



HAL
open science

L' HPTLC-Bioautographie dans la recherche de composés actifs dans les extraits végétaux

Valentin Hilaire

► **To cite this version:**

Valentin Hilaire. L' HPTLC-Bioautographie dans la recherche de composés actifs dans les extraits végétaux. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03553830

HAL Id: dumas-03553830

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03553830v1>

Submitted on 3 Feb 2022

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

THESE

PRESENTEE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA
FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le 21 Juin 2021

PAR

M. HILAIRE Valentin

Né le 03/05/1988 à Avignon

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE :

**L'HPTLC - Bioautographie dans la recherche de composés
actifs dans les extraits végétaux**

JURY :

Président : Pr. Evelyne Ollivier

Membres : Dr. Béatrice Baghdikian

Dr. Zahiya Mosbah

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES
PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

M. Jérémy MAGALON
Mme Carole SIANI

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Anne-Claire DUCHEZ
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Mélanie VELIER
----------------------------	--------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC
---	---------------

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE PHARMACIE CLINIQUE	Mme Anaïs MOYON M. Florian CORREARD
---	--

ATER.

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir pris le temps d'examiner ce travail de thèse. Merci à Mme Béatrice Baghdikian d'avoir accepté de l'encadrer.

Un merci tout particulier à M. Francis Hadji-Minaglou, directeur de la société BotaniCert pour la confiance qu'il a su m'accorder durant ces trois années de thèse. Un immense merci au Pr. Xavier Fernandez ainsi qu'au Dr. Anne Landreau pour m'avoir suivi et aiguillé, pour leurs conseils précieux et avisés. Un énorme merci aussi à M. Grégory Michel pour son accueil dans son équipe de recherche, pour sa patience et sa gentillesse ainsi qu'au Pr. Gertrud Morlock pour son accueil et la transmission de savoir.

Merci :

A Maxime pour le bonheur et tout le soutien qu'il m'apporte chaque jour.

A Maman et Papa, pour le soutien sans faille qu'ils ont su m'apporter depuis le début de mes études il y a bien longtemps maintenant. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours poussé dans la bonne direction.

A Vincent, Lucile et mes adorables neveux Jean et Augustin que j'aime tant. Merci d'illuminer ma vie. Coeur sur vous !!!

A toute ma famille que j'aime fort !

A Latouffe le sang de la veine, Merci d'avoir toujours été à mes côtés depuis le début de mes études. A tous les bons moments qu'on a passés ensemble. A toutes les galères aussi qu'on a su traverser en se serrant les coudes. Wallah je te kiffe forever.

A Camille, Melissa et Popop mes divas du morning, de l'afternoon et de la night. J'ai tellement aimé travailler avec vous. Cette thèse n'aurait sans doute pas eu le même goût sans vous. Merci du soutien, des fessées que j'avais sans aucun doute méritées, de votre amitié sincère tout simplement. J'ai tellement hâte qu'on se revoie.

Aux copains Matthew, Sophie, Léa, Luc, Juliette, Mathieu, Steph, Vivi, Xavier, Jean-Lu, Hana, Flo, Rémi, Kudo, Lisa et Théo pour tous les bons moments passés et à venir autour d'une bonne caïpi ou d'un bon Long Island ahahah. Merci surtout de la place que vous avez su me faire auprès de vous dans ma nouvelle vie niçoise.

A tout le labo du 3^e de l'ICN avec mention spéciale à la FFP, pour cette bonne ambiance qui me faisait revenir chaque jour avec plaisir au labo ¹. Gros bisous les nases vous allez me manquer.

Aux copains de Grasse, Barnes, Alexia, Marissa et Chuck pour ces moments d'amitié et surtout parce que je n'avais pas ton temps Quentin.

Aux copains d'Avignon, Hélène, Victoire, Arthur d'être toujours à mes côtés après ces si nombreuses années.

A ma Roule, même si on se voit beaucoup moins depuis que tu es partie dans l'ouest, sache que tu garderas toujours une place de choix dans mon cœur. Love you.

A ma Lottgen la maman pour ta franchise, ton amitié et tous les rires et moments de partage qu'on a vécu et qu'on vivra.

A Melanight la meilleure stagiaire que la terre ait porté. Qu'est ce qu'on a rigolé tous les deux. J'espère qu'on se reverra vite.

A tout le laboratoire de BotaniCert, Loïc, Julien, Jojo l'asticot et Melissa pour tout ce savoir partagé et cette entraide toujours dans la bonne humeur.

¹ Merci à Camille Dubois de la maison serpentard.

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

Table des matières

Remerciements	1
Liste des figures	3
Liste des tableaux	5
Introduction Générale.....	6
1 L'HPTLC	7
1.1 La chromatographie planaire : Principes généraux.....	7
1.1.1 Historique de la méthode.....	7
1.1.2 TLC : principe de la méthode [3]	8
1.1.3 La phase stationnaire	10
1.1.3.1 Le support	10
1.1.3.2 Epaisseur de la couche d'adsorbant	11
1.1.3.3 Taille des particules de la phase stationnaire.....	11
1.1.3.4 Surface spécifique.....	12
1.1.3.5 Matériaux de la couche d'adsorbant	12
1.1.4 La phase mobile.....	15
1.1.5 Etapes de l'analyse	18
1.1.5.1 Préparation d'échantillon.....	18
1.1.5.2 Dépôt de l'échantillon sur la plaque	18
1.1.5.3 Le développement chromatographique.....	19
1.1.5.4 Les autres modes de développement : les développements multiples	23
1.1.5.5 La visualisation	25
1.1.5.6 La dérivation	25
1.1.5.7 La densitométrie.....	29
1.2 Conclusion	31

2	La Bioautographie	32
2.1	Introduction.....	32
2.2	Techniques de criblage de bioactivités	32
2.3	Historique de la bioautographie	36
2.4	Les différents types de bioautographie	36
2.4.1	La bioautographie directe (Figure 23).....	36
2.4.2	La bioautographie de contact (Figure 25).....	38
2.4.3	La bioautographie par immersion (Figure 27).....	40
3	Applications de la bioautographie.....	42
3.1	Les tests de sensibilité aux antibactériens.....	42
3.1.1	Les tests antibactériens au sel de tétrazolium.....	42
3.1.2	Les tests antibactériens par luminescence	43
3.1.2.1	La bactérie <i>Aliivibrio fischeri</i> [61]	43
3.1.2.2	Mécanismes de bioluminescence	44
3.2	Les tests antifongiques.....	45
3.3	Les tests antioxydants	46
3.4	Les tests enzymatiques.....	47
3.4.1	Le test à l'acétylcholinestérase (AChE)	47
3.4.1.1	La maladie d'Alzheimer [65]:.....	47
3.4.1.2	Les traitements : les anticholinestérasiques	48
3.4.1.3	Test bioautographique à l'acétylcholinestérase	50
3.4.2	Le test à la lipase pancréatique	52
3.4.2.1	La lipase pancréatique : biochimie et inhibiteurs	52
3.4.2.2	L'obésité :	52
3.4.2.3	Test bioautographique à la lipase pancréatique	53
3.4.3	Test à l' α -glucosidase	55
3.4.3.1	Le diabète de type 2 (non-insulino dépendant).....	55

3.4.3.2	Les traitements du diabète de type 2.....	56
3.4.3.3	Test bioautographique à l' α -glucosidase	57
3.4.4	Test à la Tyrosinase	58
3.4.4.1	L'enzyme tyrosinase [71]	58
3.4.4.2	Test bioautographique à la tyrosinase.....	58
4	Purification et caractérisation des composés actifs	60
4.1	Récupération directe	60
4.2	L'HPTLC couplée au spectromètre de masse.....	61
4.2.1	Les techniques AMS (Ambient Mass Spectrometry).....	61
4.2.2	Couplage HPTLC-MS via une interface	62
	Conclusion générale	63
	Bibliographie.....	65

Liste des figures

Figure 1 :	Calcul du Rf.....	9
Figure 2 :	Calcul de la résolution entre deux pics	10
Figure 3 :	CAMAG SmartCut	11
Figure 4 :	Distribution des tailles de particules dans le gel de silice	12
Figure 5 :	Polymère de cellulose	13
Figure 6:	Structure moléculaire du gel de silice.....	13
Figure 7 :	La sélectivité des solvants	16
Figure 8 :	Triangle des sélectivités de Snyder.....	16
Figure 9 :	Les premières étapes du modèle PRISMA	17
Figure 10 :	Application par contact à gauche et application en spray à droite	19
Figure 11 :	Différents modes de développement	21
Figure 12 :	Différents types de cuves de développement vertical : cuve à fond plat et cuve à double fond.....	22
Figure 13 :	CAMAG ADC2	22

Figure 14: Chambre de développement horizontal CAMAG	23
Figure 15 : CAMAG AMD2	24
Figure 16 : Développement 2D	24
Figure 17: Plaque prise en photo après dérivation sous lumière visible, 254 nm et 366 nm ...	25
Figure 18 : CAMAG TLC Sprayer	26
Figure 19 : Cheminement de spray	27
Figure 20 : CAMAG Derivatizer	27
Figure 21: CAMAG Chromatogram immersion device 3	28
Figure 22 : Système optique du densitomètre tiré du CAMAG TLC Scanner4.	30
Figure 23 : Bioautographie directe : principes généraux	37
Figure 24: Bioautogramme direct : Plaque visualisée sous UV 366nm sans révélation, Bioautogramme du test à <i>Bacillus subtilis</i>	38
Figure 25 : Bioautographie de contact : principes généraux	39
Figure 26 : Bioautographie de contact :	39
Figure 27 : Bioautographie d'immersion	40
Figure 28 : Bioautogramme par immersion dans de l'agarensemencé de ' <i>Staphylococcus aureus</i> '	41
Figure 29 : Réduction du MTT	42
Figure 30 : Bioautogramme du test au ' <i>Bacillus subtilis</i> ' utilisant la coloration au MTT : à gauche, la plaque révélée à l'anisaldéhyde/acide sulfurique ; à droite, le bioautogramme	43
Figure 31 : ' <i>Aliivibrio fischeri</i> ' dans le photophore d' <i>Euprymna scolopes</i> '	44
Figure 32 : Réaction de bioluminescence	44
Figure 33 : Bioautogramme du test bioluminescent à <i>Aliivibrio fischeri</i> : à gauche, la plaque révélée à l'anisaldéhyde/acide sulfurique ; à droite, le bioautogramme	45
Figure 34 : Bioautogramme d'un test antifongique par bioautographie par immersion d'extraits de ' <i>Swartzia madagascariensis</i> ' Desv. A gauche : plaque révélée au réactif de Godin (vanilline / acide perchlorique) et à droite bioautogramme à ' <i>Candida albicans</i> '	46
Figure 35 : Réduction du DPPH	46
Figure 36: L'ACH dans la jonction synaptique	48
Figure 37 : tacrine	49
Figure 38 : donepezil	49
Figure 39 : physostigmine	49
Figure 40 : rivastigmine	50

Figure 41 : galantamine.....	50
Figure 42 : huperzine.....	50
Figure 43 : Réaction entrant en jeu lors du test bioautographique à l'acétylcholinestérase.....	51
Figure 44 : Bioautogramme du test à l'acétylcholinestérase de la galantamine.....	52
Figure 45 : Action de la lipase pancréatique.....	52
Figure 46 : orlistat.....	53
Figure 47 : Réaction entrant en jeu lors du test bioautographique à la lipase pancréatique....	54
Figure 48 : Bioautogramme du test à la lipase pancréatique sur l'orlistat. Plusieurs concentrations d'orlistat ont été déposées.....	55
Figure 49 : metformine.....	56
Figure 50 : Réaction entrant en jeu lors du test bioautographique à l' α -glucosidase.....	57
Figure 51 : Bioautogramme de différents extraits de ' <i>Justicia secunda</i> ' Vahl ainsi qu'une fraction aqueuse à α -glucosidase et révélés à 366 nm développés avec une phase mobile CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (60/40/10 ; v/v/v).....	58
Figure 52 : Contrôle positif du test à la tyrosinase avec l'acide kojique.....	59
Figure 53 : Exemple de plaque de silice comportant 15 dépôts du même extrait à 10 μ l/dépôt et développée dont la silice ainsi que les molécules actives ont été récupérées à deux endroits.	60
Figure 54 : Couplages de l'HPTLC avec la spectrométrie de masse.....	61

Liste des tableaux

Tableau 1: Réactifs de dérivation couramment utilisés.....	28
Tableau 2 : Tests biologiques existants pour les pathologies ciblées (adaptés (+) ou non adaptés (-) à l'HPTLC.....	33

Introduction Générale

Depuis le milieu du XXe siècle on peut observer une recrudescence de certaines maladies liées à deux facteurs majeurs : le vieillissement de la population mondiale ainsi que les nouveaux modes de consommation. En effet, selon l'Observatoire des Territoires [1], le vieillissement de la population est un phénomène à portée mondiale, touchant les pays développés comme les pays émergents. Ceci est dû à la baisse de la fécondité secondée par un allongement de l'espérance de vie. Cette sénescence va entraîner l'émergence de maladies jusqu'alors peu représentées. C'est le cas notamment des maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, ...etc.). De plus, le changement des habitudes de consommation notamment la sédentarisation et l'augmentation du sucre et des graisses dans l'alimentation ont également entraîné une augmentation importante de l'incidence de pathologies telles que l'obésité, les maladies cardiovasculaires, les syndromes métaboliques et le diabète de type II. En outre, l'accroissement de la consommation de médicaments a également entraîné une augmentation des résistances des microorganismes aux familles d'antibiotiques classiques.

La toxicité, les effets indésirables importants voire l'impuissance des traitements actuels entraîne un besoin urgent de trouver de nouvelles molécules actives dans ces pathologies. Le domaine des produits naturels et plus précisément celui des substances naturelles végétales est un réservoir immense de nouvelles molécules pour ces applications.

Les extraits végétaux sont des matrices complexes, voire très complexes, composées d'un mélange de molécules de propriétés différentes ce qui rend le processus de purification extrêmement fastidieux et chronophage. Afin de palier à cela, les avancées scientifiques en chromatographie planaire ont permis de coupler une séparation des composés et des tests d'activités biologiques. Ainsi est née la technique de bioautographie permettant de révéler l'activité biologique d'une molécule provenant d'un mélange en peu d'étapes.

Cette thèse regroupe tout d'abord une description de la théorie et de l'appareillage de l'HPTLC, sera développée en suite les principes de la bioautographie et pour finir seront présentées ses applications illustrées par des exemples issus de la littérature.

1 L'HPTLC

L'HPTLC est une technique de chromatographie planaire utilisée en majorité en laboratoire de recherche pour le contrôle qualité des plantes médicinales [2] entrant dans la composition des compléments alimentaires et des médicaments à base de plantes. En effet, le durcissement de la réglementation sur les plantes médicinales oblige les industriels à vérifier de plus en plus la qualité des lots de plantes qu'ils utilisent. Cette technique est donc utilisée pour obtenir des profils caractéristiques des plantes à analyser qui seront comparés aux profils obtenus sur des plantes de la même espèce identifiées formellement (standards botaniques). C'est également une technique rapide de séparation des composés de mélanges complexes que sont les extraits végétaux. C'est pour cela qu'elle est de plus en plus utilisée pour cribler l'activité sur des cibles biologiques de composés naturels évitant les étapes chronophages des fractionnements bioguidés qui sont actuellement la technique la plus utilisée dans les tests biologiques sur matière végétale. Cette partie comprend une analyse bibliographique de cette méthode et de ses applications dans le domaine de la recherche de composés actifs naturels.

1.1 La chromatographie planaire : Principes généraux

1.1.1 Historique de la méthode

La chromatographie fut inventée en 1903 par M.S. Twett qui comprit le premier les mécanismes d'adsorption en voulant séparer des pigments végétaux, or sa technique ne fut que très peu employée pendant les trente années suivantes. Il fallut attendre 1938 pour que N.A Izmailov et M.S. Schraiber utilisent pour la première fois une couche mince d'alumine déposée sur une plaque de verre. Cette technique fut appelée « drop chromatography », car le solvant était déposé goutte après goutte sur l'échantillon adsorbé dans l'alumine et de cercles concentriques de composés pouvaient être observés. Quelques années plus tard, en 1941, Martin et Syngé inventèrent la « chromatographie de partition » en séparant des acides aminés en les adsorbant sur du gel de silice traversé par une phase mobile composée de chloroforme. L'addition de liants à la couche mince afin de la faire adhérer sur le support fut effectuée en 1949 par Meinhard et Hall. La chromatographie sur couche mince moderne telle que nous la connaissons fut introduite dans les années 1950 par Kirchner qui fit migrer ses extraits sur du gel de silice adhérent à une plaque de verre dans le sens conventionnel vertical. Il standardisa sa méthode afin de la rendre reproductible. La visualisation des composés invisibles en lumière blanche

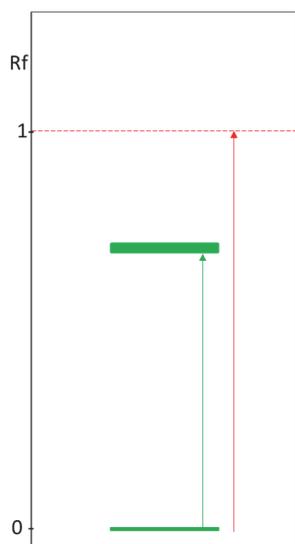
avait été rendue possible par l'addition à la silice d'un indicateur UV de fluorescence par Sease en 1947 alors que les dérivations chimiques furent étudiées en 1953 par ce même Kirchner. Stahl comprit à cette époque que l'utilisation d'une granulométrie la plus fine possible de la phase stationnaire était primordiale pour une bonne séparation des composés. Il publia ses travaux en 1956 sous le titre « Thin Layer Chromatography ». Le terme « chromatographie sur couche mince » (CCM) était inventé. Il émit le besoin de pouvoir contrôler au mieux toutes les phases du process à l'aide d'appareils plus perfectionnés ainsi que des plaques pré-enduites standardisées. C'est ainsi que fut commercialisé le premier kit de CCM en 1958 suivi de la commercialisation de plaques pré-enduites dans les années 1960. A cette période, la CCM, jusqu'alors qualitative, devient quantitative avec l'utilisation d'un densitomètre par Dallas et Genest. Les années 1970 verront l'apparition sur le marché de plaques standardisées à fines particules de silice nommées HPTLC (High performance Thin Layer Chromatography). Les années 1980 virent l'automatisation de la méthode s'améliorer, notamment lors du dépôt de l'échantillon et du développement de la plaque. De nouvelles méthodes de développement virent le jour à cette période en modifiant le passage de la phase mobile au travers de la phase stationnaire qui était auparavant uniquement dû aux forces capillaires. Celui-ci peut être forcé soit par la force centrifuge (chromatographie centrifuge) soit par un système fermé pressurisé dans l'OPLC (OverPressured Layer Chromatography). De plus, à cette période sont apparues les premières tentatives de couplage à d'autres techniques analytiques : la spectroscopie infrarouge (TLC/FTIR) et la spectrométrie de masse (TLC/MS) très en vogue de nos jours.

1.1.2 TLC : principe de la méthode [3]

La TLC a pour but la séparation de molécules composant un mélange complexe. Chacune de ces molécules peut être caractérisée par sa localisation sur le chromatogramme. En effet, la hauteur d'élution de la molécule résultant de son interaction avec les molécules contenues dans la phase mobile et dans la phase stationnaire lui est propre pour chaque système utilisé. La phase mobile est l'élément de transport des molécules composant l'échantillon à travers la phase stationnaire à l'aide des forces capillaires. Lors du développement, deux forces s'opposent : la force de traction qu'opère la phase mobile sur les composés ainsi que la résistance due à l'action de la phase stationnaire. En effet, la phase mobile tend à entraîner les molécules dans le sens de l'élution alors que la phase stationnaire tend à les retenir adsorbées. Ces forces sont différentes pour chaque composé élué si bien qu'à la fin du développement,

chaque constituant du mélange aura migré sur une distance différente des autres. Ceux dont la force de traction de la phase mobile aura été plus forte auront migré plus loin que ceux pour lesquels la force résistive de la phase stationnaire aura pris le dessus.

Sur le chromatogramme, la distance de migration d'une molécule peut être caractérisée par une valeur de Rf (Rapport frontal) (Figure 1 : Calcul du Rf). Celle-ci correspond au ratio de la distance parcourue par la molécule et de la distance totale parcourue par la phase mobile.

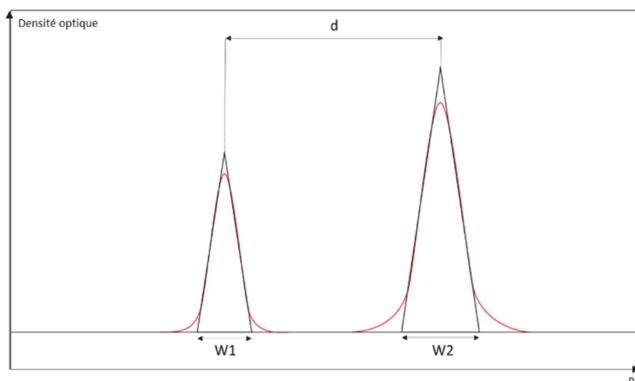


$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par la molécule}}{\text{Distance parcourue par la phase mobile}}$$

Figure 1 : Calcul du Rf

Le Rf d'une molécule va changer selon la nature et les propriétés de chaque élément du système chromatographique.

La TLC ayant pour but la séparation de composés, ce paramètre peut être évalué par la résolution (Figure 2 : Calcul de la résolution entre deux pics) entre deux taches. Sur ce schéma, la densité optique des taches est disposée en ordonnée. Chaque tâche correspond donc à un pic et on obtient ainsi un chromatogramme. Cette densité optique peut être mesurée un scanner comme le CAMAG TLC Scanner 4, présenté plus bas.



$$R = \frac{d}{\frac{W1 + W2}{2}}$$

Figure 2 : Calcul de la résolution entre deux pics

La résolution (R) est généralement jugée acceptable pour $R \geq 1,0$. Les largeurs de tâches (W1 et W2) et la distance entre deux taches (d) peuvent se calculer en les mesurant directement sur la plaque avec un double décimètre (ceci est possible uniquement lorsque les composés sont colorés ou qu'une dérivation les a rendus colorés) ou sur un chromatogramme provenant d'un densitomètre.

1.1.3 La phase stationnaire

Une plaque d'HPTLC est composée d'une couche d'adsorbant attachée à un support inerte par un liant. Sur le marché, une multitude de types de plaques est disponible différant par la nature du support et de l'adsorbant.

1.1.3.1 Le support

Tout d'abord le support est le plus souvent constitué d'une plaque de verre. Il peut également être formé d'une feuille d'aluminium ou d'une plaque de PVC. Les avantages de la plaque de verre sont une plus grande inertie et une plus grande rigidité. Les dimensions disponibles sont 20 cm x 20 cm, 10 cm x 20 cm, 5 cm x 20 cm ou 10 cm x 10 cm. Les plaques d'HPTLC sont le plus souvent au format 10 cm x 20 cm. Ce dernier est modulable en fonction des besoins en les coupant avec un coupe-verre comme le CAMAG Smartcut (Figure 3).



Figure 3 : CAMAG SmartCut [4]

1.1.3.2 Epaisseur de la couche d'adsorbant

Plusieurs paramètres physiques concernant la couche d'adsorbant entrent en compte dans la séparation des composés analysés. L'épaisseur de la couche se situe entre 0,1 mm et 0,25 mm pour les plaques d'HPTLC et de TLC analytique alors que pour les plaques de TLC préparative, une épaisseur pouvant atteindre 2 mm est envisageable afin de pouvoir y déposer une quantité d'échantillon supérieure. Au contraire, pour les plaques d'UTLC (Ultra Thin Layer Chromatography), l'épaisseur ne dépassera pas 10 μm . La finesse de la couche d'adsorbant engendre une vitesse de migration plus élevée ainsi qu'un seuil de détection des composés plus faible.

1.1.3.3 Taille des particules de la phase stationnaire

La taille des particules composant la couche est également très importante. Une plaque d'HPTLC sera composée de particules d'environ 6 à 8 μm avec une distribution de tailles très fine alors qu'une plaque de TLC classique aura des particules de 10 à 15 μm selon une distribution beaucoup plus large. En effet, plus la distribution de la taille des particules est fine, plus la couche sera homogène et meilleure sera la performance de la phase stationnaire (Figure 4).

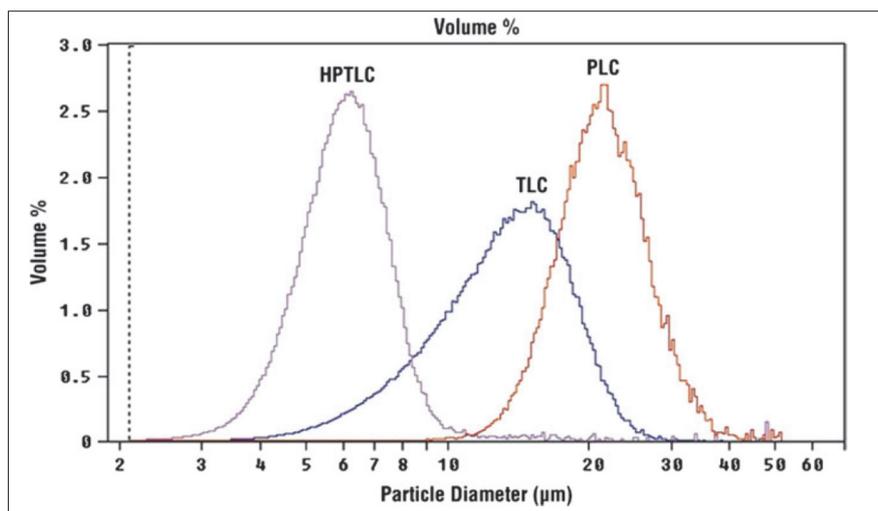


Figure 4 : Distribution des tailles de particules dans le gel de silice

1.1.3.4 Surface spécifique

Le dernier paramètre physique à prendre en compte est la surface spécifique. Celle-ci s'échelonne de 100 à 500 m²/g. Plus celle-ci est élevée, plus les composés sont retenus par l'adsorbant.

1.1.3.5 Matériaux de la couche d'adsorbant

Les couches d'adsorbants peuvent être constituées de différents matériaux. Les plus répandus sont :

- l'Alumine (Al₂O₃) ou oxyde d'aluminium : Elle fait partie du groupe des adsorbants ioniques et polaires. La rétention de ce matériau est due à certains groupements fonctionnels particuliers : les groupes Al³⁺ se comportent comme des acides de Lewis et les groupements O²⁻ peuvent se comporter en groupement basique. De plus, les groupements polaires AlOH sont des donneurs de protons faibles. L'alumine est un catalyseur actif et peut réagir avec certaines familles de molécules contenues dans l'échantillon comme les esters et les cétones.

- la cellulose (Figure 5) : polymère de glucose naturel (300 à 600 unités de glucose) que l'on hydrolyse pour former des blocs de 40 à 200 unités appelés cellulose microcristalline. La longueur de ces particules se situe entre 2 et 20 µm. La cellulose est un adhésif naturel grâce à sa multitude de groupements hydroxyle donc celle-ci n'a pas besoin de liant pour adhérer à la plaque. C'est un adsorbant polaire mais celle-ci peut facilement être modifiée (par exemple par acétylation pour en faire une phase inverse).

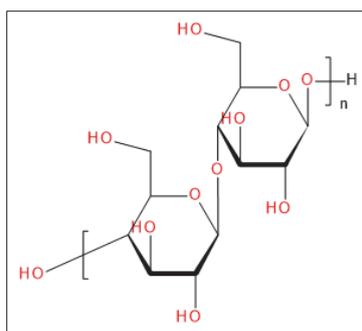


Figure 5 : Polymère de cellulose

- Le gel de silice (Figure 6) : matériau de loin le plus utilisé dans la confection de phases stationnaires en TLC et en HPTLC. Il est fabriqué par précipitation acide de silicate de sodium (Na_2SiO_3). Les liants les plus utilisés sont l'amidon, le gypse et les liants organiques. Les groupements silanol (SiOH) de la surface sont responsables du pouvoir adsorbant du gel de silice. La concentration en groupements hydroxyle est de 5 par mm^2 . Ces groupements sont fortement donneurs de liaisons hydrogène. Ils se comportent également comme des acides faibles. Le gel de silice le plus utilisé en chromatographie plane est le « silica gel 60 » dont les pores mesurent 60 Å.

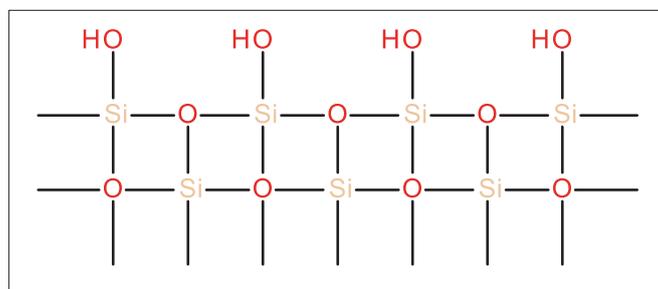


Figure 6: Structure moléculaire du gel de silice

Le gel de silice peut également être modifié pour former des phases greffées. Les greffages les plus fréquents sont les hydrocarbures (phases inverses ou RP), l'amino ($-\text{NH}_2$), le cyano ($-\text{CN}$) et le diol. Ceux-ci permettent une meilleure sélectivité des phases stationnaires envers certaines catégories de composés (composés apolaires pour les phases inverses, chargés pour la phase amino, ...).

Chaque phase stationnaire, par ses propriétés chimiques et physiques joue sur différents mécanismes de séparation :

- l'adsorption : la structure poreuse des phases stationnaires polaires comme le gel de silice leur confère une grande surface interne. De ce fait, le nombre de groupements chimiques disponibles pouvant interagir avec les molécules de l'échantillon est très important. Ces interactions peuvent être de différentes natures selon la phase stationnaire comme une interaction dipôle-dipôle, liaison hydrogène, interaction ionique ou bien même acide de lewis-base. Le nombre et la nature des groupes fonctionnels de l'analyte, ainsi que son encombrement stérique vont définir son degré de rétention.

- la partition : elle est due à la différence de solubilité d'un composé entre deux liquides non miscibles. L'un d'eux est adsorbé sur un support solide comme une phase stationnaire d'HPTLC. Elle peut être créée lorsque l'un des solvants de la phase mobile est absorbé de manière plus importante que les autres dans la phase stationnaire comme par exemple l'eau dans une phase mobile organique lorsqu'elle est à saturation. Dans ce cas, elle forme dans le gel de silice plusieurs couches ce qui rend la phase stationnaire favorable à la séparation de composés polaires. La reproductibilité des expériences en chromatographie de partition est bonne car la couche de phase stationnaire n'entre que très peu en compte dans le processus de séparation mais le résultat est difficilement prédictible.

- formation de complexes : elle a pour origine la formation réversible de composés par coordination entre des acides de Lewis et des bases. En effet, la séparation de composés polyaromatiques ou insaturés pourra s'effectuer en imprégnant la phase stationnaire d'acides de Lewis ou de molécules très électrophiles. Les composés seront donc séparés selon leur degré d'insaturation.

- l'échange d'ions : la phase stationnaire comportera des ions pouvant être échangés avec les contre-ions des analytes ce qui créera des interactions ioniques créant la séparation des composés du mélange. La rétention des composés se fera en fonction de la polarisabilité et de la charge des ions en présence.

- l'appariement d'ions : il sert à la séparation d'électrolytes le plus souvent sur les phases inverses. La rétention s'effectuera donc par la partition des paires d'ions entre la phase mobile et la phase stationnaire.

- exclusion par taille : la séparation des molécules s'effectuera selon leur taille grâce à leur passage ou non à travers les pores de la phase stationnaire. Les grosses molécules ne pourront

pas pénétrer la couche d'adsorbant, alors que les petites molécules pourront la pénétrer profondément et seront alors plus retenues.

1.1.4 La phase mobile

La phase mobile sert de transporteur pour les molécules analysées solubilisées dans celle-ci le long de la phase stationnaire. Chaque changement dans la phase mobile va entraîner un changement de R_f de chaque molécule selon la force éluante du solvant choisi, un changement dans la séparation et dans la résolution.

Certains paramètres sont inhérents à celle-ci. Tout d'abord la force éluante du solvant. L'augmentation de celle-ci abaissera la rétention du composé et donc augmentera son R_f sur la plaque. Elle peut avoir plusieurs origines qui dépendent de la phase stationnaire employée. En effet, lors de l'utilisation d'une phase normale comme le gel de silice en chromatographie d'adsorption, la force éluante de la phase mobile évoluera dans le même sens que la polarité de celle-ci alors que lors de l'emploi de phases inverses en chromatographie de partition, la lipophilie du solvant ira dans le même sens que la force éluante. En chromatographie d'échange d'ions c'est le pH qui sera primordial dans l'évolution de ce paramètre. Un même solvant aura des forces éluantes différentes pour chaque phase stationnaire. La force éluante des solvants est mesurée de façon empirique. Elle est représentée par la valeur ϵ° ou paramètre de force éluante. Par convention le ϵ° du pentane est de 0,00. Lors de l'emploi d'une phase mobile contenant plusieurs solvants (ce qui est le cas la plupart du temps), les paramètres de force éluante de chaque solvant additionnés ne correspondent pas à l' ϵ° du mélange car celui-ci ne varie pas linéairement. Une autre grandeur représentant aussi la force éluante est additionnable lors de mélanges de solvants. C'est l'index de polarité P' .

Le deuxième paramètre entrant en compte est la sélectivité du solvant choisi.

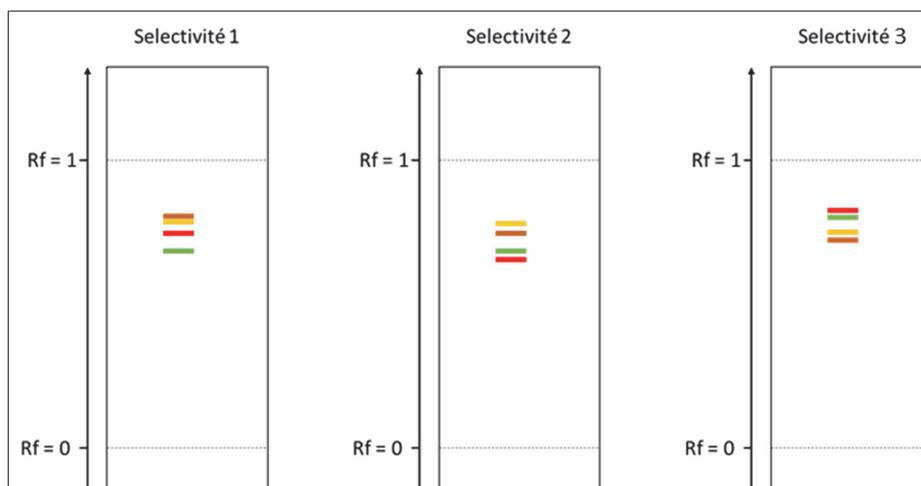


Figure 7 : La sélectivité des solvants

Pour des solvants différents de même force éluante, le Rf des composés sur la plaque sera similaire or leur position relative l'un par rapport à l'autre est susceptible de changer en fonction de la sélectivité du solvant (Figure 7).

Snyder a classé les solvants en huit groupes en fonction de leur capacité d'interaction soluté-solvant comme accepteur de protons, donneur de protons et attracteur dipolaire (Figure 8). Les solvants d'un même groupe ont une sélectivité similaire et donc l'ordre d'élution des composés analysés sera le même.

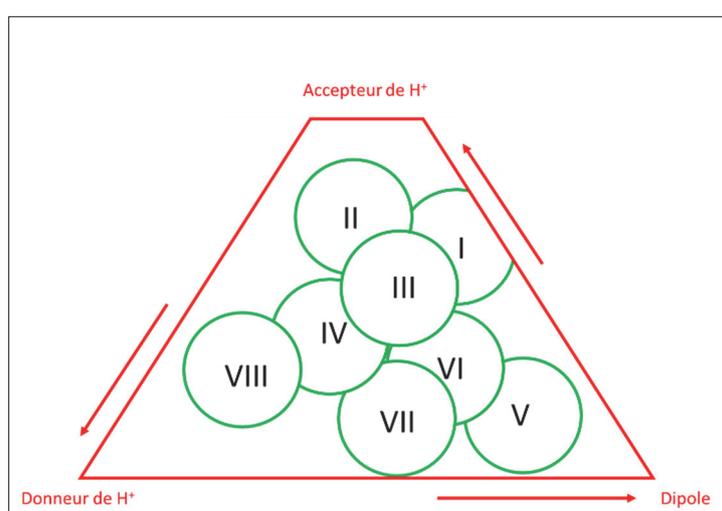


Figure 8 : Triangle des sélectivités de Snyder

D'autres paramètres entrent également en compte dans le choix de la phase mobile tels que la pureté des solvants.

Des modèles théoriques existent pour déterminer les bons solvants et les bonnes proportions à utiliser dans la phase mobile. Le modèle PRISMA sera développé ici. Ce modèle a été développé par Nyiredy et al. [5] en 1985.

Premièrement, dix solvants sont choisis provenant de tous les groupes de sélectivité. Les trois solvants menant à la meilleure sélectivité sont conservés afin de construire le prisme. Le triangle de base du prisme est dessiné dont chacun des coins représente un des solvants choisis dans un référentiel comportant en abscisse la sélectivité du solvant et en ordonnée la force éluante de celui-ci. La hauteur du prisme à chaque coin du triangle est proportionnelle à la valeur P' (index de polarité) du solvant. Dans la partie régulière du prisme (qui régit le comportement des molécules peu polaires à moyennement polaires), une molécule a un R_f similaire dans toute la surface d'un triangle congruent au triangle de base du prisme. La troisième étape consiste en un abaissement de la force éluante des deux solvants les plus forts en y ajoutant de l'hexane ($P'=0$) jusqu'à une valeur égale à la force éluante du solvant le plus faible afin d'obtenir un prisme régulier (Figure 9).

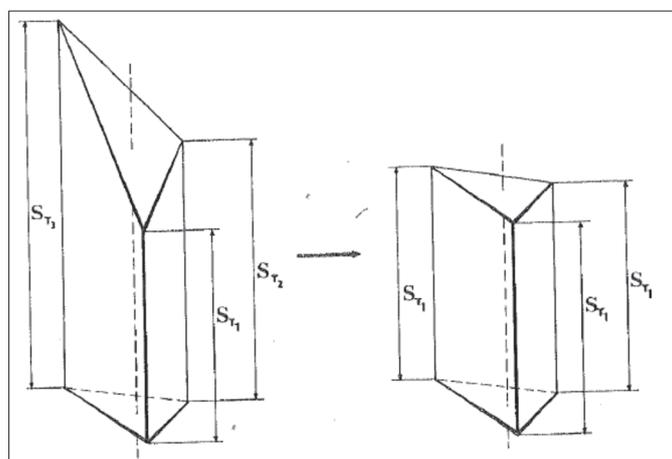


Figure 9 : Les premières étapes du modèle PRISMA [5]

Dans certains cas, lorsque la polarité des composés est très faible, il faut abaisser la force éluante des trois solvants.

Dans un dernier temps, il suffit d'ajuster la sélectivité ou la proportion de chaque solvant jusqu'à atteindre une résolution satisfaisante, ceci en déplaçant le point central du triangle obtenu vers l'un des coins.

1.1.5 Etapes de l'analyse

1.1.5.1 Préparation d'échantillon

La préparation de l'échantillon en vue de son application sur la phase stationnaire est la première des étapes conditionnant un bon résultat d'analyse. En effet, le solvant utilisé pour la dissolution de l'échantillon doit être choisi de manière éclairée. Celui-ci est évaporé après l'application donc il doit être un minimum volatil, il doit être stable, ne doit pas réagir avec les molécules de l'échantillon, ne doit pas contenir trop d'impuretés (surtout pour de gros volumes de dépôt), et ne pas avoir une force éluante trop importante afin de ne pas enclencher de processus chromatographique pendant le dépôt. Outre ces caractéristiques inhérentes au dépôt il doit bien évidemment solubiliser les composés que l'on veut analyser.

1.1.5.2 Dépôt de l'échantillon sur la plaque

Le dépôt de l'échantillon sur la plaque est l'une des étapes les plus critiques dans l'obtention d'un bon chromatogramme. Trois paramètres doivent être impérativement contrôlés.

Premièrement, la couche de silice ne doit pas être endommagée. Il est important de bien vérifier avant application que la couche est intègre et de ne pas marquer la ligne de dépôt. En effet, l'utilisation d'un crayon gris interfèrera avec la migration et la pureté des molécules dans chaque tâche. Ceci est d'autant plus important lorsqu'une détection par densitométrie sera effectuée.

Deuxièmement, la position du dépôt des échantillons doit être mesurée avec précision. Il est important que tous les échantillons soient déposés sur une même ligne parallèle au bord inférieur de la plaque afin que le processus chromatographique commence en même temps pour tous et que l'on puisse par la suite mesurer le R_f de chaque tâche correctement. De plus une distance minimale entre les échantillons déposés les plus à l'extérieur et les bords de plaques doit être respectée afin que les effets de bords soient minimisés, voire absents. Et finalement une distance minimale entre chaque dépôt ne doit pas être dépassée afin que les différents échantillons ne se mélangent pas au cours du processus chromatographique.

Enfin, les bandes de dépôt doivent être les plus fines possibles donc le volume d'application doit être lui aussi contrôlé ainsi que le solvant utilisé pour le dépôt. Une trop grosse charge sur une bande entraînera une moins bonne séparation des composés sur le chromatogramme et donc une mauvaise résolution. Pour une TLC sur gel de silice, un solvant ayant une viscosité trop

faible ou une trop haute force éluante provoquera un début de chromatographie au dépôt et la bande sera élargie.

Deux types de dépôt existent : l'application par contact et l'application par spray (Figure 10).

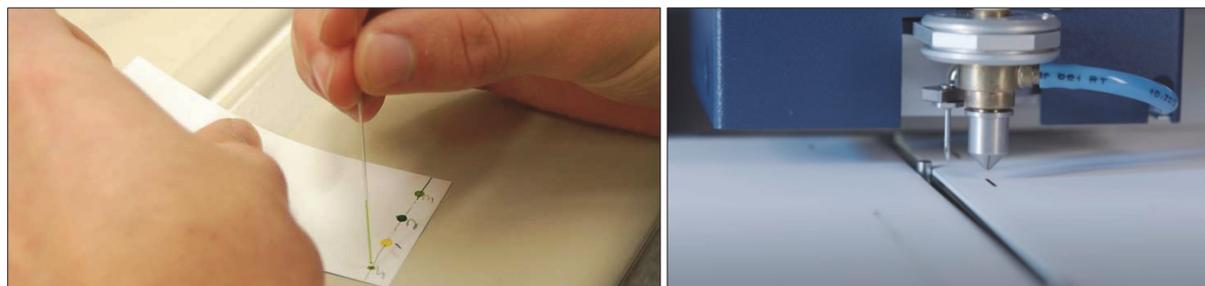


Figure 10 : Application par contact [6] à gauche et application en spray [7] à droite

- L'application par contact : c'est la manière d'appliquer la plus simple à mettre en œuvre. A l'aide d'un capillaire ou d'une micro-seringue, l'échantillon est déposé sur la plaque en faisant entrer en contact le bout du capillaire ou de l'aiguille et l'échantillon se dépose par capillarité. Pour que le spot ne devienne pas trop large le volume est appliqué en plusieurs fois avec évaporation du solvant entre chaque mise en contact. L'utilisation d'une micro-seringue permet un meilleur contrôle du débit appliqué en contrôlant la pression exercée sur le piston. Les solvants ayant une trop forte viscosité et une trop faible volatilité doivent être évités.

- L'application en spray sous forme de bande améliore grandement la résolution du chromatogramme. Celle-ci n'était pas possible par application par contact mais elle devient possible avec l'application en spray. Cette technique est automatisée, la machine va contrôler le débit et va volatiliser le solvant lors du dépôt. Elle évite tout début de processus chromatographique lors du dépôt. Un plus grand volume (jusqu'à 100 μ l) peut être déposé en fines bandes. Classiquement, le dépôt est de 2 μ l. L'automatisation permet un dépôt homogène de l'échantillon le long de la bande ce qui améliore nettement le signal sur bruit (notamment en TLC quantitative).

1.1.5.3 Le développement chromatographique.

Le développement chromatographique est la migration des composés sur la plaque dans une cuve en verre appelée chambre chromatographique. C'est également une étape critique dans l'obtention d'un chromatogramme de qualité. Dans le développement, après le choix de la phase mobile vient le choix de la chambre chromatographique. Plusieurs choix se présentent à

l'analyste avec des résultats différents. Le choix de la chambre elle-même, ainsi que la manière de développer la plaque dans celle-ci est important.

Différents modes de développement (Figure 11) avec plusieurs options sont disponibles ayant chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Les échanges entre la plaque et le milieu dans lequel elle est déposée sont nombreux et importants. La première des choses à vérifier est que lors du développement la chambre soit correctement refermée afin d'éviter les perturbations du milieu extérieur ainsi que l'évaporation des solvants de la phase mobile lorsque ceux-ci sont volatils. Ainsi, lors des différentes manipulations comme lors de l'ajout de la plaque après saturation la chambre doit être ouverte avec précautions et refermée le plus rapidement en faisant attention de ne pas se placer sous une hotte aspirante en fonctionnement. Dans tous les cas il est préconisé d'utiliser une phase mobile fraîchement préparée pour chaque analyse.

La chambre peut être saturée, c'est-à-dire complètement remplie de vapeurs de phase mobile, avant d'y introduire la plaque (figure 11a). Pour cela on place dans celle-ci un papier filtre imprégné de phase mobile afin que l'atmosphère de la chambre soit saturée. Le temps de saturation est en général de 20 à 30 min. Ceci augmente de façon non négligeable le temps d'analyse mais l'avantage est le gain de reproductibilité entre les analyses. L'autre facteur modifié est une baisse du R_f des analytes.

Au contraire, l'introduction directe de la plaque après avoir versé la phase mobile (figure 11b) et sans l'utilisation de papier filtre, sans saturation de la chambre provoque un gain de temps d'analyse et une meilleure finesse des bandes du chromatogramme mais l'analyse est peu reproductible.

Une autre option est envisageable : le développement en sandwich (figure 11c). Dans ce cas une contre-plaque est appliquée contre la couche de silice de la plaque à développer en veillant à laisser un espace libre en bas afin que le solvant puisse monter dans la couche par capillarité. La contre plaque va créer un espace exigu entre les deux plaques ou une partie de la phase mobile va s'évaporer et saturer cette lacune. L'analyse produit les bandes les plus fines et la meilleure reproductibilité mais la phase mobile crée des fronts de solvants le plus souvent.

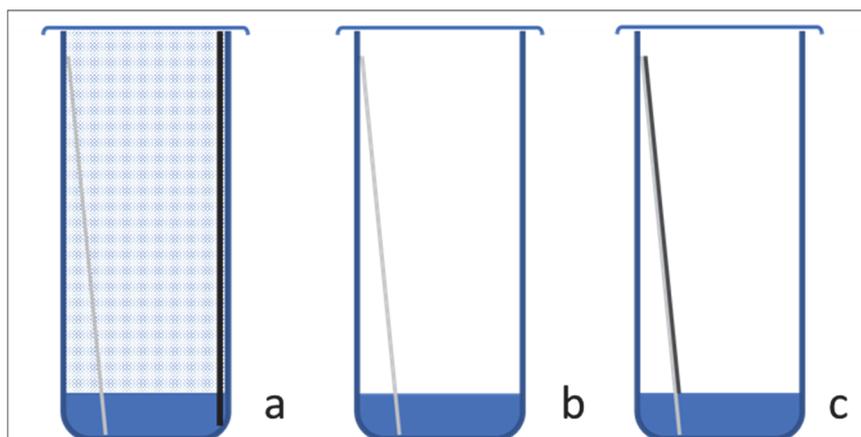


Figure 11 : Différents modes de développement : chambre saturée (a), chambre non saturée (b) et sandwich (c)

Plusieurs types de cuves existent selon l'usage requis (Figure 12). Les cuves à fond plat tout d'abord sont les moins sophistiquées. Elles existent en de multiples tailles et formes et peuvent être un simple bécher couvert d'une feuille de papier aluminium ou même d'un pot de confiture muni d'un couvercle. Leur plus grand avantage est le très faible prix. Généralement leur volume n'est pas très élevé amenant à une saturation rapide lorsque les côtés sont recouverts de papier filtre imprégné de phase mobile. L'utilisation d'une cuve de plus grand volume peut vite élever grandement le volume de solvant utilisé.

Pour abaisser la consommation de solvant les cuves à fond double sont une très bonne alternative. En effet les résultats sont comparables à ceux obtenus en cuve à fond plat mais le volume de solvant utilisé est moindre. La cuve est composée de deux dépressions, une pouvant servir à accueillir la plaque à développer ainsi qu'un petit volume (10 ml) de phase mobile nécessaire au développement, et l'autre servant à la saturation de la plaque et accueillant le papier filtre imprégné de phase mobile (25 ml). Cette configuration est la plus traditionnelle.

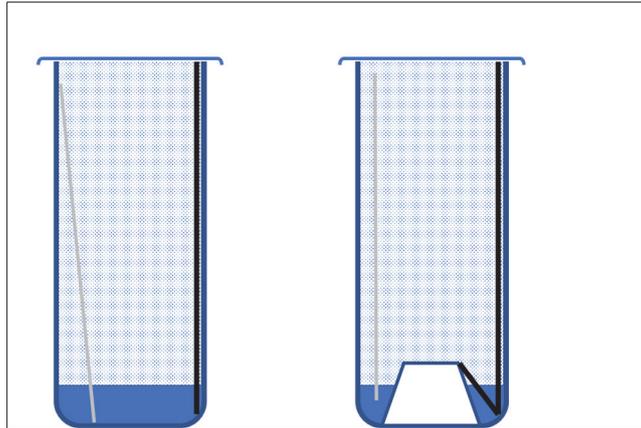


Figure 12 : Différents types de cuves de développement vertical : cuve à fond plat et cuve à double fond

Afin d'augmenter la répétabilité des analyses, les chambres à double fond peuvent être utilisées dans des développeurs automatiques comme l'ADC2 (Automatic Developing Chamber 2) produit par CAMAG (Figure 13).



Figure 13 : CAMAG ADC2 [8]

C'est un système entièrement automatisé. L'appareil contrôle tous les paramètres de la chambre, notamment le taux d'humidité qui peut être contrôlé tout comme le temps de saturation. Ensuite l'appareil met en contact la plaque avec le solvant d'éluion et un capteur suit la progression du développement (le plus souvent jusqu'à 7 cm) afin de remonter la plaque

lorsque le solvant aura migré à une distance prédéfinie. La manipulation humaine étant nulle et le système restant clos, aucune perturbation extérieure ne vient compromettre un bon développement.

Contrairement aux autres modes de développement où celui-ci était opéré à la verticale, la plaque peut être introduite dans une chambre à développement horizontal (Figure 14).



Figure 14: Chambre de développement horizontal CAMAG[9]

Celle-ci offre une grande flexibilité et un coût d'analyse moindre. La géométrie de la chambre et donc la distribution des phases gazeuses de saturation dans celle-ci étant très différente des cuves vues précédemment, les résultats sont sensiblement différents. En plus de la moindre consommation de solvant, l'avantage de la chambre à développement horizontal est le grand nombre d'échantillons pouvant être analysés en parallèle. Les échantillons peuvent être disposés des deux côtés de la plaque et le solvant migre dans les deux sens jusqu'à ce que les fronts de solvant se rencontrent au milieu de la plaque stoppant le processus chromatographique.

1.1.5.4 Les autres modes de développement : les développements multiples

Afin d'augmenter le temps de migration et la résolution des tâches des composés à R_f bas, il est possible d'effectuer une deuxième migration avec la même phase mobile.

De la même manière, la plaque peut être éluée plusieurs fois avec des solvants différents. Des équipements automatisés ont été développés pour cela comme l'AMD2 (Automated Multiple Development) de CAMAG (Figure 15).



Figure 15 : CAMAG AMD2 [10]

Plusieurs solvants sont introduits dans des bouteilles séparées et l'instrument va automatiquement préparer les phases mobiles selon un gradient de force éluante, en développant la plaque successivement pour chaque palier de gradient. Chaque développement atteindra une distance de migration supérieure au palier précédent. Ce mode de développement permettra une grande séparation des composés ainsi qu'une très bonne reproductibilité des résultats.

Un autre type de développement multiple disponible est le développement en deux dimensions (Figure 16). Lors de celui-ci, la plaque est éluee dans un sens, puis est développée en la tournant d'un quart de tour. Selon le résultat souhaité la même phase mobile peut être utilisée ou une phase mobile comportant des solvants de sélectivité différente. La séparation est bonne mais une des limites de cette technique est la possibilité de ne développer qu'un seul échantillon à la fois.

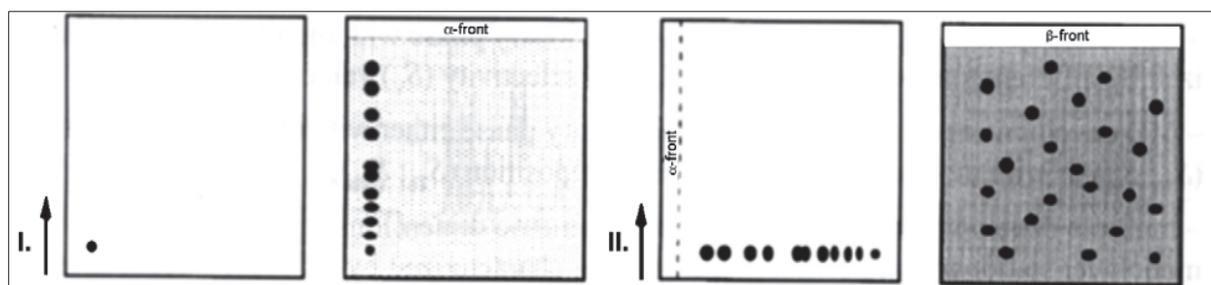


Figure 16 : Développement 2D [11]

Juste après le développement, afin d'évaporer totalement la phase mobile de la plaque pour stopper le processus chromatographique et éviter le phénomène de diffusion, la plaque doit être entièrement séchée à la verticale (pour que le surplus de phase mobile contenu à la base de la plaque dans la partie immergée ne remonte pas le long de la plaque). Dans l'ADC2 la plaque est séchée automatiquement alors que dans le processus manuel, l'utilisation d'un sèche-cheveux sur position air froid est préconisée.

1.1.5.5 La visualisation

Après le développement, la plaque doit être visualisée sous différentes longueurs d'onde (Figure 17). Tout d'abord la lumière visible permet de visualiser les molécules colorées sur la plaque. L'ajout dans la phase stationnaire d'indicateur de fluorescence UV 254 permet de voir des molécules invisibles sous lumière blanche. En effet, les molécules absorbant en UV vont stopper la fluorescence de l'indicateur et une tache noire va apparaître sur le chromatogramme. Une autre longueur d'onde est disponible : 366 nm.

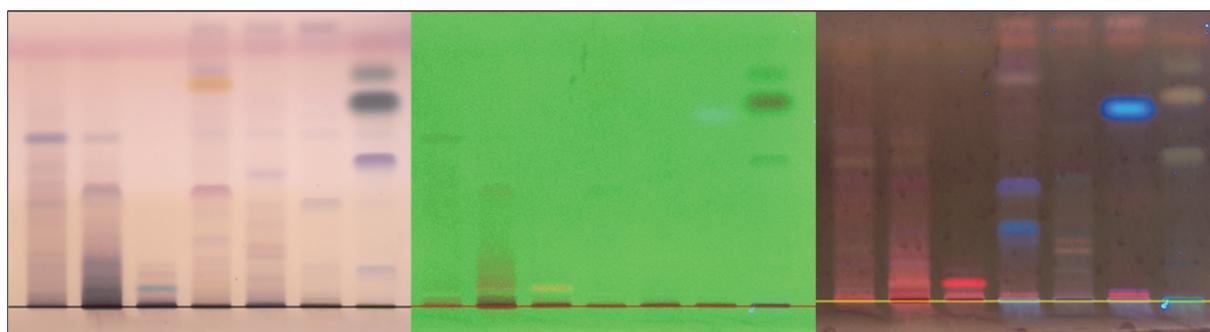


Figure 17: Plaque prise en photo après dérivation sous lumière visible, 254 nm et 366 nm

Des photos peuvent être prises à toutes les longueurs d'onde citées ci-dessus afin de pouvoir comparer les résultats et le Rf entre chaque longueur d'onde ainsi qu'entre différentes analyses. Cette étape de visualisation est très souvent suivie par une étape de dérivation afin d'orienter le résultat de l'analyse vers une visualisation de certaines familles de molécules pas toujours visibles jusqu'alors.

1.1.5.6 La dérivation

C'est une des étapes clés du processus chromatographique. Bien souvent, juste avant cette étape les molécules restent invisibles à l'œil nu aux trois longueurs d'ondes disponibles sur

l'équipement. La dérivation est une modification chimique des molécules présentes sur la plaque par un agent de dérivation (Tableau 1) qui va les mener à devenir colorées afin d'être visibles en lumière blanche, ou à les faire absorber en UV afin de les rendre visibles à 254 nm ou à 366 nm. Plusieurs types de dérivation chimique post chromatographiques sont possibles.

-La dérivation en phase gazeuse : Elle est faite pour des réactifs de dérivation très volatils comme l'iode (le plus souvent utilisé dans ce cas), le chlore ou le brome. Les cristaux de réactifs sont introduits dans l'une des dépressions de la cuve à fond double et la plaque à dériver est introduite dans l'autre dépression, la phase stationnaire vers l'intérieur. Le réactif va se vaporiser et saturer la chambre de gaz, les molécules vont se déposer sur la plaque. Les grands avantages de cette méthode sont la rapidité et la simplicité d'exécution ainsi que l'homogénéité de la dérivation. L'inconvénient majeur est le faible nombre de réactifs assez volatils pour être utilisés en dérivation en phase gazeuse.

-La dérivation en spray (Figure 18) : C'est la technique la plus employée car elle possède de nombreux avantages. Elle est rapide, facile à mettre en œuvre, ne consomme que très peu de réactif et l'équipement est peu onéreux. En revanche son plus grand défaut est son manque d'homogénéité et donc de répétabilité.



Figure 18 : CAMAG TLC Sprayer [12]

Pour avoir le plus d'homogénéité possible il faut contrôler la quantité de réactif expulsé, la finesse des gouttelettes émises, l'éloignement entre la plaque et le matériel de spray, et faire un cheminement précis sur la plaque d'abord de gauche à droite puis de bas en haut (Figure 19).

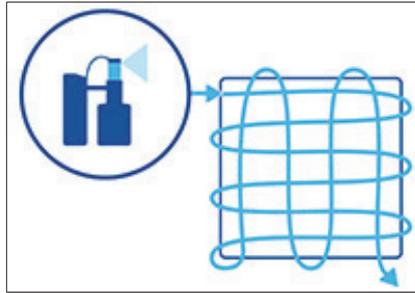


Figure 19 : Cheminement de spray [13]

Il faut veiller à ne pas mouiller la plaque et si plusieurs dérivation successives sont effectuées il faut laisser sécher la plaque à l'air libre entre chaque dérivation. De plus, l'utilisation d'un spray doit se faire dans une chambre spécialisée ou sous une hotte aspirante car cette technique dégage des vapeurs toxiques lors de l'emploi d'un réactif dangereux. Depuis peu, CAMAG a développé un équipement (Figure 20) permettant une dérivation en spray de manière automatique dans laquelle tous les paramètres décrits sont contrôlés ce qui augmente l'homogénéité de la dérivation et amène une certaine reproductibilité dans les analyses mais augmente le coût de l'appareillage.



Figure 20 : CAMAG Derivatizer [14]

-La dérivation par immersion (Figure 21) est une technique permettant une grande homogénéité. De plus la quantité de réactif peut être réglée en ajustant la vitesse et le temps

d'immersion. L'inconvénient de cette technique est l'utilisation d'une grande quantité de réactif qui peut s'avérer très onéreuse pour un réactif cher en utilisation de routine. L'utilisation de plus petites cuves de révélation peut être une bonne alternative pour l'utilisation de réactifs coûteux. De plus, la concentration des solutions utilisées est moindre comparée à celles utilisées en dérivation par spray. Le dégagement de vapeurs toxiques est quasi nul.



Figure 21: CAMAG Chromatogram immersion device 3 [15]

-Chauffage :

Pour que la réaction chimique entre les composés à analyser et les réactifs de dérivation s'opère il est souvent nécessaire de chauffer la plaque soit dans une étuve soit sur une plaque chauffante. Lors de cette étape, les composés colorés vont apparaître petit à petit sur la plaque. Le système de chauffe doit être uniforme pour plus de reproductibilité.

Tableau 1: Réactifs de dérivation couramment utilisés [3]

Réactif de dérivation	Longueur d'onde	Composés détectés
Acide sulfurique	Visible/UV 366 nm	Réactif généraliste
Chlorure de fer (III)	Visible	Phénols, Flavonoïdes, tanins, Alcaloïdes de l'ergot de seigle, principes amers et hypéricines

Anisaldéhyde/acide sulfurique	Visible/UV 366nm	Terpénoïdes, saponines, stérols, iridoïdes, composés lipophiles
Diphénylborate d'aminoéthanol / Polyéthylène glycol	UV 366nm	Flavonoïdes, sucres, anthocyanes
Vanilline/acide sulfurique	Visible/UV 366nm	Terpénoïdes, stérols, alcaloïdes de l'ergot de seigle, salicine, composés lipophiles
Iodo-bismuthate de potassium (Dragendorff)	Visible	Alcaloïdes, hétérocycles azotés
Sulfate de cuivre (II)	Visible	Réactif universel
Bleu solide B	Visible/UV 366nm	Composés phénoliques, tanins
Diphenylamine-aniline/acide phosphorique	Visible	Sucres, glycosides

Après cette étape de dérivation, la plaque est photographiée en UV et en lumière visible une seconde fois afin de pouvoir visualiser l'apparition de nouvelles taches sur le chromatogramme et de pouvoir sauvegarder les images.

1.1.5.7 La densitométrie

Une étape supplémentaire préliminaire à la dérivation (il ne faut pas que les molécules à analyser soient modifiées chimiquement) peut être envisagée dans le but d'obtenir un profil chromatographique et même faire de la quantification. Pour cette étape un matériel supplémentaire sera nécessaire. Il s'agit d'un densitomètre (Figure 22). Il pourra scanner la plaque selon plusieurs modes : en absorbance, en fluorescence ou bien donnera le spectre UV d'une molécule donnée.

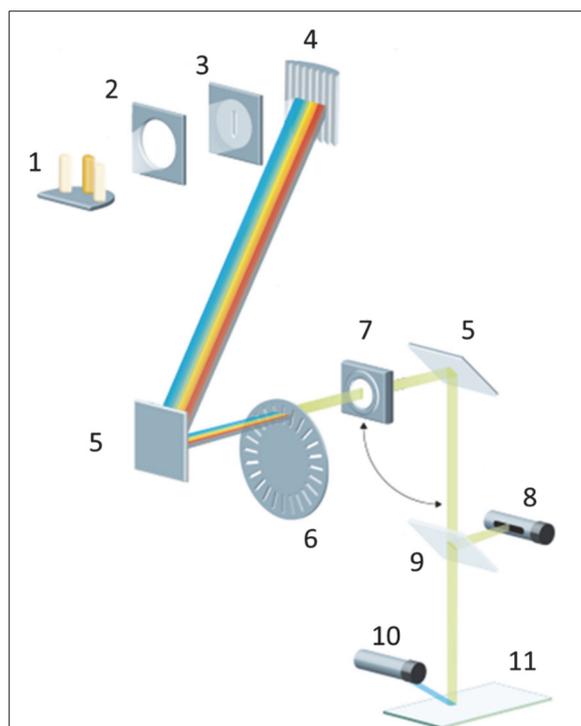


Figure 22 : Système optique du densitomètre tiré du CAMAG TLC Scanner4. 1- sélecteur de lampe, 2- lentilles d'entrée, 3- fente d'entrée du monochromateur, 4- grille du monochromateur, 5- miroirs, 6- disque avec ouvertures en fentes, 7- système de lentilles, 8- photomultiplicateur de référence, 9- diviseur de faisceau, 10- photomultiplicateur de mesure, 11- objet à scanner

En absorbance, une lumière monochromatique à la longueur d'onde prédéfinie est dirigée verticalement sur la plaque et vient la balayer tout le long de la bande éluée. Cette lumière est diffusée par les particules de silice et renvoyée dans toutes les directions de l'espace. Le détecteur est disposé à 45° par rapport à la lumière incidente. Il détecte donc une partie de la lumière réfléchi. Cette lumière est maximale sur les parties de la plaque sans composés absorbant à cette longueur d'onde et donne la ligne de base. Lorsqu'un composé absorbe cette lumière, la détection baisse et par inversion un pic apparaît sur le chromatogramme.

En fluorescence, une longueur d'onde excitatrice est envoyée sur la plaque et un filtre vient bloquer cette même longueur d'onde sur le détecteur qui n'enregistre que les lumières de longueur d'onde inférieures provenant de la fluorescence des molécules contenues sur la plaque.

Une autre option du densitomètre peut enregistrer le spectre UV d'une molécule donnée. Le faisceau lumineux est donc dirigé vers un point précis de la plaque et de multiples longueurs

d'ondes vont être successivement envoyées dans un intervalle défini. Ainsi avec le spectre UV de la molécule, celle-ci peut être identifiée plus aisément.

Avec le densitomètre la quantification d'un composé est possible. Pour cela il faut que sur la plaque aient été appliquées plusieurs concentrations d'un standard connu et effectuer une courbe de calibration. Par comparaison, le scanner pourra donner la concentration de l'analyte.

1.2 Conclusion

Le système chromatographique HPTLC peut donc permettre de séparer les molécules d'un mélange complexe tel qu'un extrait végétal. Il est alors possible d'évaluer chaque molécule préalablement séparée des autres par des tests biologiques. Cette technique de plus en plus prisée pour sa simplicité de mise en œuvre, ses résultats visuels et son faible coût, s'appelle l'HPTLC-Bioautographie.

2 La Bioautographie

2.1 Introduction

Le terme bioautographie signifie l'utilisation de tests biologiques sur plaque sans révélation chimique. Il regroupe les tests biologiques effectués sur une matrice préalablement séparée par une étape de chromatographie planaire comme la TLC, l'HPTLC voire l'OPLC. Les tests biologiques peuvent être de différents types : antibactériens, antifongiques, enzymatiques, antioxydants... etc. Les plus répandus étant les tests antibactériens et antifongiques.

Classiquement, les tests biologiques *in vitro* en laboratoire s'effectuent en microplaques de 96 puits. Dans chaque micropuit est déposé l'extrait ou une fraction de l'extrait puis les solutions nécessaires à la révélation de l'activité biologique. Afin d'isoler et d'identifier la molécule active, de multiples étapes de type préparatives (fractionnement bioguidé : fractionnement de l'extrait puis test biologique en ne gardant que la fraction active à chaque fois de manière répétée jusqu'à l'obtention du ou des composé(s) actif(s) pur(s)) sont nécessaires

La bioautographie possède un intérêt majeur comparé aux autres techniques de réalisation de tests biologiques lors du screening de molécules actives contenues dans des mélanges complexes comme les extraits naturels. En effet, l'étape de chromatographie analytique va permettre de séparer les composés du mélange, chacun d'entre eux va donc pouvoir être testé séparément des autres, ceci évitera les effets d'antagonisme et de synergie et l'identification des composés actifs sera simplifiée. De plus, toutes les étapes classiques de fractionnement bioguidé seront évitées.

2.2 Techniques de criblage de bioactivités

Le tableau ci-dessous (Tableau 2), regroupe une étude de la bibliographie sur les tests biologiques existant et décrits dans des publications scientifiques selon les pathologies ciblées. Certaines de ces techniques ont été adaptées à la bioautographie et d'autres non.

Tableau 2 : Tests biologiques existants pour les pathologies ciblées (adaptés (+) ou non adaptés (-) à l'HPTLC

Maladie explorée	Test Biologique	Type de réaction	Activité de la cible	Substrats	HPTLC	Ref
Syndrome métabolique, obésité	Inhibiteur de lipase	Fluorescence	Digestion des lipides: Triglycéride → Acides gras + Monoacyl- ou diacylglycérol	4 methyl-umbelliferyl butyrate	-	[16]
		Fluorescence		4 methyl-umbelliferyl oleate	-	[17],[18]
		Réaction colorée violette avec le Fast Blue Salt		α-naphthyl acetate	+	[19]
		Réaction colorée violette avec le Fast Blue Salt		β-naphthyl myristate	+	[20]
		Spectrophotométrie (405nm)		4-nitrophenyl butyrate	-	[21],[22]
		Réaction colorée au bleu de Bromothymol		4-nitrophenyl butyrate	+	[23]
		Bioluminescence avec bactérie modifiée		Trimyristine	-	[24]
		Fluorescence de la Rhodamine B		Trioleoylglycérol	-	[25]
		Baisse du pH due aux Acides gras libérés		Tributyryne	-	[26]
		Dosage pHmétrique à la phénolphthaleine		Huile d'olive	-	[27]
		Réaction colorée rouge		Esters du 5-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphényl)méthylène)-2-thioxothiazoline-3-acetic acid	-	[28]
		Changement de couleur de la safranine		Trioleine	-	[29]
		Réaction colorée avec le 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)		dimercaptopropanol tributryate	-	[30]
		Relargage d'un composé violacé, la methylresorufine		Ester du 1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin)	-	[31]
		Luminescence au luminol		lauric acid ester of 2-(4-hydroxyphenyl)-4,5-diphenylimidazole	-	[32]
Diabète de type II	Inhibiteur de la Dipeptidyl peptidase 4 (DPP4)	Décoloration du fond rose-rouge obtenu avec le p-nitroaniline, du nitrate de sodium et du N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochlorure	Inactivation des incrétones donc baisse de l'insuline	Gly-Pro-p-nitroaniline	+	[33]

	Inhibiteur de l'alpha amylase	Réaction colorée avec l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNSA)	Dégradation des polysaccharides	Amidon	-	[34],[35]		
	Inhibiteur β-Glucosidase	Réaction colorée du 2-Naphtol avec le Fast Blue Salt B	Dégradation des sucres	2-Naphthyl-β-D-glucopyranoside	+	[36]		
		Réaction colorée marron de l'esculetine avec du chlorure de fer attention ne fonctionne pas pour screening de coumarines						
Inhibiteur α-Glucosidase	Réaction colorée du 2-Naphtol avec le Fast Blue Salt B							[37]
Maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson)	Inhibiteur AChE (Acétylcholinestérase) et BuChE (Butyrylcholinestérase)	Réaction colorée au Fast Blue B salt attention ne fonctionne que pour les terpènes et alcaloïdes car les polyphenols réagissent avec le Fast Blue B Salt	Dégradation de neurotransmetteur	1-naphthyl acetate	+	[38],[39]		
		Réaction colorée au Réactif d'Ellman					Réactif d'Ellman	[40]
		Réaction colorée bleue avec le bromure de 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium					Tryptamine	[41]
Goutte et stress oxydant	IMAO (Inhibiteur de la Monoamine Oxydase)	Réaction colorée rouge avec l'acide vanillique	Catabolisme de la sérotonine	4-Aminoantipyrine	-	[42]		
		Réaction colorée avec le Nitrobleu tetrazolium					Xanthine	[43]
Maladies infectieuses	Antimicrobien	Bioluminescence	Oxydation de l'Hypoxanthine en Xanthine puis acide Urique	<i>Allivibrio fischerii</i>	+	[44]		
		Réaction colorée					<i>Bacillus subtilis</i> + autres microorganismes	
		Réaction colorée violet → jaune					DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)	[16]
Vieillessement	Antioxydant	Décoloration d'un composé vert-bleu		ABTS (2,2-α-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)	+	[45]		
		Blanchiment du β-carotène					β-Carotène	[46]

			Réaction colorée au réactif de Gibb's		2,6-dichloroquinonechlorimine	-	[47]
			Réaction colorée bleue d'auto oxydation de l'hydroxylamine		Nitroblue tetrazolium	-	[48]
			Chemiluminescence		Co(II)/EDTA-induced luminol	-	[49]
		Recherche de perturbateurs endocriniens pYES test (β-galactosidase exprimée par une levure modifiée)	Fluorescence bleue		4-methylumbelliferyl-D-galactopyranoside	+	[50]
			Fluorescence orange		resorufin-β-D-galactopyranoside	+	[51]
Agent blanchissant en cosmétique		Inhibiteur des tyrosinases	L'oxydation de la tyrosine mène à un fond violet-marron	Oxydation des phénols	L-Tyrosine	+	[52]

2.3 Historique de la bioautographie

La première bioautographie a été effectuée selon la méthode de chromatographie sur papier (PC) par Goodall et Levi en 1947 [53]. Brièvement, la technique consistait à déterminer la quantité et identifier différentes pénicillines. Des bandes de papier filtre sur lesquelles la solution de pénicillines a été déposée ont été développées et mises en contact avec de l'agarensemencé par *Bacillus subtilis*. Après un temps d'incubation des zones d'inhibition de croissance de la bactérie étaient visibles. Quinze ans plus tard, en 1961, cette technique a été adaptée à la TLC par Fischer et Lautner [54] ainsi que par Nicolaus et al. [55]. Dès lors, de nombreux scientifiques vont utiliser la méthode dans la recherche et l'analyse d'antibiotiques en utilisant divers microorganismes (bactéries, champignons) [56]. Depuis, diverses techniques ont été élaborées.

La bioautographie peut s'effectuer de trois manières différentes : La bioautographie directe, la bioautographie de contact et la bioautographie par immersion. Les trois types de bioautographie vont être décrits puis leurs différentes applications explicitées.

2.4 Les différents types de bioautographie

2.4.1 La bioautographie directe (Figure 23)

Dans cette technique, la plaque est développée (comme décrit dans le chapitre 2.5), puis directement immergée dans la suspension de microorganismes ou d'enzymes, puis incubée dans une boîte à atmosphère humide afin que le film liquidien très mince ne s'évapore pas. Après le temps d'incubation recommandé pour chaque test, une phase de révélation va être nécessaire afin de visualiser les taches d'activité.

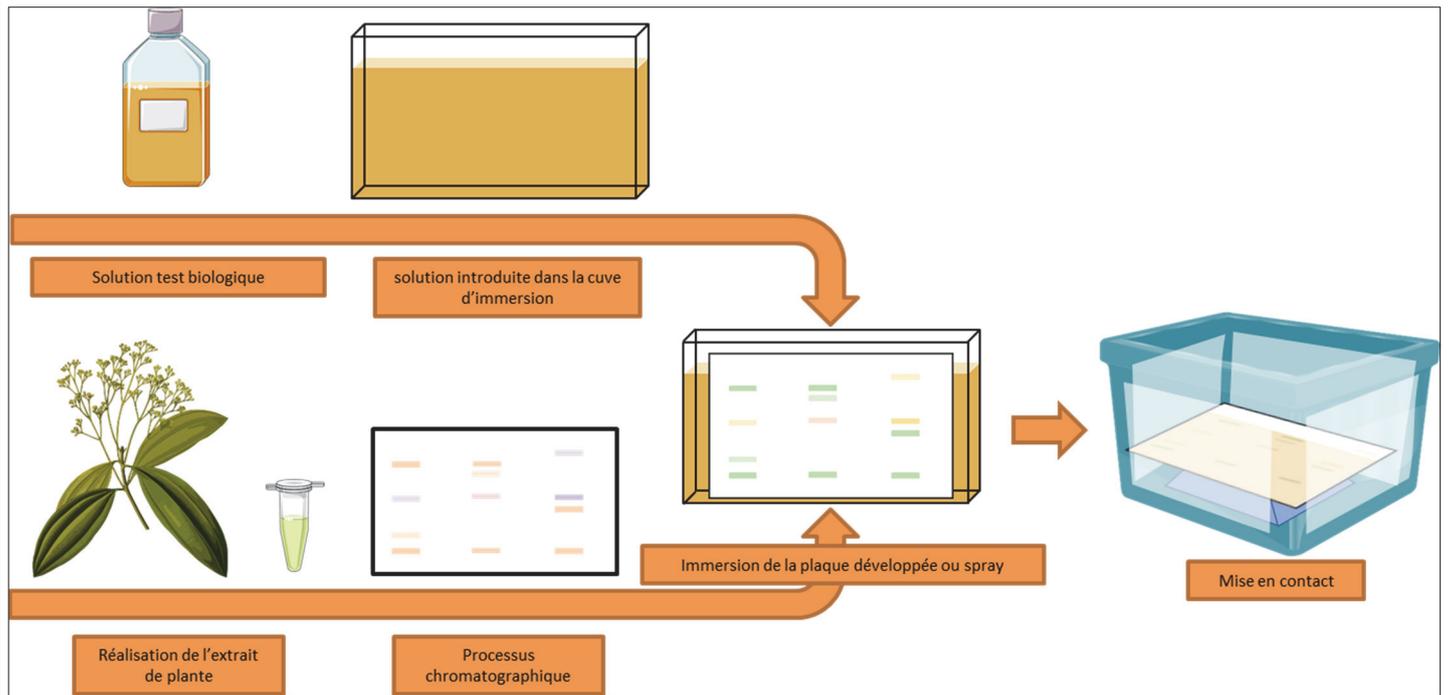


Figure 23 : Bioautographie directe : principes généraux

Dans l'exemple ci-dessous [57] (Figure 24), un extrait de *Salvia officinalis* L. a été développé sur une plaque HPTLC. Celle-ci a été immergée directement dans une suspension de *Bacillus subtilis* et mise en contact pendant un certain temps avant d'être colorée au MTT afin de visualiser les zones où la bactérie est encore vivante (fond violet). A contrario, les zones blanches (tâches x', x y et z) correspondent à des composés antibactériens actifs sur *Bacillus subtilis*.

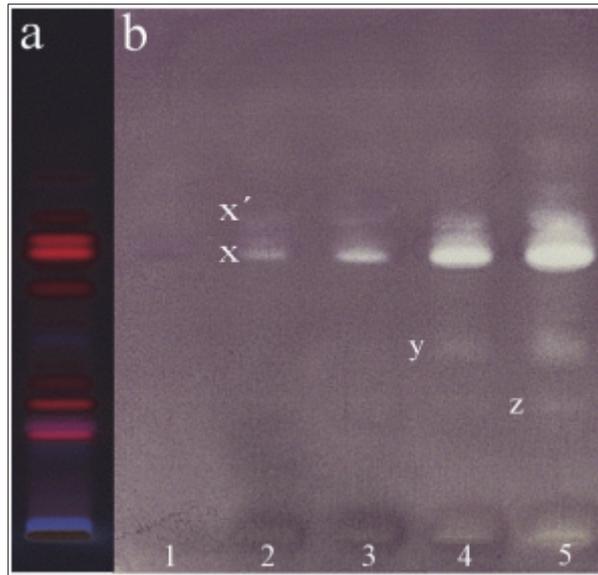


Figure 24: Bioautogramme direct : Plaque visualisée sous UV 366nm sans révélation (a), Bioautogramme du test à *Bacillus subtilis* (b)

2.4.2 La bioautographie de contact (Figure 25)

La plaque développée est mise en contact avec de la géloseensemencée par un microorganisme le temps que les composés séparés de l'extrait diffusent dans l'agar, puis la plaque est enlevée et la gélose est mise à incuber le temps nécessaire pour que les taches d'activité puissent être révélées.

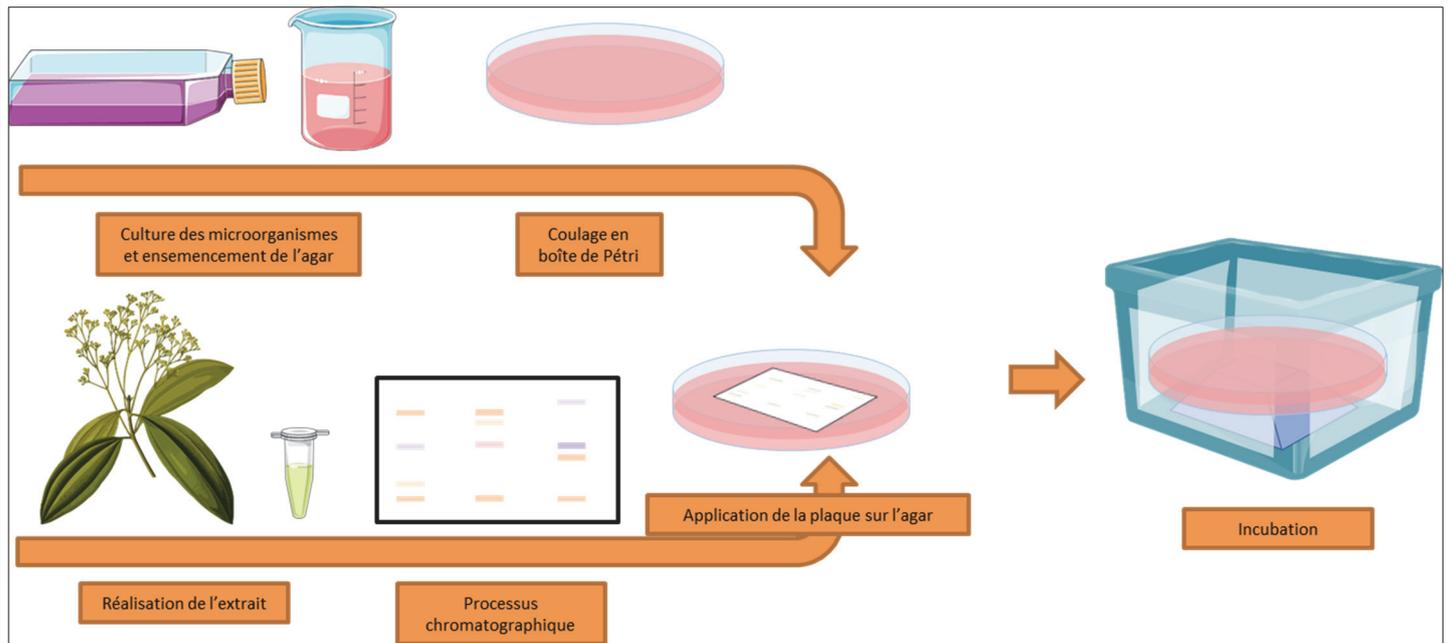


Figure 25 : Bioautographie de contact : principes généraux

Dans l'exemple ci-dessous (Figure 26) [58], un extrait de *Pinus merkusii* Jungh. & Vriese a été développé sur une plaque CCM, la bande a été découpée et mise en contact avec de l'agar ensemencé de *Streptococcus mutans* dans une boîte de Pétri. La zone d'inhibition est apparue à la suite du temps de contact. Ainsi, le Rf des molécules actives a pu être déterminé et les molécules purifiées par la suite.

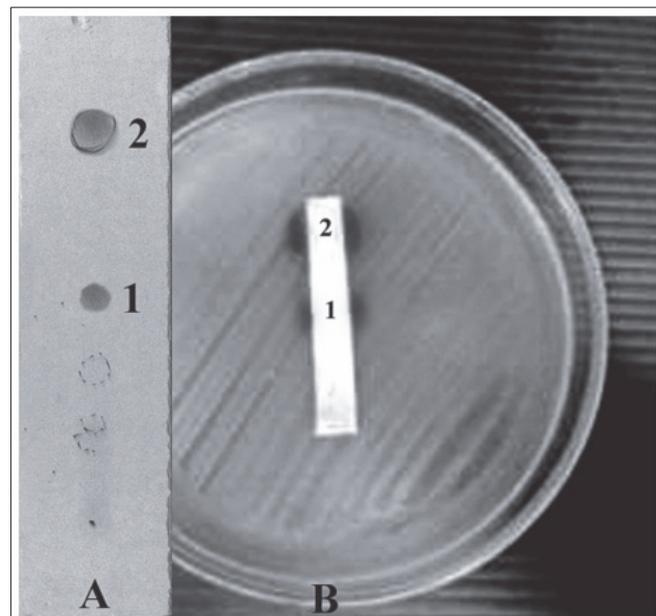


Figure 26 : Bioautographie de contact [58] : Plaque développée (A), Bioautogramme de contact (B) montrant deux molécules actives 1 et 2 à deux Rf distincts.

2.4.3 La bioautographie par immersion (Figure 27)

Cette fois-ci, la plaque développée va être recouverte d'une couche d'agarensemencée par une suspension de microorganisme. Contrairement à la bioautographie de contact, la plaque ne sera pas retirée. Elle restera présente tout au long de l'incubation et de la révélation. La couche d'agar sert à nourrir et garder le microorganisme sensible à la dessiccation dans de bonnes conditions de survie. Comme précédemment, les molécules contenues dans la plaque vont diffuser à travers l'agar et montrer leur activité après une étape de révélation.

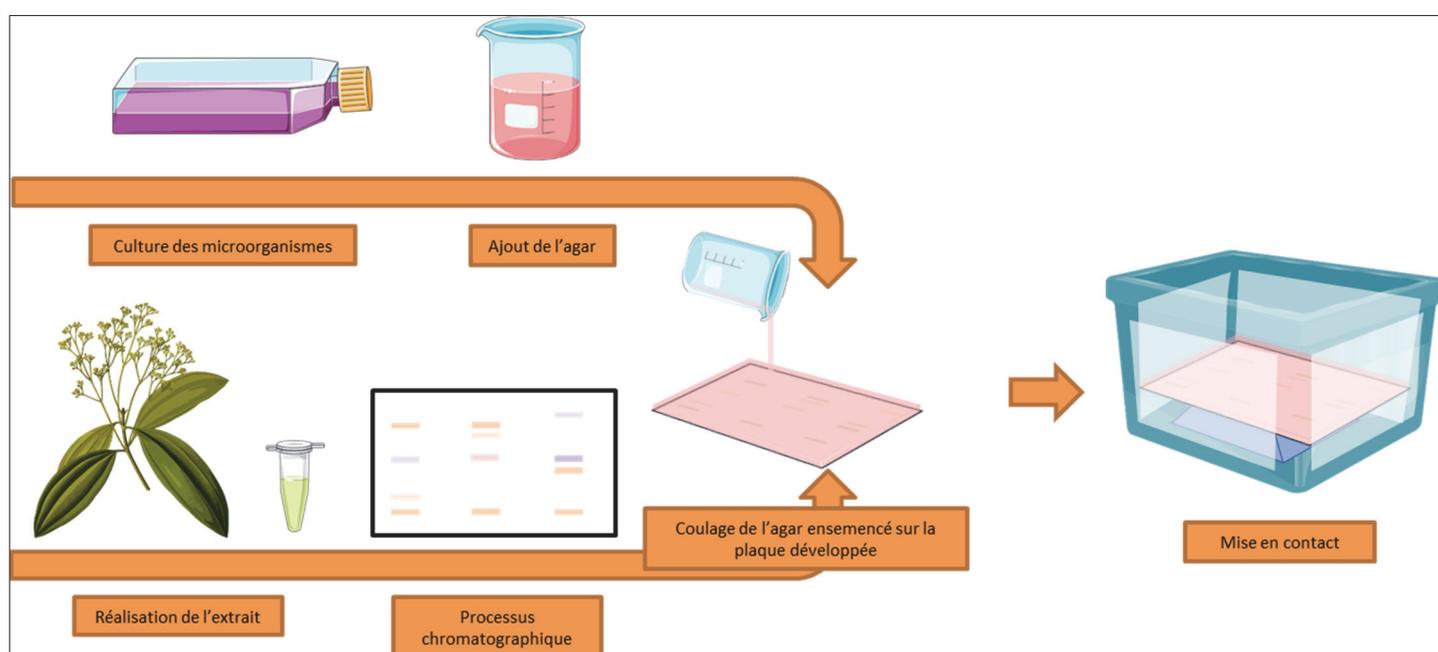


Figure 27 : Bioautographie d'immersion

Dans l'exemple ci-dessous [59] (Figure 28), une plaque HPTLC a été développée avec des fractions provenant d'un extrait de *Passiflora foetida* L.. Sur celle-ci a été coulée une couche d'agarensemencé de *Staphylococcus aureus*. Après une étape de révélation au MTT, les zones d'activité sont visibles (taches blanches sur un fond violet).



Figure 28 : Bioautogramme par immersion [59] dans de l'agarensemencé de 'Staphylococcus aureus'

Les deux dernières méthodes sont utilisées le plus souvent pour les tests antimicrobiens et antifongiques car dans ces tests les temps d'incubation sont longs et une fine couche liquidienne ne suffirait pas à garantir une humidité convenable jusqu'à la révélation. Les autres types de tests, plus rapides, peuvent être effectués par bioautographie directe.

3 Applications de la bioautographie

3.1 Les tests de sensibilité aux antibactériens

La bioautographie a été utilisée dès le début dans la recherche de nouveaux composés antibactériens. La plupart des publications utilisant la bioautographie décrivent des tests antibactériens ou antifongiques. Ainsi, de nombreuses souches bactériennes ont été étudiées *via* cette technique [60]. L'inconvénient majeur lié à l'utilisation de bactéries pathogènes est l'obligation d'utilisation d'un laboratoire équipé dans ce but.

Avec la hausse du nombre de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques actuels, il devient nécessaire voire urgent de trouver de nouvelles molécules actives. Les plantes sont un immense réservoir de composés actifs.

Selon l'espèce bactérienne, les méthodes de révélation des zones d'activité seront différentes :

3.1.1 Les tests antibactériens au sel de tétrazolium

La technique la plus répandue utilise du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide). La déshydrogénase présente dans les bactéries vivantes va réduire (Figure 29) ce sel de tétrazolium en formazan de couleur violette. Le fond de la plaque va donc se colorer en violet alors que les zones où une molécule active aura tué la bactérie, la silice va rester jaune (couleur initiale du MTT).

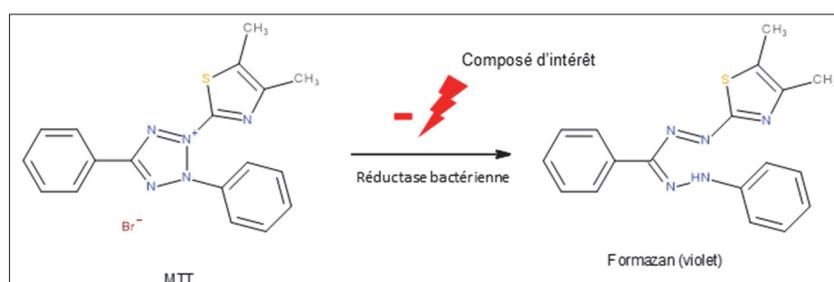


Figure 29 : Réduction du MTT

Dans l'exemple ci-dessous [60] (Figure 30), deux plaques HPTLC ont été développées avec de l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris* L.) (1), un extrait hydroalcoolique de thym (2) et des standards de monoterpènes (thymol (a), carvacrol (b), linalol (c), et bornéol (d)) (3). Une plaque (à gauche) est révélée à l'anisaldéhyde/acide sulfurique, la deuxième (à droite) a été immergée dans une suspension de *Bacillus subtilis* puis laissée en contact dans un incubateur et enfin révélée à l'aide d'une solution de MTT. Cette révélation a permis de visualiser les zones

(en blanc) où la bactérie est morte et donc de repérer l'activité antibactérienne du thymol et du carvacrol.

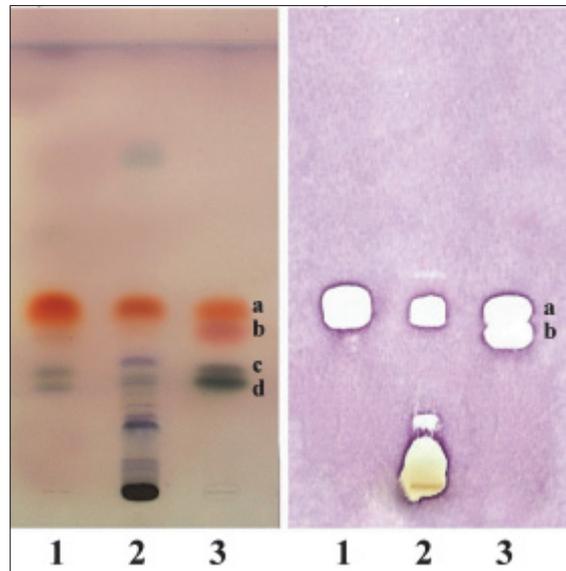


Figure 30 : Bioautogramme du test au *Bacillus subtilis* utilisant la coloration au MTT : à gauche, la plaque révélée à l'anisaldéhyde/acide sulfurique ; à droite, le bioautogramme [60]

3.1.2 Les tests antibactériens par luminescence

3.1.2.1 La bactérie *Aliivibrio fischeri* [61]

La bactérie *Aliivibrio fischeri* est une bactérie marine Gram -, flagellée et non-pathogène. Elle se retrouve naturellement en région subtropicale où elle existe à l'état libre dans le plancton, mais également dans des organes spécifiques (photophores) de certains céphalopodes et poissons où elle vit en symbiose (Figure 31). C'est une bactérie naturellement bioluminescente.

La bioluminescence est un type de chemiluminescence effectuée par catalyse enzymatique.

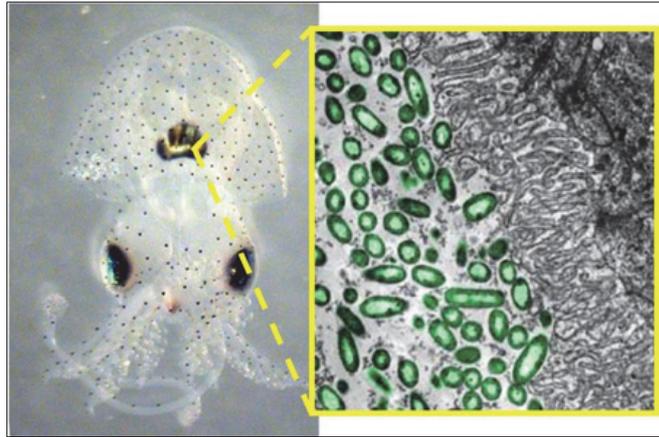


Figure 31 : '*Aliivibrio fischeri*' dans le photophore d'*Euprymna scolopes*' [62]

3.1.2.2 Mécanismes de bioluminescence

La bioluminescence émise par *Aliivibrio fischeri* provient d'une cascade de réactions chimiques opérées par plusieurs enzymes dont une luciférase qui est un hétérodimère (Lux AB) qui est le lieu de production de lumière par oxydation du FMNH₂ (flavine mononucléotide)

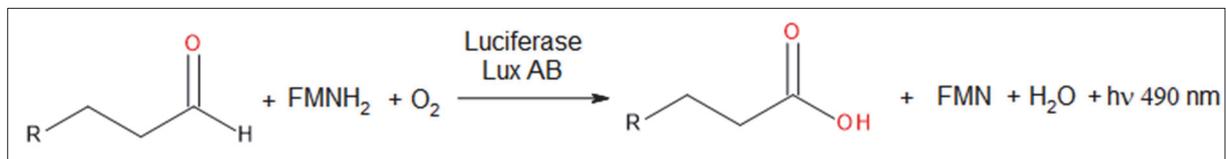


Figure 32 : Réaction de bioluminescence [63]

La réaction de bioluminescence par *Aliivibrio fischeri* ne se produit que lorsqu'une certaine concentration en bactérie est atteinte. C'est le phénomène de « quorum sensing ». En effet, l'augmentation de la densité en bactéries va produire un phénomène d'autoinduction activant la traduction et la transcription des gènes nécessaires à la production des enzymes responsables de la réaction de bioluminescence [64]. C'est pour cela que, lors de la phase de culture des bactéries précédant le test biologique, il faut atteindre une certaine concentration pour que la luminescence se produise. Aussi, la vérification en chambre noire en agitant l'erlenmeyer de culture est nécessaire avant le test.

Dans l'exemple ci-dessous [60] (Figure 33), les mêmes plaques que pour l'exemple du test antimicrobien à *Bacillus subtilis* utilisant le MTT (3.1.1) ont été faites et l'une d'elles a été immergée dans une suspension d'*Aliivibrio fischeri* et directement déposée dans un

Bioluminizer. Les zones actives sont représentées sur le bioautogramme par les zones noires où les bactéries sont mortes sur un fond luminescent. Cet exemple a permis de visualiser l'effet antibactérien du thymol, du carvacrol et du linalol.

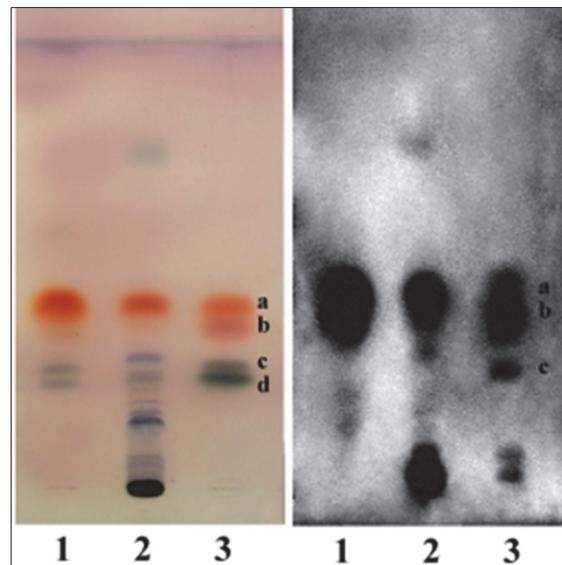


Figure 33 : Bioautogramme du test bioluminescent à *Aliivibrio fischeri* : à gauche, la plaque révélée à l'anisaldéhyde/acide sulfurique ; à droite, le bioautogramme [60]

3.2 Les tests antifongiques

Les tests antifongiques sont également très nombreux dans la bibliographie sur la bioautographie. La grande majorité utilise la bioautographie d'immersion car les temps de pousse des champignons sur la plaque sont assez longs (sauf pour les levures pour lesquelles la bioautographie directe peut être envisagée).

Comme pour les bactéries, la manipulation de champignons pathogènes doit être effectuée dans un laboratoire approprié. Le MTT est également utilisé pour la révélation de la plaque. C'est ainsi que sur la Figure 34, le bioautogramme montre des zones blanches où les composés antifongiques contenus dans les extraits de *Swartzia madagascariensis* Desv. actifs contre *Candida albicans* ont tué le champignon. Le fond foncé correspond à la zone où les champignons vivants ont fait réagir le MTT (ces zones sont grises car la photo a été prise en noir et blanc).

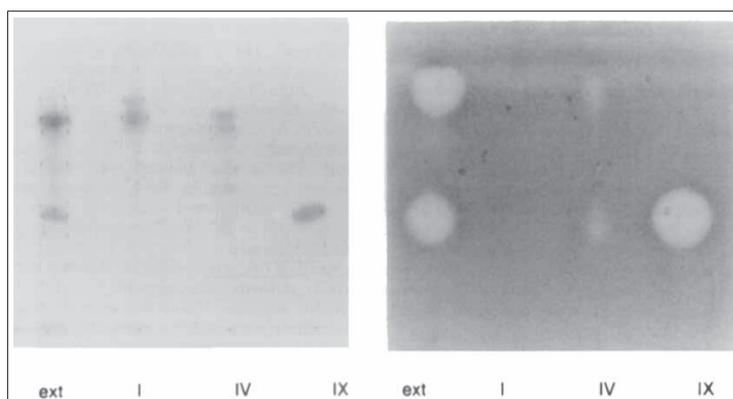


Figure 34 : Bioautogramme d'un test antifongique par bioautographie par immersion d'extraits de 'Swartzia madagascariensis' Desv. A gauche : plaque révélée au réactif de Godin (vanilline / acide perchlorique) et à droite bioautogramme à 'Candida albicans'.

3.3 Les tests antioxydants

La bioautographie directe peut également être utilisée pour déterminer le pouvoir antioxydant des molécules contenues dans un extrait de plante.

Le test le plus utilisé est le test au DPPH· (radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (Figure 35). Celui-ci fut effectué pour la première fois en 1967. Ce test crible la présence de piègeurs de radicaux libres. La plaque développée est immergée dans la solution de DPPH· de couleur violette. L'arrière-plan reste violet alors que la présence d'antioxydants est montrée par des tâches jaunes.

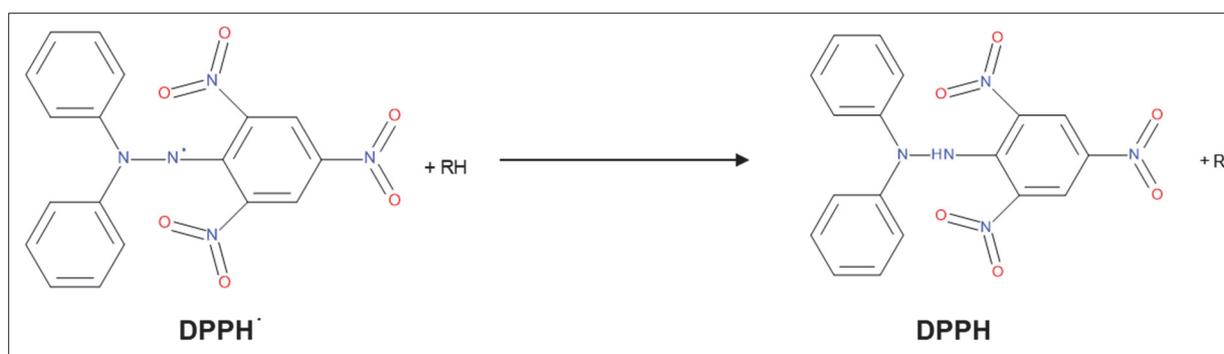


Figure 35 : Réduction du DPPH

Plusieurs autres tests antioxydants sont disponibles comme le test ABTS·⁺. L'activité antioxydante peut également être évaluée par le test du blanchiment du β carotène. Après immersion de la plaque dans la solution de β carotène, la plaque est exposée à la lumière. Les zones correspondant à des composés antioxydants resteront orange.

3.4 Les tests enzymatiques

De nombreux tests de recherche d'inhibiteurs enzymatiques ont été développés en HPTLC-Bioautographie. Parmi eux, une majorité utilise des enzymes de type estérase et tous utilisent la technique de bioautographie directe. Les plus communs emploient l'acétyl- (ou butyryl-) cholinestérase, les glucosidases, la xanthine oxydase, la lipase pancréatique ou la tyrosinase. Seuls les tests utilisés dans le criblage des espèces du genre *Pittosporum* dans le cadre de cette thèse seront développés (test à l'acétylcholinestérase, à l' α -glucosidase, à la lipase pancréatique et à la tyrosinase).

3.4.1 Le test à l'acétylcholinestérase (AChE)

L'acétylcholinestérase est un enzyme dont les inhibiteurs sont utilisés sans le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer.

3.4.1.1 La maladie d'Alzheimer [65]:

Brièvement, la maladie d'Alzheimer est une maladie dégénérative des neurones. Elle débute en général après 65 ans et se manifeste par des pertes de mémoire et des troubles cognitifs généraux. Le malade devient de plus en plus dépendant. On estime à 900 000 le nombre de personnes atteintes par cette pathologie en France.

Les causes de la maladie ne sont pas encore clairement identifiées, mais deux types de lésions cérébrales caractéristiques apparaissent chez le patient : les dépôts amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires. C'est l'accumulation au fil des années de la protéine β amyloïde qui est naturellement présente dans le cerveau qui forme les dépôts amyloïdes et qui conduit à une toxicité sur les cellules nerveuses en induisant la phosphorylation de la protéine Tau, protéine structurale des neurones et conduisant à une dégénérescence de celui-ci appelée dégénérescence neurofibrillaire menant à la mort du neurone.

Les symptômes de la maladie d'Alzheimer sont liés à cette mort neuronale. Les plus fréquents sont les troubles de la mémoire. Les troubles des fonctions exécutives ainsi que les problèmes d'orientation dans le temps et dans l'espace sont également évocateurs de cette pathologie. Les troubles du langage ou de la vision élaborée sont plus rares au début de la maladie. La progression de la pathologie va amener des troubles progressifs du mouvement, du sommeil, du comportement, du langage oral et écrit, ainsi que de l'humeur.

Une prise en charge adaptée et précoce de la maladie pourra ralentir sa progression, améliorer la qualité de vie du patient et de son entourage mais malheureusement, aujourd'hui, la maladie d'Alzheimer ne se guérit pas.

3.4.1.2 Les traitements : les anticholinestériques

L'une des facettes de la prise en charge, outre l'amélioration de l'hygiène de vie et les activités stimulantes, est la prise en charge médicamenteuse notamment par des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE).

L'atrophie cérébrale due à la maladie induit une baisse de la concentration en acétylcholine (ACh), neurotransmetteur impliqué dans la conduction du signal neurologique au niveau de la synapse entre deux neurones.

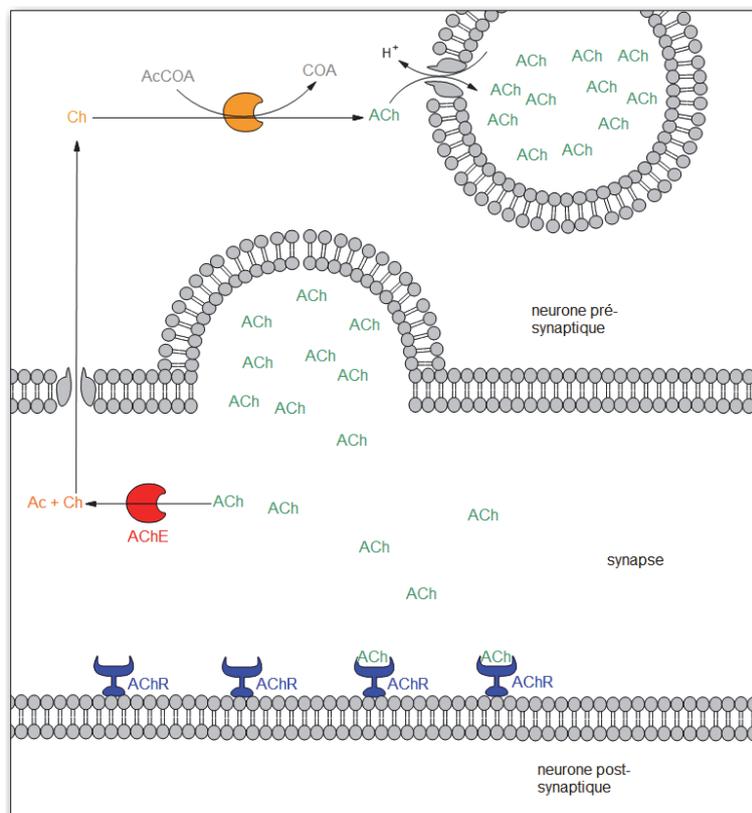


Figure 36: L'ACh dans la jonction synaptique

Celle-ci est hydrolysée par une enzyme présente dans la jonction synaptique, l'AChE (Figure 36), et dont l'activité est augmentée dans la maladie d'Alzheimer. La butyrylcholinestérase (BuChE) est une enzyme très proche de l'AChE et est également impliquée dans la transmission neuronale par l'ACh.

La principale classe thérapeutique utilisée dans le traitement des symptômes de la maladie d'Alzheimer sont les inhibiteurs de l'AChE [66], afin de garder une concentration suffisante en ACh au niveau de la synapse. Les principales molécules utilisées sont le donépézil (Figure 38) (ARICEPT), la rivastigmine (EXELON) et la galantamine (REMINYL). Parmi cette classe, les deux derniers sont d'origine naturelle.

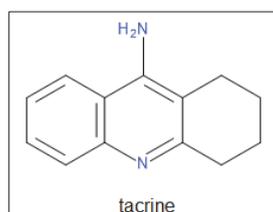


Figure 37 : tacrine

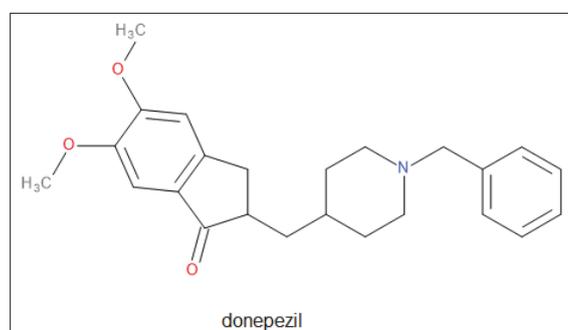


Figure 38 : donepezil

La tacrine (Figure 37) (COGNEX) et le donépézil sont de provenance synthétique. La tacrine n'est plus commercialisée car sa balance bénéfice/risque a été reconnue négative notamment car elle présente une forte hépatotoxicité.

La rivastigmine (Figure 40) quant à elle est un dérivé hémisynthétique provenant d'un alcaloïde naturel, la physostigmine (Figure 39) extraite de la graine de la fève de Calabar, *Physostigma venenosum* Balf. (*Fabaceae*).

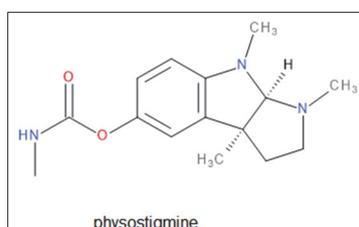


Figure 39 : physostigmine

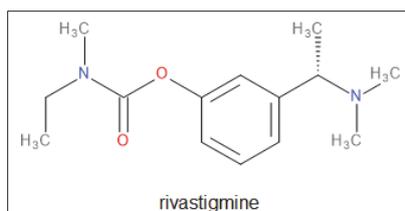


Figure 40 : rivastigmine

La galantamine (Figure 41) est également un alcaloïde naturel isolé du perce-neige *Galanthus nivalis* L. en 1947. Son action anticholinestérasique fut démontrée en 1960 mais ce n'est qu'après l'acceptation par la communauté scientifique de la théorie cholinergique dans la maladie d'Alzheimer ainsi que la réussite de sa synthèse totale afin d'en baisser les coûts de production face aux molécules de synthèse (tacrine et donépézil) qu'elle fut utilisée. Son autorisation de mise sur le marché date de 2000 sous le nom de REMINYL [67].

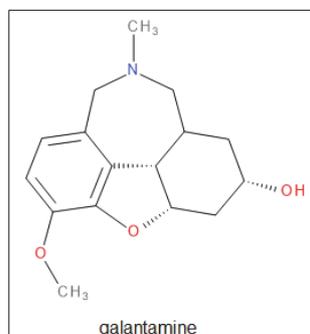


Figure 41 : galantamine

Une autre molécule commercialisée, l'huperzine A (Figure 42), est un inhibiteur naturel de l'acétylcholinestérase. C'est un alcaloïde sesquiterpénique présent dans *Huperzia serrata* (Thunb. Ex Murray) Trevis (*Lycopodiaceae*). Les extraits d'*Huperzia* sont vendus en tant que complément alimentaire.

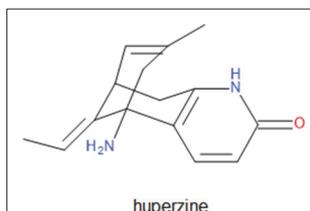


Figure 42 : huperzine

3.4.1.3 Test bioautographique à l'acétylcholinestérase

Le test bioautographique à l'acétylcholinestérase utilise comme réactif l' α -naphthyl acétate qui est décomposé par l'acétylcholinestérase en 2-naphthol et en acide acétique. Deux molécules de

2-naphtol se condensent avec le Fast blue B salt pour donner un colorant azo de couleur violette (Figure 43). Le fond de la plaque et les molécules ayant aucune activité anticholinestérasique sont donc colorés en violet alors que les molécules ayant une activité anticholinestérasique vont bloquer la réaction de l'enzyme avec l' α -naphthyl acétate et le colorant violet ne sera pas produit. Une zone blanche va donc apparaître sur le bioautogramme.

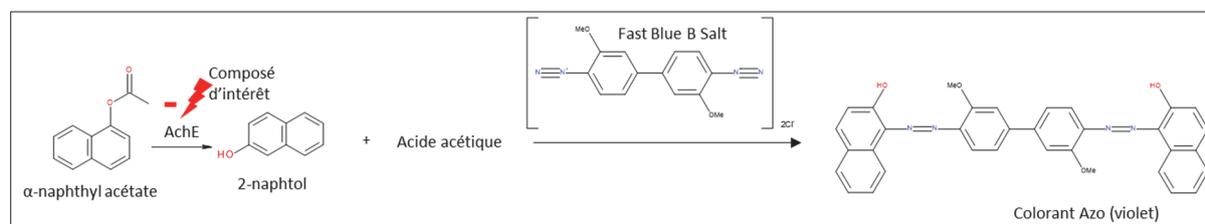


Figure 43 : Réaction entrant en jeu lors du test bioautographique à l'acétylcholinestérase

Dans l'exemple ci-dessous (Figure 44) [38], deux standards de molécules connues comme anticholinestérasiques et utilisées comme médicament (la galantamine et la physostigmine) ont été appliqués sur des plaques de silice à différentes concentrations (0.0001 μg à 1 μg pour la galantamine et 0.00001 μg à 1 μg pour la physostigmine) et développés à l'aide de la phase mobile $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/35/5 ; v/v/v). Les plaques ont ensuite été pulvérisées à l'aide de la solution enzymatique puis placées dans un incubateur à 37°C pendant 20 min. A l'issue de ce temps d'incubation une solution d' α -naphthyl acétate et de bleu solide B a été pulvérisée sur la plaque et la coloration est arrivée en quelques minutes (ici la photo a été prise en noir et blanc donc les zones grises correspondent aux zones normalement violettes). Les zones restées blanches sur le bioautogramme correspondent aux molécules actives. On peut donc noter que la galantamine est active à partir d'une certaine concentration (ici la tâche d'activité est visible à partir de 0.01 μg déposés sur la plaque). Il en est de même pour la physostigmine (tâche d'activité visible à partir de 0.001 μg déposés sur la plaque).

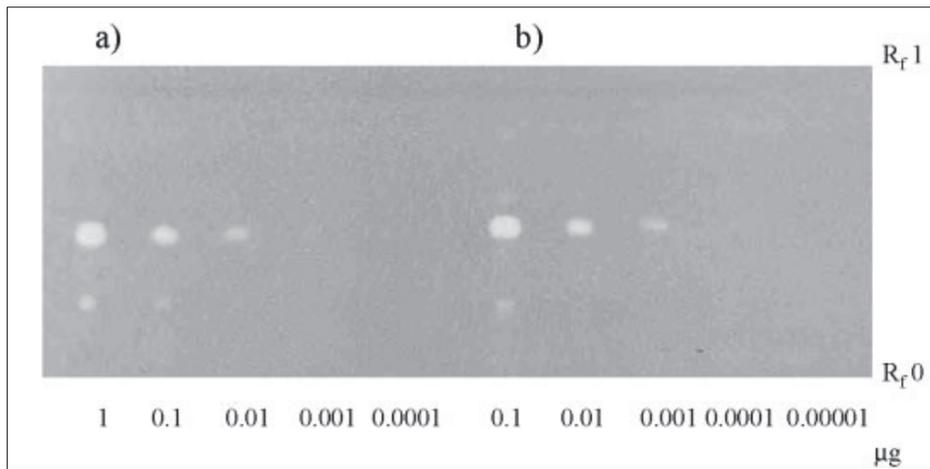


Figure 44 : Bioautogramme du test à l'acétylcholinestérase de la galantamine (a) et de la physostigmine (b) déposées à différentes concentrations. photo de la plaque en noir et blanc [38]

3.4.2 Le test à la lipase pancréatique

3.4.2.1 La lipase pancréatique : biochimie et inhibiteurs

La lipase pancréatique est une enzyme présente dans le duodénum et dont l'activité consiste en la digestion des lipides. En effet, la lipase pancréatique digère les triglycérides en coupant la liaison en 1 et en 3 du glycérol en libérant deux acides gras et un monoacylglycérol (Figure 45).

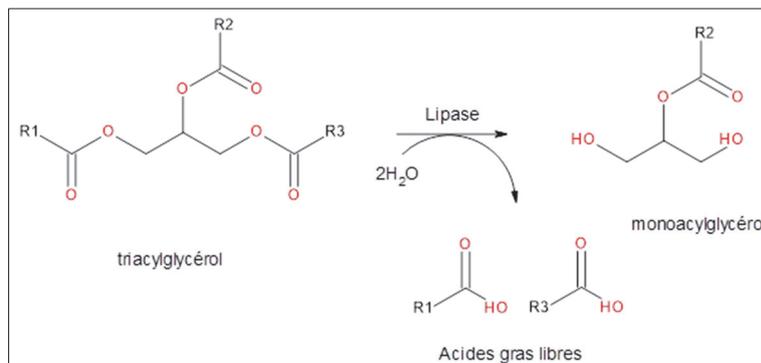


Figure 45 : Action de la lipase pancréatique

L'inhibition de cet enzyme va conduire à une baisse de l'absorption intestinale des graisses alimentaires et donc une baisse des apports caloriques.

3.4.2.2 L'obésité :

« L'obésité correspond à un excès de masse grasse et à une modification du tissu adipeux, entraînant des inconvénients pour la santé et pouvant réduire l'espérance de vie. Ses causes sont

complexes. Elle résulte de l'intrication de plusieurs facteurs – alimentaires, génétiques épigénétiques et environnementaux – impliqués dans le développement et la progression de cette maladie chronique. » [68] Aujourd'hui, l'obésité concerne 17 % des adultes en France et 13 % dans le monde. Les complications liées à cette maladie sont nombreuses, variées et graves : diabète de type 2, maladies cardio-vasculaires (hypertension artérielle, athérosclérose), maladies hépatiques (stéatohépatite non-alcoolique), dislipidémies, maladies rénales, cancers (notamment du sein, de l'utérus et du foie), maladies respiratoires (apnée du sommeil, hypoventilation), maladies articulaires (arthrose), troubles hormonaux (troubles du cycle menstruel chez la femme), maladies dermatologiques... etc. [68].

Le seul traitement médicamenteux existant aujourd'hui (d'autres molécules ont été retirées du marché) est un inhibiteur de lipase : l'orlistat (XENICAL)

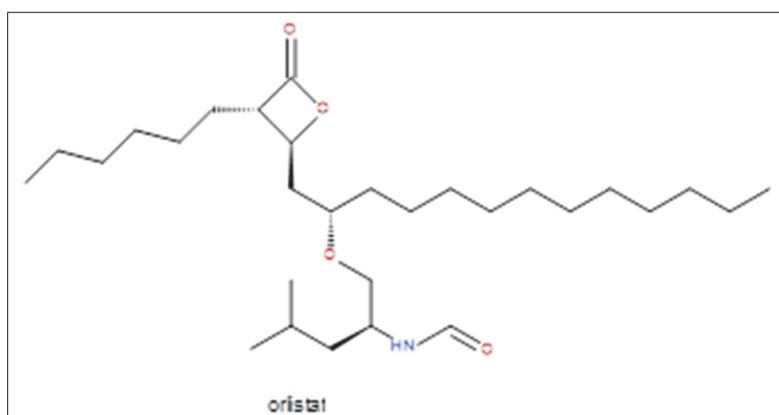


Figure 46 : orlistat

Le médicament va agir en formant une liaison covalente avec le site sérine actif des lipases gastriques et pancréatiques. Ce médicament est soumis à prescription médicale et possède de nombreux effets indésirables tels que des selles liquides et grasses, flatulences avec suintements (effets directement liés à la non-digestion des graisses), mais aussi des atteintes hépatiques graves pouvant mener à la transplantation hépatique ou au décès du patient.

Ces effets indésirables mènent à la recherche de nouvelles molécules inhibant les lipases.

3.4.2.3 Test bioautographique à la lipase pancréatique

La lipase pancréatique appartient à la famille des estérases comme l'acétylcholinestérase. Le principe du test sera donc le même et mettra en jeu les mêmes réactifs et les mêmes produits (Figure 47) : l' α -naphthyl acétate est décomposé par la lipase en acide acétique et 2-naphtol qui réagit avec le Fast blue B salt pour donner le colorant violet azo présent sur le fond de plaque

et sur les molécules n'inhibant pas l'action de la lipase pancréatique. Sur les zones où la lipase est inhibée par une molécule active, l' α -naphthyl acétate n'est pas décomposé par l'enzyme et le colorant n'est pas formé, ce qui se traduit par une zone blanche.

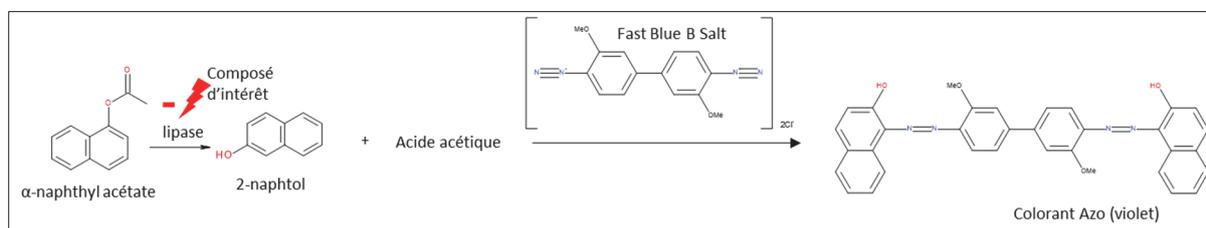


Figure 47 : Réaction entrant en jeu lors du test bioautographique à la lipase pancréatique

Dans l'exemple ci-dessous [19], plusieurs concentrations d'orlistat (piste 1 : 5 μ g, piste 2 : 3,75 μ g, piste 3 : 2,5 μ g, et piste 4 : 1,25 μ g) ont été déposées sur une plaque de silice et la plaque a été développée à l'aide de la phase mobile hexane / AcOEt (75/30 ; v/v). Le protocole du test a ensuite été suivi en pulvérisant une solution d' α -naphthyl acétate et une solution d'enzyme sur la plaque. Après 20 min d'incubation à 37°C, une solution de Fast blue B salt a été également pulvérisée sur la plaque faisant apparaître les zones d'inhibition enzymatique en blanc sur un fond violet dû au colorant diazonium. Ici, la molécule de référence dans l'inhibition de la lipase pancréatique a été utilisée comme témoin positif pour vérifier le fonctionnement du test. On remarque donc les tâches blanches correspondant bien à l'inhibition de la lipase pancréatique par l'orlistat. Cette inhibition se produit même pour de faibles quantités déposées. En effet, sur la piste 5 une zone d'inhibition est visible alors que la quantité d'orlistat déposée est de 1,25 μ g.

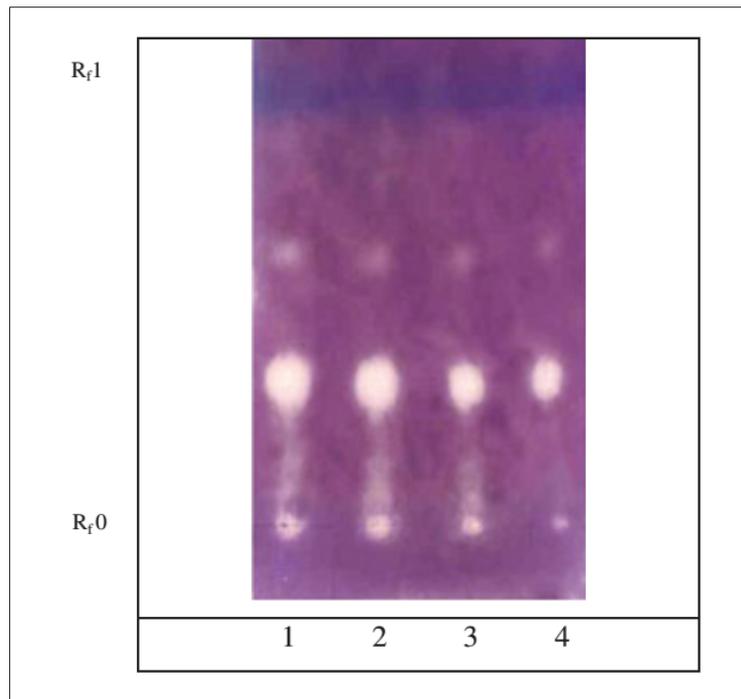


Figure 48 : Bioautogramme du test à la lipase pancréatique sur l'orlistat. Plusieurs concentrations d'orlistat ont été déposées (1 : 5 μ g, 2 : 3,75 μ g, 3 : 2,5 μ g, 4 : 1,25 μ g) [19]

3.4.3 Test à l' α -glucosidase

L' α -glucosidase est une enzyme de digestion des sucres. Son inhibition entrera en jeu dans une des stratégies de traitement du diabète de type 2.

3.4.3.1 Le diabète de type 2 (non-insulino dépendant)

Le diabète se définit par une hyperglycémie chronique. A deux reprises elle sera supérieure à 1,26 g/L à jeun ou supérieure à 2 g/L à n'importe quelle heure de la journée. On compte en France 2 millions de diabétiques. C'est une maladie entraînant un problème de santé publique majeur. En effet, on estime à 100 millions le nombre de diabétiques à travers le monde. Le diabète de type 2 survient en général après 50 ans et représente 95 % des diabètes. On compte en France 2 millions de diabétiques. La prévalence de celui-ci est en constante augmentation et elle augmente en parallèle avec le vieillissement, la sédentarisation et l'obésité croissante dans les pays développés. Les pays sous-développés ne sont pas non plus épargnés car ceux-ci opèrent une modification rapide du mode de vie de leurs habitants.

Le diabète de type 2 provient de deux causes pathologiques : l'insulinorésistance et l'insulinodéficience.

L'insulinodéficience est responsable de l'hyperglycémie et résulte de 10 à 20 ans d'hyperinsulinisme provenant de l'insulinorésistance des tissus périphériques notamment du muscle.

L'insulinorésistance est souvent couplée à un terrain génétique défavorable (1 ou 2 des parents atteints de diabète de type 2). Elle est secondaire à un excès de stockage de graisse dans les muscles et le tissu adipeux viscéral. Dans le muscle s'installe une compétition entre acides gras libres et glucose pour la production d'énergie. Les acides gras sont utilisés en priorité donc l'utilisation du glucose est diminuée ce qui tend à augmenter la glycémie.

L'insulinorésistance provient de différents facteurs de risque : l'obésité, la répartition abdominale, sous-cutanée ou viscérale des graisses, la sédentarité, l'âge, l'hypertension artérielle, l'augmentation des triglycérides et la baisse du HDL-cholestérol.

Le diabète de type 2 entraîne des complications graves et multiples : Il peut être à l'origine d'AVC, d'infarctus du myocarde ainsi que d'artérites des membres inférieurs en accélérant l'athérosclérose, mais également de rétinopathies (pouvant mener à la cécité), de neuropathies périphériques, de maladies hépatiques, de néphropathies et de problèmes de cicatrisation par altération de la microcirculation sanguine [69].

3.4.3.2 Les traitements du diabète de type 2

Le premier traitement prescrit lors de la survenue d'un diabète de type 2 sont les mesures hygiéno-diététiques. Le patient devra avoir une activité physique régulière, avoir une alimentation équilibrée et perdre du poids. Si les efforts du patient ne suffisent pas à réguler sa glycémie, il se verra prescrire des antidiabétiques oraux, dont la metformine, un biguanide qui sera prescrit en première intention [69].

La famille donnée en première intention est la famille des biguanides. Une seule molécule est commercialisée de nos jours : la metformine (GLUCOPHAGE et STAGID)

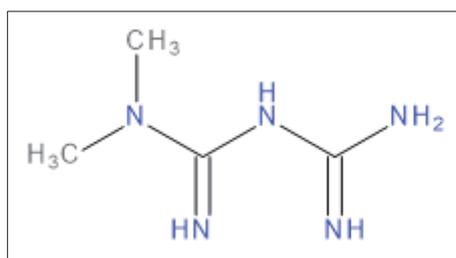


Figure 49 : metformine

La metformine n'a pas d'action sur la sécrétion d'insuline. Elle augmente la sensibilité hépatique à celle-ci et bloque également la néoglucogénèse.

D'autres familles d'antidiabétiques oraux stimulent la production d'insuline comme les suflamides hypoglycémiantes (glibenclamide (DAONIL), gliclazide (DIAMICRON), glimépiride (AMAREL), glipizide (GLIBENESE)) et les glinides (repaglinide (NOVONORM)).

Les inhibiteurs de la DPP4 agissent sur les hormones responsables de la libération d'insuline (les incrétines) et finalement les inhibiteurs de l' α -glucosidase réduisent l'absorption de sucre (acarbose (GLUCOR)).

3.4.3.3 Test bioautographique à l' α -glucosidase

L' α -glucosidase va utiliser comme substrat le 2-naphthyl- α -D-glucopyranoside qu'elle décompose en 2-naphtol et en α -D-glucopyranoside. Par la suite, comme dans les tests enzymatiques précédents, le deux 2-naphtol se condensent avec une molécule de Fast blue B salt pour donner le colorant azo de couleur violette (Figure 50). Là où une molécule inhibe l'action de l' α -glucosidase, la réaction ne se fait pas et le 2-naphthyl- α -D-glucopyranoside n'est pas consommé, produisant sur la plaque une zone blanche sans colorant diazonium.

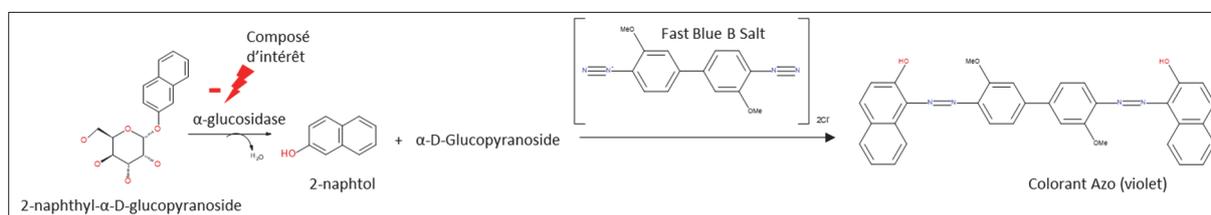


Figure 50 : Réaction entrant en jeu lors du test bioautographique à l' α -glucosidase

Dans l'exemple ci-dessous [70], des inhibiteurs de l' α -glucosidase ont été recherchés dans l'épée *Justicia secunda* Vahl de la famille des *Acanthaceae*. Des extraits aqueux et méthanoliques ainsi que des fractions aqueuses ont été réalisés puis ceux-ci ont été appliqués sur une plaque HPTLC, développés et soumis au test bioautographique à l' α -glucosidase. Les résultats ci-dessous (Figure 51) montrent la présence d'un composé actif inhibiteurs de l' α -glucosidase. La récupération des tâches sur la plaque et leur analyse en spectrométrie de masse ont permis d'identifier le composé actif.

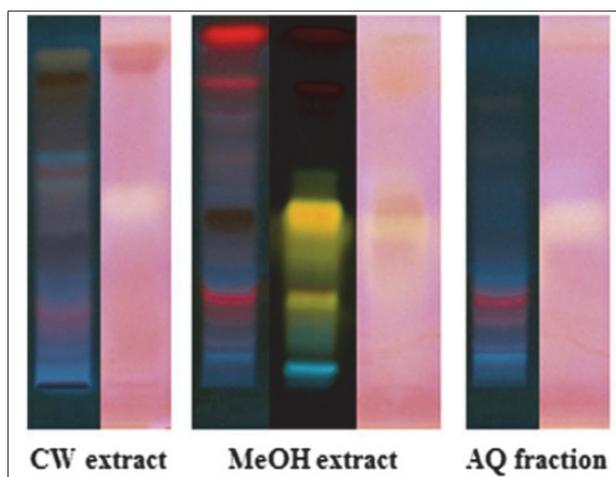


Figure 51 : Bioautogramme de différents extraits de *'Justicia secunda'* Vahl (Crude Water CW et méthanol) ainsi qu'une fraction aqueuse à α -glucosidase (à droite) et révélés à 366 nm (à gauche) développés avec une phase mobile $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (60/40/10 ; v/v/v) [70]

3.4.4 Test à la Tyrosinase

3.4.4.1 L'enzyme tyrosinase [71]

La tyrosinase est l'enzyme principale de la mélanogénèse chez les mammifères. Elle produit donc les précurseurs de la mélanine, responsable de la pigmentation de la peau, des cheveux et des yeux chez l'homme. La pigmentation de la peau joue un rôle primordial dans la protection du corps contre les rayonnements UV. Les problèmes de pigmentation peuvent représenter pour les personnes qui en sont atteintes de sérieux problèmes esthétiques. Une augmentation de la production de mélanine peut être à l'origine de plusieurs désordres dermatologiques comme l'*Acanthosis nigricans*, les lentigines, l'hyperpigmentation périorbitale, le mélasma, le poikiloderme cervical, et des risques de cancer de la peau. L'action des inhibiteurs de tyrosinase va donc permettre de traiter les problèmes d'hyperpigmentation. Ils sont notamment présents dans des produits cosmétiques comme les crèmes blanchissantes. La recherche d'inhibiteurs de tyrosinase pour un usage topique est un grand classique des tests biologiques.

3.4.4.2 Test bioautographique à la tyrosinase

Lors de ce test bioautographique, la plaque développée est recouverte de solution enzymatique puis de la L-tyrosine est pulvérisée. L'oxydation de la L-tyrosine produit un composé brun-gris alors que la présence d'inhibiteurs de tyrosinase se visualise par l'apparition de tâches restées blanches sur le bioautogramme.

L'exemple ci-dessous [72] nous montre le bioautogramme de l'acide kojique, substance de référence pour les inhibiteurs de tyrosinase qui a été déposé et développé afin de fournir un

contrôle positif pour ce test (Figure 52). L'acide kojique produit une tâche d'activité blanche sur le fond gris-brun.



Figure 52 : Contrôle positif du test à la tyrosinase avec l'acide kojique [72]

4 Purification et caractérisation des composés actifs

La dernière étape du processus bioautographique est la purification et l'identification des composés ayant montré une activité sur le test. Classiquement, lors de la conduite de tests en microplaques de 96 puits, la technique du fractionnement bioguidé successif mène après de très nombreuses étapes à une molécule pure or cette technique est extrêmement chronophage. L'HPTLC va permettre de venir désorber la molécule active pure directement de la plaque et de l'analyser très rapidement. Ceci peut s'effectuer de plusieurs manières.

4.1 Récupération directe

La première méthode consiste à gratter la couche de silice contenant la molécule active, de la récupérer et de désorber la molécule dans du solvant et filtrer afin d'éliminer la silice. La solution obtenue peut en suite être analysée en HPLC-MS ou en RMN.

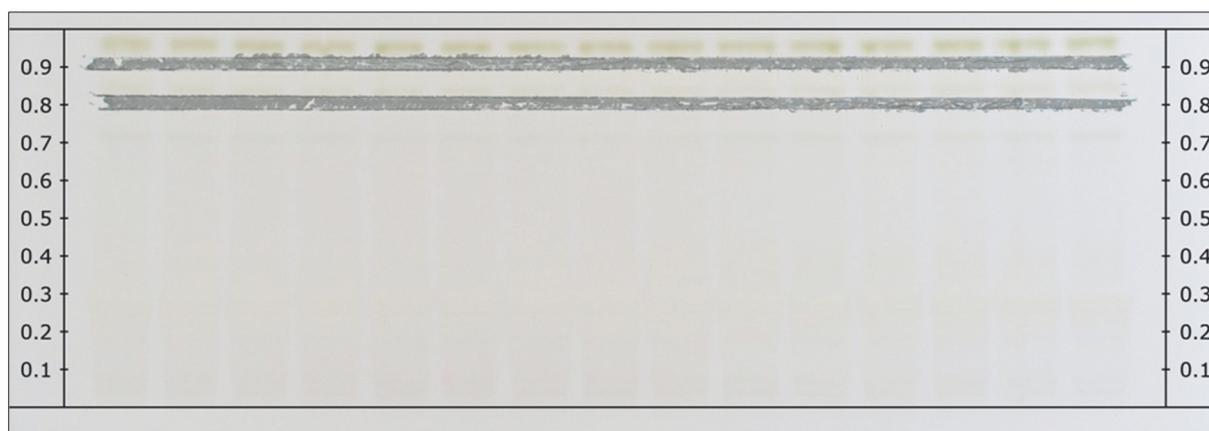


Figure 53 : Exemple de plaque de silice comportant 15 dépôts du même extrait à 10µl/dépôt et développée dont la silice ainsi que les molécules actives ont été récupérées à deux endroits

L'avantage de cette technique est la facilité de mise en œuvre. En effet une simple spatule permet de gratter la silice et aucun appareillage n'est nécessaire. L'inconvénient est la très faible quantité de molécule contenue dans la fine couche de gel de silice sur des plaques de grade analytique. Le nombre de pistes déposées devra donc être important afin de récupérer une solution assez concentrée pour dépasser le seuil de détection de l'HPLC-MS. Pour augmenter la quantité d'analytes dans la plaque de silice, des plaques d'HPTLC préparative pourront être utilisées.

4.2 L'HPTLC couplée au spectromètre de masse

Deux types de couplages de l'HPTLC avec un spectromètre de masse sont possibles : les couplages dits « AMS » (Ambient Mass Spectrometry) dont la méthode DART et le couplage direct HPTLC-MS via une interface [72].

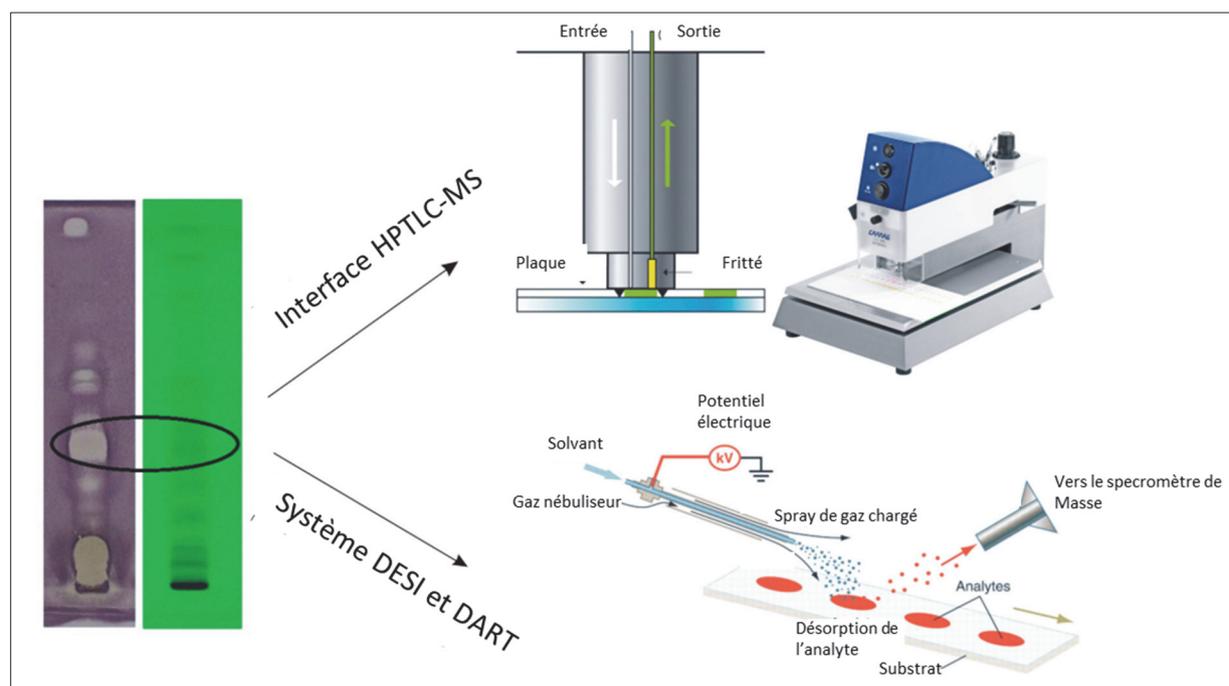


Figure 54 : Couplages de l'HPTLC avec la spectrométrie de masse [60]

4.2.1 Les techniques AMS (Ambient Mass Spectrometry)

Ce sont des techniques assez appropriées au couplage HPTLC car elles sont praticables à la pression et la température du laboratoire. On citera parmi celles-ci la technique de DART-MS (Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry) dans laquelle la piste HPTLC développée est placée directement sous le spray de gaz excité d'un spectromètre de masse à temps de vol. Le spray va désorber les analytes qui vont se diriger dans le spectromètre de masse (Figure 54).

Le principal inconvénient des techniques AMS couplées à l'HPTLC est le détachement de particules de gel de silice de la phase stationnaire durant l'analyse. Celles-ci entrent dans le spectromètre de masse et peuvent l'endommager au fil du temps.

4.2.2 Couplage HPTLC-MS via une interface

L'interface MS est un instrument permettant de désorber les molécules d'intérêt de la plaque afin de les envoyer dans un spectromètre de Masse standard pour analyse. Pour cela, une bouche hermétique va venir au contact de la plaque sur la zone de présence de la molécule active. Du solvant d'extraction va alors passer dans la cavité formée et va venir désorber la molécule. Le solvant chargé en molécule va passer à travers un fritté afin d'enlever toute trace de silice et va remonter jusque dans le spectromètre de masse.

Les deux techniques présentées ci-dessus sont bien adaptées à l'analyse de molécules en HPTLC-MS or pour avoir un signal suffisant en spectrométrie de masse pour pouvoir identifier la molécule, L'analyte devra être présent en quantité non négligeable.

Conclusion générale

La bioautographie donne une très bonne alternative de nos jours aux tests d'activités biologiques classiques. Celle-ci est notamment très performante dans le criblage de mélanges complexes tels que les extraits végétaux car l'étape de chromatographie précédant le test biologique permet de séparer les molécules de l'extrait et de les cribler une par une.

Les étapes de fractionnement bioguidé chronophages et coûteuses, présentes dans les techniques de criblage classiques, sont évitées.

Les effets antagonistes de certaines molécules entre elles dans le mélange sont éliminés. Cependant, les effets de synergie d'activité entre plusieurs molécules ne sont pas visibles.

Cette technique est donc très efficace dans le but de produire une molécule pure et active à partir d'une plante.

Cette technique est en pleine expansion et le nombre de tests développés (notamment pour les tests enzymatiques) est encore peu important. Il a tendance à augmenter ces dernières années et va continuer de croître dans les années à venir.

Certains aspects de cette technique sont encore à parfaire, notamment la phase d'identification des molécules actives qui reste encore trop aléatoire par manque de sensibilités des appareils présents actuellement sur le marché.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit 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, de respecter le secret professionnel.*
- *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 couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Bibliographie

- [1] J.-B. Albertini, *Le vieillissement de la population et ses enjeux*, 2017.
- [2] B. Meier, D. Spriano, *Modern HPTLC - A perfect tool for quality control of herbals and their preparations*, *J. AOAC Int.* 93 (2010) 1399–1409. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.5.1399>.
- [3] E. Reich, A. Schibli, *High-performance Thin-layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*, Thieme, 2007. <https://doi.org/1588904091>.
- [4] CAMAG® smartCut | CAMAG, (n.d.). <https://www.camag.com/product/camag-smartcut> (accessed November 1, 2020).
- [5] S. Nyiredy, C.A.J. Erdelmeier, B. Meier, O. Sticher, “Prisma”: Ein Modell Zur Optimierung Der Mobilen Phase Fur Die Dunnschichtchromatographie, *Vorgestellt Anhand Verschiedener Naturstofftrennungen*, *Planta Med.* NO. 3 (1985) 241–246. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969468>.
- [6] How do analytical methods work?, (2011). How do analytical methods work? (TLC, UV-Vis Spectrophotometry, GC ...%0Ahttps://www.dmt-nexus.me/forum/FileProxy.ashx?src=http://www.pitt.edu/~ceder/apparatus/tlc_spotting.jpg.
- [7] CAMAG, CAMAG Automatic TLC Sampler 4, (2016). <https://www.youtube.com/watch?v=lpu3vWkuQoE>.
- [8] CAMAG® Automatic Developing Chamber 2 (ADC 2) | CAMAG, (n.d.). <https://www.camag.com/product/camag-automatic-developing-chamber-2-adc-2> (accessed April 12, 2020).
- [9] CAMAG® Horizontal Developing Chamber | CAMAG, (n.d.). <https://www.camag.com/product/camag-horizontal-developing-chamber> (accessed April 12, 2020).
- [10] CAMAG® AMD 2 System Automated Multiple Development | CAMAG, (n.d.). <https://www.camag.com/product/camag-amd-2-system-automated-multiple-development> (accessed April 12, 2020).
- [11] Ł. Cieśla, M. Waksmundzka-Hajnos, *Two-dimensional thin-layer chromatography in the*

- analysis of secondary plant metabolites, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 1035–1052. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.057>.
- [12] CAMAG® TLC Sprayer | CAMAG, (n.d.). <https://www.camag.com/product/camag-tlc-sprayer> (accessed April 15, 2020).
- [13] TLC Derivatization | Merck, (n.d.). <https://www.merckmillipore.com/FR/fr/analytics-sample-preparation/learning-center-thin-layer-chromatography/tlc-process/tlc-derivatization/WQib.qB.spcAAAFVCJIDx07d,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F> (accessed April 15, 2020).
- [14] CAMAG® Derivatizer | CAMAG, (n.d.). <https://www.camag.com/product/camag-derivatizer> (accessed April 15, 2020).
- [15] CAMAG® Chromatogram Immersion Device 3 | CAMAG, (n.d.). <https://www.camag.com/product/camag-chromatogram-immersion-device-3> (accessed April 15, 2020).
- [16] W. Andlauer, P. Prunier, D. Prim, Fluorometric Method to Assess Lipase Inhibition Activity, *Chim. Int. J. Chem.* 63 (2009) 897–899. <https://doi.org/10.2533/chimia.2009.897>.
- [17] N. Bitou, M. Ninomiya, T. Tsujita, H. Okuda, Screening of lipase inhibitors from marine algae, *Lipids.* 34 (1999) 441–445. <https://doi.org/10.1007/s11745-999-0383-7>.
- [18] K. Kawaguchi, T. Mizuno, K. Aida, K. Uchino, Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61 (1997) 102–104. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.102>.
- [19] A.M.S. Hassan, TLC bioautographic method for detecting lipase inhibitors, *Phytochem. Anal.* 23 (2012) 405–407. <https://doi.org/10.1002/pca.1372>.
- [20] J. Tang, J. Zhou, Q. Tang, T. Wu, Z. Cheng, A new TLC bioautographic assay for qualitative and quantitative estimation of lipase inhibitors, *Phytochem. Anal.* 27 (2016) 5–12. <https://doi.org/10.1002/pca.2581>.
- [21] J.H. Kim, H.J. Kim, H.W. Park, S.H. Youn, D.Y. Choi, C.S. Shin, Development of inhibitors against lipase and ??-glucosidase from derivatives of monascus pigment, *FEMS Microbiol. Lett.* 276 (2007) 93–98. <https://doi.org/10.1111/j.1574->

6968.2007.00917.x.

- [22] S.Y. Lee, J.S. Rhee, Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK, *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1993) 617–623. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90026-X](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90026-X).
- [23] V.K. Bayineni, S. Suresh, G. Singh, R.K. Kadeppagari, Development of a bioautographic method for the detection of lipase inhibitors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453 (2014) 784–786. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.030>.
- [24] S. Ulitzur, A sensitive bioassay for lipase using bacterial bioluminescence, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 572 (1979) 211–217. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(79\)90036-5](https://doi.org/10.1016/0005-2760(79)90036-5).
- [25] G. Kouker, K.E. Jaeger, Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases, *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 211–213.
- [26] H.L. Brockman, Triglyceride lipase from porcine pancreas, *Methods Enzymol.* 71 (1981) 619–627. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7278671>.
- [27] L. Bora, M. Kalita, Production and Optimization of Thermostable lipase from a Thermophilic *Bacillus* sp LBN 4, *Internet J. Microbiol.* 4 (2006) 1–6.
- [28] R.J. Miles, E.L. Siu, C. Carrington, A.C. Richardson, B. V Smith, R.G. Price, The detection of lipase activity in bacteria using novel chromogenic substrates., *FEMS Microbiol. Lett.* 69 (1992) 283–287.
- [29] A. Rawyler, P.A. Siegenthaler, A single and continuous spectrophotometric assay for various lipolytic enzymes, using natural, non-labelled lipid substrates, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 1004 (1989) 337–344. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(89\)90082-9](https://doi.org/10.1016/0005-2760(89)90082-9).
- [30] F. Hasan, A.A. Shah, A. Hameed, Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 782–798. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.001>.
- [31] M. Panteghini, R. Bonora, F. Pagani, Measurement of pancreatic lipase activity in serum by a kinetic colorimetric assay using a new chromogenic substrate., *Ann. Clin. Biochem.* 38 (2001) 365–70. <https://doi.org/10.1258/0004563011900876>.

- [32] T. Ichibangase, Y. Ohba, N. Kishikawa, K. Nakashima, N. Kuroda, Chemiluminescence assay of lipase activity using a synthetic substrate as proenhancer for luminol chemiluminescence reaction, *Luminescence*. 19 (2004) 259–264. <https://doi.org/10.1002/bio.770>.
- [33] S. Br??m, E. Wolfram, Recent Advances in Effect-directed Enzyme Assays based on Thin-layer Chromatography, *Phytochem. Anal.* 28 (2017) 74–86. <https://doi.org/10.1002/pca.2669>.
- [34] K.S.N. Jyothi, P. Hemalatha, S. Challa, Evaluation of α -amylase inhibitory potential of three medicinally important traditional wild food plants of India, *Int. J. Green Pharm.* (2011) 22–27. <https://doi.org/10.4103/0973-8258.85158>.
- [35] Miller, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.* (1959).
- [36] C.A. Simões-pires, B. Hmicha, A. Marston, K. Hostettmann, A TLC bioautographic method for the detection of α - and β -glucosidase inhibitors in plant extracts, (2009) 511–515. <https://doi.org/10.1002/pca.1154>.
- [37] M.O. Salazar, R.L.E. Furlan, A Rapid TLC Autographic Method for the Detection of Glucosidase Inhibitors, *Phytochem. Anal.* 212 (2007) 209–212. <https://doi.org/10.1002/pca.971>.
- [38] A. Marston, J. Kissling, K. Hostettmann, A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants, 54 (2002) 51–54.
- [39] H. Adhami, U. Scherer, H. Kaehlig, T. Hettich, Combination of Bioautography with HPTLC – MS / NMR : A Fast Identification of Acetylcholinesterase Inhibitors from Galbanum †, (2013) 395–400. <https://doi.org/10.1002/pca.2422>.
- [40] L. Ciesla, Thin-layer Chromatography with Biodetection in the Search for New Potential Drugs to Treat Neurodegenerative Diseases – State of the Art and Future Perspectives, *Med. Chem. (Los. Angeles)*. 8 (2012) 102–111.
- [41] J. Liang, Z. Yang, Z. Shu, C. Yu, A rapid thin-layer chromatography bioautographic method for detecting the monoamine oxidase inhibitors in plants, *Nat. Prod. Res.* 28

- (2014) 37–41. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.901322>.
- [42] A. Holt, D.F. Sharman, G.B. Baker, M.M. Palcic, A Continuous Spectrophotometric Assay for Monoamine Oxidase and Related Enzymes in Tissue Homogenates, *Anal. Biochem.* 392 (1997) 384–392.
- [43] I.A. Ramallo, S.A. Zacchino, R.L.E. Furlan, A Rapid TLC Autographic Method for the Detection of Xanthine Oxidase Inhibitors and Superoxide Scavengers, *Phytochem. Anal.* 19 (2006) 15–19. <https://doi.org/10.1002/pca.874>.
- [44] C. Weins, H. Jork, Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography, *J. Chromatogr.* 750 (1996) 403–407.
- [45] T. Paul, S. Banerjee, Invitro evaluation of α -amylase inhibitory activity & antioxidant potential of *Pteris Vittata* L. With special reference to its HPTLC profile, *Int. J. Pharma Bio Sci.* 4 (2013) 494–503.
- [46] C.L. Emmons, D.M. Peterson, G.L. Paul, Antioxidant Capacity of Oat (*Avena sativa* L.) Extracts . 2 . In *Vitro* Antioxidant Activity and Contents of Phenolic and Tocol Antioxidants, (1999) 4894–4898.
- [47] R.E. Lenkinski, Reaction of Gibbs reagent (2,6-dichlorobenzoquinone 4-chloroimine) with the antioxidant BHA (3-tert.-butyl 4-hydroxyanisole): isolation and identification of the major product, *J. Chromatogr.* 294 (1984) 3–7.
- [48] Y. Kono, Generation of Superoxide Radical during Autoxidation of Hydroxylamine and an Assay for Superoxide Dismutase, *Arch. Biochem. Biophys.* 186 (1978) 189–195.
- [49] I. Parejo, C. Codina, C. Petrakis, P. Kefalas, Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH?? (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 44 (2000) 507–512. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(01\)00110-1](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(01)00110-1).
- [50] G.E. Morlock, I. Klingelhöfer, Liquid chromatography-bioassay-mass spectrometry for profiling of physiologically active food, *Anal. Chem.* (2014). <https://doi.org/10.1021/ac501723j>.
- [51] D. Schick, W. Schwack, Planar yeast estrogen screen with resorufin- b -D-

- galactopyranoside as substrate, *J. Chromatogr. A.* (2017).
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.047>.
- [52] S. Wangthong, I. Tonsiripakdee, T. Monhaphol, R. Nonthabenjawan, S.P. Wanichwecharungruang, Post TLC developing technique for tyrosinase inhibitor detection, *Biomed. Chromatogr.* 100 (2007) 94–100. <https://doi.org/10.1002/bmc>.
- [53] R.R. Goodall, A.A. Levi, A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture, *Nat. Publ. Gr.* 158 (1946) 675–676.
- [54] R. Fischer, H. Lautner, Zum papierchromatographischen Nachweis von Penicillinpräparaten, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 294 (1961) 1–7.
- [55] B.J. Nicolaus, C. Coronelli, A. Binaghi, Applicazione agli antibiotici della cromatografia su strato sottile, *Farm. Ed. Prat.* 16 (1961) 349.
- [56] V. Betina, Bioautography and its scope, *J. Chromatogr.* 78 (1973) 41–51.
- [57] M. Jamshidi-Aidji, G.E. Morlock, Bioprofiling of unknown antibiotics in herbal extracts: Development of a streamlined direct bioautography using *Bacillus subtilis* linked to mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1420 (2015) 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.061>.
- [58] A. Sakunpak, L. Sueree, Thin-layer chromatography–contact bioautography as a tool for bioassay-guided isolation of anti-streptococcus mutans compounds from pinus merkusii heartwood, *J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC.* 31 (2018) 355–359. <https://doi.org/10.1556/1006.2018.31.5.2>.
- [59] A.S. Patil, H.M. Paikrao, Bioassay guided phytometabolites extraction for screening of potent antimicrobials in *Passiflora foetida* L., *J. Appl. Pharm. Sci.* 2 (2012) 137–142. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2927>.
- [60] I. Choma, W. Jesionek, TLC-Direct Bioautography as a High Throughput Method for Detection of Antimicrobials in Plants, *Chromatography.* 2 (2015) 225–238. <https://doi.org/10.3390/chromatography2020225>.
- [61] A.K. Dunn, *Vibrio fischeri Metabolism. Symbiosis and Beyond*, 1st ed., Elsevier Ltd., 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394423-8.00002-0>.

- [62] Why sequence *Vibrio fischeri*? - DOE Joint Genome Institute, (n.d.). <https://jgi.doe.gov/why-sequence-vibrio-fischeri/> (accessed April 20, 2020).
- [63] E. Brodl, A. Winkler, P. Macheroux, Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 16 (2018) 551–564. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.11.003>.
- [64] P. V. Dunlap, Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1 (1999) 5–12.
- [65] Alzheimer (maladie d') | Inserm - La science pour la santé, (n.d.). <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/alzheimer-maladie> (accessed January 28, 2021).
- [66] P. Anand, B. Singh, A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, *Arch. Pharm. Res.* 36 (2013) 375–399. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0036-3>.
- [67] H.A. Mucke, The case of galantamine: Repurposing and late blooming of a cholinergic drug, *Futur. Sci. OA.* 1 (2015). <https://doi.org/10.4155/fso.15.73>.
- [68] Obésité | Inserm - La science pour la santé, (n.d.). <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/obesite> (accessed March 26, 2020).
- [69] INSERM, Diabète de type 2, (2020). <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/diabete-type-2>.
- [70] B.A. Theiler, S. Istvanits, M. Zehl, L. Marcourt, E. Urban, L.O.E. Caisa, S. Glasl, HPTLC Bioautography Guided Isolation of α -Glucosidase Inhibiting Compounds from *Justicia secunda* Vahl (Acanthaceae), *Phytochem. Anal.* 28 (2017) 87–92. <https://doi.org/10.1002/pca.2651>.
- [71] S. Zolghadri, A. Bahrami, M.T. Hassan Khan, J. Munoz-Munoz, F. Garcia-Molina, F. Garcia-Canovas, A.A. Saboury, A comprehensive review on tyrosinase inhibitors, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 34 (2019) 279–309. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1545767>.
- [72] A. Urbain, C.A. Simões-Pires, Thin-Layer Chromatography for the Detection and Analysis of Bioactive Natural Products, in: *Encycl. Anal. Chem.*, Wiley, 2020: pp. 1–29. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9907.pub2>.

