; 13(5) : 613-29.
- [26] - Hussain H., Al-Harrasi A., Al-Rawahi A., Hussain J. (2013), « Chemistry and Biology of Essential Oils of Genus *Boswellia* ». *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*
- [27] - Hanus L. O., Rezankab T., Dembitskya V. M., Moussaieffa A. (2005), « Myrrh-Commiphora chemistry ». *Biomedical Papers* ; 149(1) : 3-28
- [28]- André C., Bettenfeld M.L. (2012), « Applications des huiles essentielles dans le domaine des arômes et parfums ». In. X. Fernandez & F. Chemat (Eds), *La chimie des huiles essentielles : Tradition et innovation* ; pp. 193-211 ; Paris : Vuibert

- [29] - Miller J.A., Thompson P.A., Hakim I.A., Lopez A.M., Thomson C.A., Chew W., Hsu C.H., Chow H.H. (2012), « Safety and Feasibility of Topical Application of Limonene as a Massage Oil to the Breast ». *J Cancer Ther.* ; 3(5A)
- [30] - Matura M., Goossens A., Bordalo O., Garcia-Bravo B., Magnusson K., Wrangsjö K., Karlberg AT. (2003), « Patch testing with oxidized R-(+)-limonene and its hydroperoxide fraction ». *Contact Dermatitis* ; 49(1) : 15-21
- [31] - Viaud H. (1993), « Thérapeutiques naturelles », GNOMA Ed.
- [32] - Bruneton J. (2009), « Pharmacognosie », 4e édition, Edition Lavoisier
- [33] - Kaloustian J., Hadji-Minaglou F. (2012), « La connaissance des huiles essentielles », Edition Springer-Verlag ; France, Paris
- [34] - Munro I.C., Danielewska-Nikiel B. (2016), « Comparison of estimated daily intakes of flavouring substances with no-observed-effect levels ». *Food Chem Toxicol.* ; 44(6) : 758-809
- [35] - « Essential Oil Safety : A Guide for Health Care Professionals » (2013), 2nd Edition
- [36] - Herrmann A., Lechtenberg M., Hensel A. (2007), « Comparative isolation and structural investigations of polysaccharides from *Boswellia serrata* ROXB. and *Boswellia carterii* BIRDW ». *Planta Medica* ; 73 : 815
- [37] - Herrmann A., König S., Lechtenberg M., Sehlbach M., Vakhrushev S.Y., Peter-Katalinic J., Hensel A. (2012), « Proteoglycans from *Boswellia serrata* Roxb. and *B. carteri* Birdw. and identification of a proteolytic plant basic secretory protein ». *Glycobiology* ; 22(11) : 1424-39
- [38] - Sarup P., Bala S., and Kamboj S. (2015), « Pharmacology and Phytochemistry of Oleo-Gum Resin of *Commiphora wightii* (Guggulu) ». *Scientifica* ; Article ID 138039, 14 pages
- [39] - Malviya R., Srivastava P., Kulkarni G.T. (2011), « Applications of Mucilages in Drug Delivery ». A Review, *Adv. Biol. Res.* ; 5, 01–07
- [40] - Deogade U.M., Deshmukh V.N., Sakarkar D.M. (2012), « Natural Gums and Mucilage's in NDDS : Applications and Recent approaches ». *IJPRIF*, 4, 799–814
- [41] - Tekade B.W., Chaudhari Y.A. (2013), « Gums and Mucilages : Excipients for modified Drug Delivery System ». *J. Adv. Pharm. Edu. & Res.*, 3, 359–367

- [42] - Panta S., Malviya R., Sharma P. (2015), « Extraction and Characterization of *Boswellia Serrata* Gum as Pharmaceutical Excipient ». Polim Med. ; 45(1) : 25-30
- [43] - Sandip G.M., Sapra B.P., Savaliya B.D., Sameer A.A., Nikunj J.A. (2012), « Natural Polymer : Gums and Mucilage as Good Pharmaceutical Excipients ». PhTechMed, Vol 1 ISSN : 2278-1099
- [44] - Deogade U.M., Deshmukh V.N., Sakarkar D.M. (2012), « Natural gums and gum's in NDDS : Applications and recent approaches ». International Journal of PharmTech Research ; 4(2) : 799-814
- [45] - Tadesse W., Desalegn G., Alia R. (2007), « Natural gum and resin bearing species of Ethiopia and their potential applications », Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) Investigación Agraria : Sistemas y Recursos Forestales ; 16(3), p. 211-221
- [46] - Prameela Rani A., Varanasi. S. N. Murthy (2014), « Natural gums : it's role as excipients and diverse applications in pharmacy – a comprehensive review ». IAJPS, Volume1, Issue(6), 502-511
- [47] - Kumar P., Singh I. (2010), « Evaluation of oleo-gum resin as directly compressible tablet excipient and release retardant ». Acta Pol. Pharm. ; 67(3) : 307-313
- [48] - Kulshreshtha M.J., Kulshreshtha D.K., Rastogi R.P. (1972), « The triterpenoids – a review ». Phytochemistry ; 11 : 2369-2381
- [49] - Pani P., Rastogi R.P. (1979), « The triterpenoids - a review ». Phytochemistry ; 18(7) : 1095-1108
- [50] - Rudiger A.L., Siani A.C., Veiga Junior V.F. (2007), « The Chemistry and Pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. F. (Burseraceae) ». Pharmacognosy Reviews ; 1(1) : 93
- [51] - Thulin M., Warfa A.M. (1987), « The frankincense trees (*Boswellia* spp., Burseraceae) of northern Somalia and southern Arabia ». Kew. Bulletin ; 42(3) : 487-500
- [52] - Dupéron J. (1993), « L'encens et les *Boswellia* : Historique. Apport de l'anatomie à la systématique de trois *Boswellia* de Somalie et du Yémen ». Revue de Cytologie et de Biologie Végétales - Le Botaniste ; 16(3-4) : 185-209
- [53] - Coppens J.J.W. (1995), « Olibanum (frankincense), myrrh and opoponax resins and oils ». Flavours and Fragrances of Plant Origin, Non-Wood Forest Products, FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations ; Rome, 1
- [54] - Iserin P., Masson M., Restillini J.P. (2001), « Larousse des plantes médicinales identification, préparation, soins ». Paris, Larousse



- [55] - Boullard B. (2001), « Plantes médicinales du monde réalités et croyances ». Paris : Editions ESTEM
- [56] - Majeed M. (1996), « Boswellin-The anti-inflammatory phytonutrient ». Nutriscience Publishers, Inc.
- [57] - Atchley E.G., Cuthbert F. (1909), « A history of the use of incense in divine worship ». Longmans, Green and Co ; London
- [58] - Faure P. (1987), « Parfums et aromates de l'Antiquité ». Librairie Artheme Fayard, Hachette/Pluriel ; Evreux : 234-235
- [59] - Dawson S. (2006), « Boswellia spp. Frankincense - Plant Monograph ». Herbal Medicine ; 21p [http://www.kemanahealing.com/yahoo\\_site\\_admin/assets/docs/Boswellia\\_Monograph\\_2\\_pdf.185114926.pdf](http://www.kemanahealing.com/yahoo_site_admin/assets/docs/Boswellia_Monograph_2_pdf.185114926.pdf)
- [60] - Sailer E.R., Hoernlein R.H., Schneider N., Ammon H.P.T., Safayhi H. (1996), « Synthesis of a radio-iodinated photoaffinity analogue of the direct, non-redox, non-competitive 5 lipoxygenase inhibitor acetyl-11-keto-boswellic acid ». European journal of pharmaceutical sciences ; 4(1) : 113
- [61] - Huan M.T., Badmaev V., Ding Y., Liu Y., Xie J.G. (2000), « Anti-tumor and anticarcinogenic activities of triterpenoid,  $\beta$ -boswellic acid ». BioFactors (Oxford, England) ; 13(1-4) : 225-230
- [62] - Park Y.S., Lee J.H., Bondar J., Safayhi J.A., Golubic M. (2002), « Cytotoxic action of acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid (AKBA) on meningioma cells ». Planta medica ; 68(5) : 397-401
- [63] - Basar S., Koch A., König W.A. (2001), « A verticillane-type diterpene from *Boswellia carterii* ». Flavour and Fragrance Journal ; 5(16) : 315-318
- [64] - Büchele B., Zugmaier W., Thomas Simmet (2003), « Analysis of pentacyclic triterpenic acids from frankincense gum resins and related phytopharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. Identification of lupeolic acid, a novel pentacyclic triterpènes ». Journal of Chromatography B ; 791 : 21-30
- [65] - Sharma M.L. (1988), « Effect of salai guggal ex-*Boswellia serrata* on cellular and humoral immune responses and leucocyte migration ». Agents Actions ; 24(1-2) : 161-164
- [66] - Safayhi H. (1992), « Boswellic acids : novel, specific, nonredox inhibitors of 5- lipoxygenase ». J. Pharmacol. Exp. Ther. ; 261(3) : 1143-1146
- [67] - Bruneton J. (2009), « Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales ». Paris : Lavoisier

- [68] - Singh S., Khajuria A., Taneja S.C., Johri R.K., Singh J., Qazi G.N. (2008), « Boswellic acids : A leukotriene inhibitor also effective through topical application in inflammatory disorders ». *Phytomedicine* ; 15 : 400-407
- [69] - Safayhi H. (2000), « Concentration-dependent potentiating and inhibitory effects of *Boswellia* extracts on 5-lipoxygenase product formation in stimulated PMNL ». *Planta Med.* ; 66(2) : 110-113
- [70] - Safayhi H. (1997), « Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase ». *J. Pharmacol. Ther.* ; 281(1) : 460-463
- [71] - Kapil A., Moza N. (1992), « Anticomplementary activity of boswellic acids-an inhibitor of C3-convertase of the classical complement pathway ». *Int. J. Immunopharmacol.* ; 14(7): 1139-1143
- [72] - Kimmatkar N., Thawani V., Hingorani L., Khiyani R. (2003), « Efficacy and tolerability of *Boswellia serrata* extract in treatment of osteoarthritis of knee. A randomized double blind placebo controlled trial ». *Phytomedicine* ; 110 : 3-7
- [73] - Siddiqui M.Z. (2011), « *Boswellia Serrata*, A Potential Antiinflammatory ». *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(3) : 255-261
- [74] - Etzel R. (1996), « Special extract of *Boswellia serrata* in the treatment of rheumatoid arthritis ». *Phytomedicine* ; 3 : 91-94
- [75] - Kimmatkar N. (2003), « Efficacy and tolerability of *Boswellia serrata* extract in treatment of osteoarthritis of knee ». *Phytomedicine* ; 10(1) : 3-7
- [76] - Gupta I. (1998), « Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with bronchial asthma : results of a double-blind, placebo-controlled, 6-week clinical study ». *Eur. J. Med. Res.* ; 17, 3(11) : 511-4
- [77] - Togni S., Maramaldi G., Di Pierro F., Biondi M. (2014), « A cosmeceutical formulation based on boswellic acids for the treatment of erythematous eczema and psoriasis Clinical ». *Cosmetic and Investigational Dermatology* ; 7 : 321-327
- [78] - Gerhardt H. (2001), « Therapy of active Crohn disease with *Boswellia serrata* extract ». *Z. Gastroenterol.* ; 39 : 11-17
- [79] - Gupta I. (1997), « Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with ulcerative colitis ». *Eur. J. Med. Res. Jan.* ; 2(1) : 37-43
- [80] - Sharma S., Thawani V., Hingorani L., Shrivastava M., Bhate V.R., Khiyani R. (2004), « Pharmacokinetic study of 11-keto-b- Boswellic Acid ». *Phytomedicine* ; 11 : 255-260

- [81] - Sterk V., Büchele B., Simmet T. (2004), « Effect of food intake on the availability of boswellic acids from a herbal preparation in healthy volunteers ». *Planta Med.* ; 70(12) : 1155 - 1160
- [82] - Singh S., Khajuria A., Taneja S.C., Johri R.K., Singh J., Qazi G.N. (2008), « Boswellic acids : a leukotriene inhibitor also effective through topical application in inflammatory disorders ». *Phytomedicine* ; 15(6-7) : 400-407
- [83] - « Monograph : *Boswellia serrata*, common name : Frankincense » (1998). *Alternative Medicine Review*
- [84] - « Efficacité thérapeutique reconnue » (2004), *Nutranews Science, Nutrition, Prévention et Santé*
- [85] - Togni S., Maramaldi G., Bonetta A., Giacomelli L., Di Pierro F. (2015), « Clinical evaluation of safety and efficacy of boswellia-based cream for prevention of adjuvant radiotherapy : a randomized placebo controlled trial ». *Review for Medical and Pharmacological Sciences* ; 19 : 1338-1344
- [86] - Majeed M., Prakash L. (2007), « Boswellin® CG : Chemistry, toxicology and clinical ». Sabinsa Corporation
- [87] - Raja A.F., Ali F., Khan I.A., Shawl A.S., Arora D.S. (2011), « Acétyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid : targeting oral cavity pathogens ». *BMC Res. Notes* ; 4 : 406
- [88] - Ammon H.P., Mack T., Singh G.B., Safayhi H. (1991), « Inhibition of leukotriene B4 formation in rat peritoneal neutrophils by an ethanolic extract of the gum resin exudate of *Boswellia serrata* ». *Planta Med.* 57 ; 203–207
- [89] - Liu Y., Liu Z., Lu C., Li J., Ning Z., Song Z., Wang C., Du Z., Lu X., Zhao S., Lu A. (2014), « Comprehensive identification of active triterpenoid metabolites in frankincense using a coupling strategy ». *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* ; 15(963) : 90-8
- [90] - Shah S.A., Rathod I.S., Suhagia B.N., Pandya S.S., Parmar V.K. (2008), « A simple high-performance liquid chromatographic method for the estimation of boswellic acids from the market formulations containing *Boswellia serrata* extract ». *J. Chromatogr. Sci.* ; 46(8) : 735-8
- [91] - Shikov A., Pozharitskaya O., Ivanova S., Makarov V., Kosman V. (2010), « A comparison between HPLC and HPTLC for the separation and quantification of boswellic acids in *Boswellia serrata* extracts ». *CBS* ; n°104

- [92] - Kamal Y.T., Yusufoglu H., Alharthy S. (2014), « Use of fingerprinting and marker compounds for the identification and standardization of *Boswellia serrata* gum extract ». International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences ; 3(10) : 2290-2303
- [93] - Maheux M. (2012), « Stratégies analytiques par chromatographie liquide avec détection en spectrométrie de masse afin d'évaluer l'activité de neuf enzymes du cytochrome P450 ». Thèse ; Département de chimie, Faculté des sciences et de génie, Université Laval ; Quebec
- [94] - Sanchez, Farkas (2012), « The Latest Trend in LC Analysis: UHPLC Core–Shell Particles ». American Laboratory
- [95] - Gritti F. (2010), « Physical Properties and Structure of Fine Core-Shell Particles Used as Packing Materials for Chromatography Relationships Between Particle Characteristics and Column Performance » J. Chromatogr A ; 1217(24) : 3819-3843
- [96] - Nold M., Cramer H. (2014), « Analytical Standards of Boswellic Acids and Their Separation ». AnalytiX Volume 4
- [97] - Culioli G., Mathe C., Archier P. et Vieillescazes C. (2003), « A lupane triterpene from frankincense (*Boswellia* sp., Burseraceae) ». Phytochemistry ; 62 (4), p. 537-541
- [98] - Hovaneissian M., Archier P., Mathe C., Vieillescazes C. (2006), « Contribution de la chimie analytique a l'étude des exsudats végétaux styrax, storax et bejoin ». Comptes Rendus Chimie ; 9 (9), p. 1192-1202
- [99] - Hovaneissian M., Archier P., Mathe C., Culioli G. et Vieillescazes C. (2007), « Analytical investigation of styrax and bezoin balsams by HPLC-PAD-Fluorimetry and GC-MS ». Phytochemical Analysis ; 19(4), p. 301-310
- [100] - Hanus L.O., Rezankab T., Dembitskya V.M., Moussaieffa A. (2005), « Myrrh—Commiphora chemistry ». Biomedical Papers, vol. 149, no. 1 ; pp. 3-28
- [101] - Iserin P., Masson M., Restillini J.-P. (2001), « Larousse des plantes médicinales identification, préparation, soins ». Paris : Larousse
- [102] - « Commiphora wightii ». From Wikipedia, The free encyclopedia
- [103] - Boullard B. (2001), « Plantes médicinales du monde réalités et croyances ». Paris : Editions ESTEM
- [104] - Capasso F., Gaginella T.S., Grandolini G. (2003), « Phytotherapy : a quick reference to Herbal Medicine » Edition Springer ; 424

- [105] - Bruneton J. (1999), « Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales ». Paris : Tec&Doc ; Cachan : EM inter ; 1120
- [106] - Boullard B. (2001), « Plantes médicinales du monde réalités et croyances ». Paris : Editions ESTEM
- [107] - Tonkal A., Morsy T. (2008), « An update review on *Commiphora molmol* and related species ». <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19209761>
- [108] - Lefrançois P., Ruby F., Bertin C., Carrier D.J. (2009), « Myrrhe » [http://www.passeportsante.net/fr/Solutions/PlantesSupplements/Fiche.aspx?doc=myrrhe\\_ps](http://www.passeportsante.net/fr/Solutions/PlantesSupplements/Fiche.aspx?doc=myrrhe_ps)
- [109] - Suty A-C. (1994), « Cholestérol et phytothérapie : mythe ou réalité ? Etudes de deux plantes : le guggul et la luzerne ». Thèse
- [110] - Sarup P., Bala S., Kamboj S. (2015), « Pharmacology and Phytochemistry of Oleo-Gum Resin of *Commiphora wightii* (Guggulu) ». Hindawi Publishing corporation scientific, Volume 2015
- [111] - Shen T., Li G.-H., Wang X.-N., Lou H.-X. (2012), « The genus *Commiphora* : A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology ». *Journal of Ethnopharmacology*
- [112] - Rao R.M., Khan Z.A., Shah A.H. (2001), « Toxicity studies in mice of *Commiphora molmol* oleo-gum-resin ». *Journal of Ethnopharmacology* ; 76(2): 151–154
- [113] - Stevanovic T., Perrin D. (2009), « Chimie du bois. Presses polytechniques et universitaires romandes », Nancy, 241 p
- [114] - Cui J., Huang L., Zhao A., Lew J.-L., Yu J., Sahoo S., Meinke P.T., Royo I., Pelaez F., Wright S.D. (2003), « Guggulsterone is a farnesoid X receptor antagonist in coactivator association assays but acts to enhance transcription of bile salt export pump ». *J. Biol. Chem.* ; 278 : 10214-10220
- [115] - Urizar N.L., Liverman A.B., Dodds D.T., Silva F.V., Ordentlich P., Yan Y., Gonzalez F.J., Heyman R.A., Mangelsdorf D.J., Moore D.D. (2002), « A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for 144 FXR ». *Science* ; 296 : 1703-1706
- [116] - Yu J., Lo J.-L., Huang L., Zhao A., Metzger E., Adams A., Meinke P.T., Wright S.D., Cui J. (2002), « Lithocholic acid decreases expression of bile salt export pump through farnesoid X receptor antagonist activity ». *J. Biol. Chem.* ; 277 : 31441-31447
- [117] - Owsley E., Chiang J.Y.L. (2003), « Guggulsterone antagonizes farnesoid X receptor induction of bile salt export pump but activates pregnane X receptor to inhibit cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* ; 304 : 191-195

[118] - Burris T.P., Montrose C., Houck K.A., Osborne H.E., Bocchinfuso W.P., Yaden B.C., Cheng C.C., Zink R.W., Barr R.J., Hepler C.D. (2005), « The hypolipidemic natural product guggulsterone is a promiscuous steroid receptor ligand ». *Mol. Pharmacol.* ; 67 : 948-954

[119] - [www.phytomania.com](http://www.phytomania.com)

[120] - Szapary P.O., Wolfe M.L., Bloedon L.T. (2003), « Guggulipid for the treatment of hypercholesterolemia : a randomized controlled trial ». *Journal of the American Medical Association*, vol. 290, no. 6, pp. 765-772

[121] - ANSM - Rapport d'expertise - Juillet 2012

[122] - Botros S., William S., Ebeid F., Cioli D., Katz N., Day T.A., Bennett J.L., (2004), « Lack of evidence for an antischistosomal activity of myrrh in experimental animals ». *Am J Trop Med Hyg.* ; 71(2) : 206-10

[123] - Ghaith A.J. , Adeeb A., Shallal M.H. , Hayder B.S., Basim Sh., (2015), « The Acute Toxicity of *Commiphora molmol* oleo-gum-resin Methanol Extract ». *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* ; 33(1), 21 : 109-114

[124] - « The Ayurvedic Pharmacopoeia of India » (2001), Department of Indian Systems of Medicine and Homeopathy, Ministry of Health and Family Welfare, Government of India, New Delhi, India, 1<sup>st</sup> edition

[125] - Masten S.A. (2005), « Gum Guggul and Some of Its Steroidal Constituents : Review of Toxicological Literature ». US Department of Health and Human Services, National Toxicology Program (NTP), National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), National Institutes of Health, Durham, NC, USA, vol. 2

[126] - Satyavati G.V. (1988), « Gum guggul (*Commiphora mukul*)-the success story of an ancient insight leading to a modern discovery ». *Indian Journal of Medical Research* ; 87(4) : 327-335

[127] - Nohr L.A., Rasmussen L.B., Straand J. (2009), « Resin from the mukul myrrh tree, guggul, can it be used for treating hypercholesterolemia ? A randomized, controlled study ». *Complementary Therapies in Medicine* ; 17(1) : 16-22

[128] - Szapary P.O., Wolfe M.L., Bloedon L.T. (2003), « Guggulipid for the treatment of hypercholesterolemia : a randomized controlled trial ». *Journal of the American Medical Association* ; 290(6) : 765-772

- [129] - Capasso F., Gaginella T.S., Grandolini G. (2003), « Phytotherapy : a quick reference to Herbal Medicine ». Edition Springer ; 424
- [130] - Kulhari A., Sheorayan A., Chaudhury A., Sarkar S.K., Kalia R. (2015), « Quantitative determination of guggulsterone in existing natural populations of *Commiphora wightii* (Arn.) Bhandari for identification of germplasm having higher guggulsterone content ». *Physiology and Molecular Biology of Plants* ; 21(1) : 71-81
- [131] - Mesrob B., Nesbitt C., Misra R., Pandey R.C. (1998), « High-performance liquid chromatographic method for fingerprinting and quantitative determination of E- and Z-guggulsterones in *Commiphora mukul* resin and its products ». *Journal of Chromatography B* ; 720(1-2) : 189-196
- [132] - Musharraf S.G., Gulzar U., Rahman A.U. (2011), « Effective separation and analysis of E- and Z-guggulsterones in *Commiphora mukul* resin, Guggul lipid and their pharmaceutical product by high performance thin-layer chromatography ». *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* ; 56(2) : 240-245
- [133] - Monographie de la myrrhe de la Pharmacopée Européenne (2017), version 9.2

## **Annexes**



## Annexe 1 : Lignes Directrices du 19 mars 2015

### Lignes directrices du 19 mars 2015 relatives à l'évaluation formalisée du risque visant à déterminer les bonnes pratiques de fabrication appropriées pour les excipients utilisés dans les médicaments à usage humain

#### Introduction

Les présentes lignes directrices sont fondées sur l'article 47, cinquième alinéa, de la directive 2001/83/CE <sup>1</sup>.

Conformément à l'article 46, point f), deuxième alinéa, de la directive 2001/83/CE, le titulaire de l'autorisation de fabrication est tenu de veiller à ce que les excipients soient appropriés pour une utilisation dans des médicaments en déterminant quelles sont les bonnes pratiques de fabrication (BPF) appropriées. La détermination des BPF appropriées pour les excipients utilisés dans les médicaments à usage humain est effectuée sur la base d'une évaluation formalisée du risque, conformément aux présentes lignes directrices. Cette évaluation du risque tient compte des exigences imposées par d'autres systèmes qualité appropriés, ainsi que de la source et de l'utilisation prévue des excipients, et de précédents cas de défauts qualité. Le titulaire de l'autorisation de fabrication veille à ce que les BPF appropriées ainsi déterminées soient appliquées. Il documente les mesures prises.

La procédure d'évaluation/de gestion du risque lié à l'excipient devrait être intégrée dans le système qualité pharmaceutique du titulaire de l'autorisation de fabrication.

Le titulaire de l'autorisation de fabrication devrait conserver sur place la documentation relative à l'évaluation/la gestion du risque aux fins de la détermination des BPF appropriées concernant les excipients, pour permettre la vérification par les inspecteurs BPF. Il convient d'envisager l'échange d'informations pertinentes issues de l'évaluation du risque avec le fabricant de l'excipient dans un souci d'amélioration continue.

Les excipients de médicaments à usage humain autorisés devraient faire l'objet d'une évaluation du risque telle que définie dans les présentes lignes directrices avant le 21 mars 2016.

#### CHAPITRE PREMIER — CHAMP D'APPLICATION

- 1.1. Les présentes lignes directrices s'appliquent à l'évaluation du risque visant à déterminer les BPF appropriées pour les excipients de médicaments à usage humain. Conformément à l'article 1<sup>er</sup>, point 3) *ter*, de la directive 2001/83/CE, un excipient est tout composant d'un médicament, autre qu'une substance active et les matériaux d'emballage.
- 1.2. Les présentes lignes directrices ne concernent pas les substances ajoutées pour stabiliser les substances actives qui ne peuvent pas exister indépendamment.

#### CHAPITRE 2 — DÉTERMINATION DES BPF APPROPRIÉES SELON LE TYPE D'EXCIPIENT ET L'UTILISATION PRÉVUE

- 2.1. Dans le volume 4 d'EudraLex, «Guidelines for Good Manufacturing Practice, Medicinal Products for Human and Veterinary Use» (lignes directrices établissant les bonnes pratiques de fabrication, médicaments à usage humain et à usage vétérinaire), partie III, «GMP related documents» (documents liés aux BPF), «ICH guideline Q9 on Quality Risk Management (ICH Q9)» (ligne directrice ICH Q9 relative à la gestion du risque de qualité), on trouve des principes et des exemples d'outils de gestion du risque qualité qui peuvent être appliqués à différents aspects qualité pharmaceutique, y compris en ce qui concerne les excipients.
- 2.2. Ces principes de gestion du risque qualité devraient être utilisés pour évaluer les risques liés à la qualité, à la sécurité et à la fonction de chaque excipient et pour classer l'excipient

(1) <sup>1</sup> Directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain (JO L 311 du 28.11.2001, p. 67).

- en question, par exemple, selon qu'il présente un risque faible, moyen ou élevé. Il convient d'utiliser à cet effet des outils de gestion du risque qualité, tels que ceux qui figurent dans EudraLex, volume 4, partie III, ICH Q9 (tels que le système HACCP d'analyse des risques et de maîtrise des points critiques).
- 2.3. Pour chaque excipient de chaque fabricant auquel il a recours, le titulaire de l'autorisation de fabrication devrait préciser les risques pour la qualité, la sécurité et la fonction de chaque excipient depuis sa source — à savoir, animale, minérale, végétale, synthétique, etc. — jusqu'à son incorporation dans le produit fini, sous sa forme pharmaceutique. Les facteurs à prendre en considération devraient notamment inclure (non limitatif) :
- i) l'encéphalopathie spongiforme transmissible;
  - ii) la possibilité de contamination virale;
  - iii) La possibilité de contamination microbiologique ou par des endotoxines/pyrogènes ;
  - iv) la possibilité, en général, de présence de toute impureté provenant des matières premières de départ, notamment des aflatoxines ou des pesticides, ou produite dans le cadre du procédé et transférée, par exemple les solvants résiduels et les catalyseurs;
  - v) l'assurance de stérilité des excipients présentés comme stériles;
  - vi) la possibilité que l'excipient contienne des impuretés provenant d'autres procédés, en l'absence d'équipement et/ou d'installations dédiées;
  - vii) le contrôle de l'environnement et les conditions de transport et de stockage, y compris, s'il y a lieu, la gestion de la chaîne du froid;
  - viii) la complexité de la chaîne d'approvisionnement;
  - ix) la stabilité de l'excipient;
  - x) la preuve de l'intégrité du conditionnement.
- 2.4. En outre, en ce qui concerne l'utilisation et la fonction de chaque excipient, le titulaire de l'autorisation de fabrication devrait tenir compte des éléments suivants:
- i) la forme pharmaceutique et l'utilisation du médicament contenant l'excipient;
  - ii) la fonction de l'excipient dans la formule, par exemple, lubrifiant dans un comprimé ou agent conservateur dans une formule liquide, etc.;
  - iii) la proportion de l'excipient dans la composition du médicament;
  - iv) la consommation journalière de l'excipient par le patient;
  - v) les défauts de qualité ou les altérations frauduleuses connus concernant l'excipient, aussi bien à un niveau mondial qu'à celui d'une entreprise locale;
  - vi) le fait que l'excipient soit un mélange ou non;
  - vii) les effets connus ou potentiels sur les caractéristiques essentielles pour la qualité du médicament;
  - viii) d'autres facteurs dont la pertinence pour garantir la sécurité des patients est identifiée ou avérée.
- 2.5. Après avoir défini et documenté le profil de risque de l'excipient, le titulaire de l'autorisation de fabrication devrait définir et documenter les éléments figurant dans EudraLex, volume 4, qui doivent selon lui être en place afin de contrôler et de maintenir la qualité de l'excipient, par exemple l'annexe 1 et/ou l'annexe 2 ou la partie II: «Basic Requirements for Active Substances used as Starting Materials» (exigences de base pour les substances actives utilisées en tant que matières premières).
- 2.6. Ces éléments varient en fonction de la source, de la chaîne d'approvisionnement et de l'utilisation prévue de l'excipient, mais le titulaire de l'autorisation de fabrication devrait au minimum tenir compte des principes BPF suivants:

- i) l'établissement et la mise en application d'un système de qualité pharmaceutique efficace;
- ii) un personnel compétent et dûment qualifié en nombre suffisant;
- iii) des descriptions de fonction détaillées pour les dirigeants et le personnel encadrant responsable des activités liées à la fabrication et à la qualité;
- iv) des programmes de formation pour tout le personnel concerné par les activités de fabrication et de qualité;
- v) des programmes de formation en matière de santé, d'hygiène et d'habillement identifiés comme nécessaire au regard des activités prévues;
- vi) la mise à disposition et l'entretien de locaux et d'équipements adaptés aux opérations prévues;
- vii) des systèmes documentaires couvrant tous les procédés et spécifications pour les différentes opérations de fabrication et de qualité;
- viii) des systèmes de codage et d'identification des matières premières de départ, des produits intermédiaires et des excipients pour garantir une traçabilité complète;
- ix) un programme de qualification des fournisseurs;
- x) un système de contrôle qualité de l'excipient et un responsable, indépendant de la production, pour la libération des lots;
- xi) la conservation d'enregistrements concernant les matières entrantes et les excipients et d'échantillons d'excipients pendant les durées prévues dans EudraLex, volume 4, partie II;
- xii) des systèmes garantissant que toute activité sous-traitée fait l'objet d'un contrat écrit;
- xiii) l'existence d'un système efficace permettant l'examen des réclamations et le rappel des excipients;
- xiv) un système de gestion des modifications et des déviations;
- xv) un programme d'auto-inspection;
- xvi) le contrôle de l'environnement et des conditions de stockage.

### CHAPITRE 3 — DÉTERMINATION DU PROFIL DE RISQUE DU FABRICANT DE L'EXCIPIENT

- 3.1. Après la détermination des BPF appropriées, il y a lieu d'analyser les écarts entre les BPF requises, d'une part, et les activités et les capacités du fabricant de l'excipient, d'autre part.
- 3.2. Les données/éléments à l'appui de cette analyse des écarts devraient provenir d'un audit ou d'informations reçues du fabricant de l'excipient.
- 3.3. Il y a lieu de prendre en considération la certification des systèmes qualité et/ou des BPF obtenue par le fabricant de l'excipient ainsi que les normes en fonction desquelles elle a été octroyée, étant donné que cette certification peut satisfaire aux conditions requises.
- 3.4. Tout écart observé entre les BPF requises et les activités et capacités du fabricant de l'excipient devrait être documenté. En outre, le titulaire de l'autorisation de fabrication devrait procéder à une nouvelle évaluation du risque afin de déterminer le profil de risque (faible, moyen ou élevé, par exemple) du fabricant de l'excipient. Il convient de suivre, à cette fin, les indications figurant dans EudraLex, volume 4, partie III, ICH Q9. Les outils de gestion du risque de la qualité tels que ceux qui y sont énumérés, notamment le système HACCP, devraient être utilisés.
- 3.5. Le titulaire de l'autorisation de fabrication devrait disposer de plusieurs stratégies, allant de l'acceptation au refus en passant par le contrôle, pour les différents profils de risque et

mettre en place, sur cette base, une stratégie de contrôle telle que l'audit, l'obtention de documents et la réalisation d'essais.

#### **CHAPITRE 4 — CONFIRMATION DE L'APPLICATION DE BPF APPROPRIÉES**

4.1. Une fois que les BPF appropriées concernant l'excipient et le profil de risque du fabricant de l'excipient ont été définis, une revue continue des risques devrait être réalisée sur la base de critères tels que:

- i) le nombre de défauts par rapport au nombre de lots d'excipient reçus;
- ii) le type et la gravité de ces défauts;
- iii) le suivi et l'analyse tendancielle de la qualité de l'excipient;
- iv) la perte d'une certification du système de qualité et/ou des BPF par le fabricant de l'excipient;
- v) l'observation des tendances des attributs qualité du médicament, en fonction de la nature et du rôle de l'excipient;
- vi) les changements intervenus chez le fabricant de l'excipient en matière d'organisation, de procédures ou au niveau technique/du procédé;
- vii) un audit ou un nouvel audit du fabricant de l'excipient;
- viii) des questionnaires.

Sur la base des résultats de l'analyse des risques, la stratégie de contrôle établie devrait être réexaminée et révisée si nécessaire.

## Annexe 2 : Monographie de l'encens (Pharmacopée Européenne v9.0)

Encens indien

PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 9.0

01/2013:2310

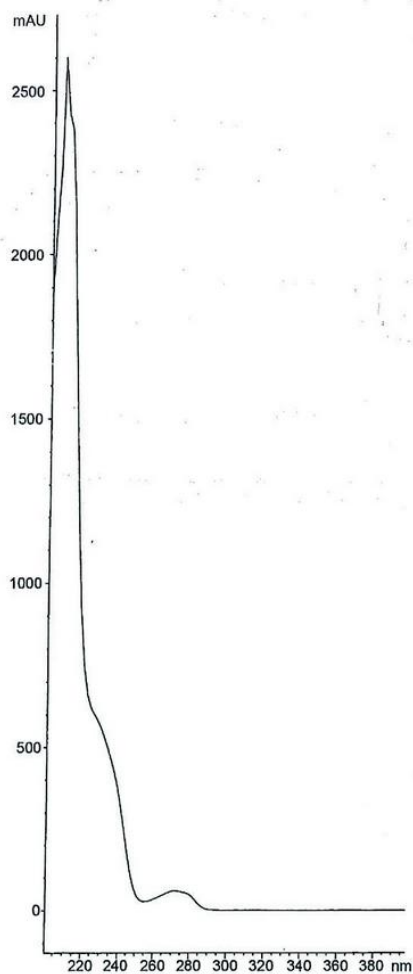


Figure 1419.-2. - Spectre UV de l'éléuthéroside E pour le dosage de l'éléuthérocoque

Conformité du système : solution témoin (d) :

- résolution : au minimum 15 entre les pics dus à l'acide caféique et à l'acide férulique.

Calculez la teneur totale en éléuthéroside B et en éléuthéroside E à l'aide de l'expression :

$$\frac{(A_B \times C \times 0,73 \times 2)}{(A_R \times m)} + \frac{(A_E \times C \times 1,90 \times 2)}{(A_R \times m)}$$

$A_B$  = surface du pic dû à l'éléuthéroside B dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_E$  = surface du pic dû à l'éléuthéroside E dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,

$A_R$  = surface du pic dû à l'acide férulique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c),

$C$  = concentration de l'acide férulique dans la solution témoin (c), en microgrammes par millilitre,

$m$  = masse de la prise d'essai, en milligrammes.



## ENCENS INDIEN

## Olibanum indicum

## DÉFINITION

Exsudat résineux, séché à l'air, obtenu par incision du tronc ou des rameaux de *Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr.

## Teneur :

- acide 11-céto- $\beta$ -boswellique ( $C_{30}H_{46}O_4$  ;  $M_r$  470,7) : au minimum 1,0 pour cent (drogue desséchée);
- acide acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique ( $C_{32}H_{48}O_5$  ;  $M_r$  512,7) : au minimum 1,0 pour cent (drogue desséchée).

## IDENTIFICATION

- A. L'encens indien est constitué de grains ou fragments translucides, de forme arrondie ou irrégulière et de taille variable pouvant aller jusqu'à 3 cm. Ils sont jaunâtres ou brun-rouge et leur surface est couverte d'une poussière grise. La cassure est mate ou légèrement brillante.

- B. Chromatographie sur couche mince (2.2.27).

**Solution à examiner.** A 1,0 g d'encens indien pulvérisé (355) (2.9.12), ajoutez 90 mL de méthanol R, puis traitez aux ultrasons pendant 10 min en agitant énergiquement à 3 ou 4 reprises. Complétez à 100 mL avec du méthanol R, puis centrifugez. Utilisez le surnageant limpide.

**Solution témoin.** Dissolvez 2 mg d'acide 11-céto- $\beta$ -boswellique R et 2 mg d'acide acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique R dans 20 mL de méthanol R.

**Plaque :** plaque au gel de silice  $F_{254}$  pour CCM R (5-40  $\mu$ m) [ou plaque au gel de silice  $F_{254}$  pour CCM R (2-10  $\mu$ m)].

**Phase mobile :** acide formique anhydre R, heptane R, acétate d'éthyle R, toluène R (3:10:20:80 V/V/V/V).

**Dépôt :** 10  $\mu$ L [ou 3  $\mu$ L] en bandes.

**Développement :** sur un parcours de 8 cm [ou 6 cm].

**Séchage :** à l'air.

**Détection :** examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

**Résultats :** voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Les bandes dues à l'acide acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique et à l'acide 11-céto- $\beta$ -boswellique, obtenus avec la solution à examiner, sont d'intensité approximativement équivalentes. Par ailleurs, d'autres faibles bandes d'atténuation peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

| Haut de la plaque  |  |
|--|--|
| Acide acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique : une bande d'atténuation de fluorescence | Une bande d'atténuation de fluorescence (acide acétyl-11-céto- $\beta$ -boswellique) |
| Acide 11-céto- $\beta$ -boswellique : une bande d'atténuation de fluorescence        | Une bande d'atténuation de fluorescence (acide 11-céto- $\beta$ -boswellique)        |
| Solution témoin  | Solution à examiner  |

## ESSAI

**Perte à la dessiccation** (2.2.32) : au maximum 8,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 3 h sur 1,000 g d'encens indien pulvérisé (355) (2.9.12).

**Cendres totales** (2.4.16) : au maximum 10,0 pour cent.

## DOSAGE

Chromatographie liquide (2.2.29).

**Solution à examiner.** A 1,0 g d'encens indien pulvérisé (355) (2.9.12), ajoutez 90 mL de méthanol R, puis traitez aux ultrasons pendant 10 min en agitant énergiquement à 3 ou 4 reprises. Complétez à 100,0 mL avec du méthanol R, puis centrifugez pendant 5 min. Prélevez 1,0 mL du surnageant limpide et complétez à 10,0 mL avec un mélange de 16 volumes de phase mobile A et de 84 volumes de phase mobile B.

**Solution témoin.** Dissolvez 1,0 mg d'acide 11-céto-β-boswellique R et 1,0 mg d'acide acétyl-11-céto-β-boswellique R dans 20,0 mL de méthanol R. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec un mélange de 16 volumes de phase mobile A et de 84 volumes de phase mobile B.

Colonne :

- dimensions :  $l = 0,25$  m,  $\varnothing = 4,6$  mm,
- phase stationnaire : gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R (5 μm).

Phase mobile :

- phase mobile A : acide phosphorique R, eau R (0,1:99,9 V/V),
- phase mobile B : acide phosphorique R, acétonitrile R (0,1:99,9 V/V),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent V/V) | Phase mobile B (pour cent V/V) |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 0 - 12,5         | 16 → 6                         | 84 → 94                        |
| 12,5 - 13,5      | 6 → 0                          | 94 → 100                       |
| 13,5 - 28        | 0                              | 100                            |

Débit : 1,0 mL/min.

Détection : spectrophotomètre à 250 nm.

Injection : 20 μL.

Temps de rétention : acide 11-céto-β-boswellique = environ 8 min ; acide acétyl-11-céto-β-boswellique = environ 12 min.

Conformité du système : solution témoin :

- résolution : au minimum 6,0 entre les pics dus à l'acide 11-céto-β-boswellique et à l'acide acétyl-11-céto-β-boswellique.

Calculez la teneur pour cent en acide 11-céto-β-boswellique à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_1 \times m_1 \times 5 \times p_1}{A_2 \times m}$$

- $A_1$  = surface du pic dû à l'acide 11-céto-β-boswellique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,
- $A_2$  = surface du pic dû à l'acide 11-céto-β-boswellique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,
- $m$  = masse de la prise d'essai, en grammes,
- $m_1$  = masse d'acide 11-céto-β-boswellique R dans la solution témoin, en grammes,
- $p_1$  = teneur pour cent en acide 11-céto-β-boswellique de l'acide 11-céto-β-boswellique R.

Calculez la teneur pour cent en acide acétyl-11-céto-β-boswellique à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A_3 \times m_2 \times 5 \times p_2}{A_4 \times m}$$

- $A_3$  = surface du pic dû à l'acide acétyl-11-céto-β-boswellique dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner,
- $A_4$  = surface du pic dû à l'acide acétyl-11-céto-β-boswellique dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin,
- $m$  = masse de la prise d'essai, en grammes,
- $m_2$  = masse d'acide acétyl-11-céto-β-boswellique R dans la solution témoin, en grammes,
- $p_2$  = teneur pour cent en acide acétyl-11-céto-β-boswellique de l'acide acétyl-11-céto-β-boswellique R.



07/2016:2451

## ÉPHÉDRA (PARTIE AÉRIENNE D')

## Ephedrae herba

## DÉFINITION

Partie aérienne stérile, entière ou fragmentée, séchée d'*Ephedra sinica* Stapf, d'*Ephedra intermedia* Schrenk et C.A.Mey. ou d'*Ephedra equisetina* Bunge ou de leur mélange. Teneur : au minimum 1,0 pour cent d'éphédrine (C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO ; M<sub>r</sub> 165,2) (drogue desséchée).

## IDENTIFICATION

- A. Les tiges sont vert pâle, vert-jaune ou brun clair, grêles, cylindriques, ramifiées ou non, et peuvent atteindre 30 cm de long (drogue entière) ou présenter des fragments allant jusqu'à 5 cm de long (drogue fragmentée) et ont un diamètre de 1-3 mm ; elles sont striées longitudinalement et leur surface est légèrement rugueuse, avec des entre-nœuds de 1-6 cm de long. Les feuilles, opposées et décussées, sont réduites à des écailles entourant la tige au niveau des nœuds, avec un très petit limbe de 1,5-4 mm de long composé de 2 (rarement 3) lobes en triangle aigu, à apex blanc-gris et à base tubulaire brun-rouge ou brun-noir (le limbe peut être plus petit et présenter un apex plus arrondi). La cassure est fibreuse et présente une moelle brun-rouge clair ou foncé.
- B. Examen microscopique (2.8.23). La poudre est jaune-vert, brun-vert ou brun clair. Examinez au microscope en utilisant de la solution d'hydrate de chloral R. La poudre présente les éléments suivants (figure 2451.-1) : des fragments d'épiderme (vue de face [A, F]) composé de cellules allongées à paroi plus ou moins épaissie [Aa] et de stomates en partie recouverts par une cuticule [Ab] parfois ponctuée et dont seule l'ostiole est visible ; des stomates anomocytiques nettement visibles sous la cuticule (vue de face [F]) présentant des cellules de garde à paroi épaissie à l'extrémité [Fa] ; des fragments de tige (section transversale [D]) présentant l'épiderme recouvert d'une forte cuticule [Da] à épaississements papilleux [Db] au-dessus de certaines cellules, et comportant des cellules épidermiques à paroi épaissie [Dc] et des stomates enfoncés [Dd] accompagnés parfois de parenchyme cortical composé de cellules palissadiques contenant de petits prismes d'oxalate de calcium [Df] et des amas de fibres [De] ; des fibres, isolées ou en amas [B], longues, à paroi épaissie et à lumière réduite ; des fragments de tissu vasculaire [C, E] comportant des trachéides ponctuées [Ca, Ea] et des vaisseaux annelés, spirales [Cb] ou, rarement, réticulés ; des amas de cellules parenchymateuses plus ou moins rectangulaires provenant de la moelle, à paroi légèrement épaissie et dont le contenu est souvent orange ou brun [Eb] ; de nombreux fragments du contenu orange ou brun des cellules parenchymateuses [G] ; de nombreux petits