UQAC
Université du Québec
à Chicoutimi

Développement et optimisation d'une méthode d'éco-extraction de l'acide ursolique dans *Rhododendron groenlandicum* et application à d'autres *Ericaceae*

par Fanny Charlier

**Mémoire présenté à l'Université du Québec à Chicoutimi comme exigence partielle
de la maîtrise en ressources renouvelables**

Québec, Canada

Fanny Charlier, 2021

RÉSUMÉ

Rhododendron groenlandicum est une Éricacée plus communément appelée thé du Labrador. Plusieurs composés bioactifs contenus dans ce dernier ont été isolés et leurs activités ont été mises en évidence par différents laboratoires. C'est notamment le cas de l'acide ursolique qui est un composé connu pour ses propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes ou encore cytotoxiques envers les lignées cancéreuses. Cependant, l'extraction de l'acide ursolique nécessite l'utilisation de solvants non recommandés par le consortium méthodes de fabrication de produits chimiques pour les industries pharmaceutiques du 21ème siècle (CHEM21) comme le méthanol et le dichlorométhane. Ce projet de maîtrise visait à trouver une méthode d'éco-extraction ou écoresponsable permettant d'obtenir un extrait plus enrichi en acide ursolique qu'avec des solvants non recommandés. Conséquemment, plusieurs approches d'extraction alternatives ont donc été testées, soit une méthode assistée par ultrasons, une méthode comportant un pré-traitement alcalin suivi d'une extraction assistée par ultrasons et une méthode comportant un traitement alcalin suivi d'une acidification. Le contrôle de la teneur en acide ursolique des différents extraits obtenus a été réalisé par un dosage HPLC.

Le premier objectif de ce projet a donc été de comparer ces trois méthodes d'extractions en utilisant un solvant alternatif comme l'éthanol 95 % ou des solvants non recommandés comme le méthanol ou le dichlorométhane. Une relation significative a été observée entre la méthode d'extraction et la teneur relative en acide ursolique ($p_{corrigé} = 0,003$) ainsi qu'entre le solvant d'extraction et la teneur relative ($p_{corrigé} = 0,003$). En effet, l'extrait obtenu par la méthode comportant un traitement alcalin éthanolique suivi d'une acidification a présenté une teneur relative plus importante avec une moyenne de 271 ± 14 mg/g d'extrait comparativement à 120 ± 8 mg/g d'extrait pour l'extraction assistée par ultrasons avec le méthanol qui présente la plus faible teneur.

Le second objectif de cette maîtrise a été d'optimiser la méthode d'extraction comportant un traitement alcalin suivi d'une acidification. Pour ce faire, un plan factoriel complet de 3 facteurs à 3 niveaux a été réalisé. Les facteurs étudiés ont été la température (avec pour paliers 20 °C, 45 °C et 65 °C), la concentration en hydroxyde de sodium éthanolique (0,5 M, 1 M et 1,75 M) et la durée d'extraction (2 h, 4 h et 6 h). Une relation significative a été mise en évidence entre l'interaction triple (température - durée - concentration) et la teneur d'acide ursolique dans les extraits ($p_{corrigé} << 0,001$) permettant de regrouper les conditions optimales afin d'obtenir un extrait enrichi. En effet, les meilleures conditions ont été 20 °C, 2 h et 1,75 M d'hydroxyde de sodium éthanolique. Ces dernières ont permis d'aboutir à un extrait dont la concentration du composé d'intérêt a été en moyenne de 401 ± 8 mg/g d'extrait, contre une concentration 239 ± 25 mg/g d'extrait pour les conditions les moins efficaces (45 °C, 6 h et 1,75 M).

Le dernier objectif a été de valider l'utilisation de cette méthode optimisée sur *Kalmia angustifolia*, *Gaultheria procumbens* et *Arctostaphylos uva-ursi* qui sont d'autres *Ericaceae* riches en acide ursolique. Il a été mis en évidence que cette méthode optimisée a permis d'extraire respectivement 7 fois plus, 12 fois plus et 10 fois plus d'acide ursolique qu'avec une extraction assistée par ultrasons au méthanol.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ..... **i**
TABLE DES MATIÈRES ..... **iii**
LISTE DES TABLEAUX ..... **v**
LISTE DES FIGURES ..... **vii**
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS ..... **x**
REMERCIEMENTS ..... **xii**
INTRODUCTION **1**
CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE **5**
1.1 Des *Ericaceae* au *Rhododendron groenlandicum* **6**
1.1.1 *Ericaceae* 6
1.1.2 *Rhododendron groenlandicum* (Oeder) Kron et Judd 6
a. Généralités 6
b. Utilisations du thé du Labrador par les Premières Nations 8
c. Recherche des actifs et de la composition chimique du thé du Labrador 11
1.2 Acide ursolique **13**
1.3 Éco-extraction **17**
CHAPITRE 2 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS **22**
2.1 Comparaison des différentes méthodes d'extraction du thé du Labrador **23**
2.1.1 Extraits de *R. groenlandicum* 23
a. CCM 25
b. HPLC couplée à un spectromètre de masse (HPLC-MS) 28
2.1.2 Dosage de l'acide ursolique 35
a. Développement de la méthode analytique 35
b. Validation de la méthode analytique 36
c. Réalisation du dosage 39
d. Tests statistiques 42
2.2 Optimisation de la méthode 3 ..... **45**
2.2.1 Optimisation des rendements d'extraction 45
2.2.2 Dosage de l'acide ursolique 47
a. Tests statistiques 49
b. Analyse qualitative des différents extraits 58
2.3 Évaluation de l'efficacité de la méthode d'extraction optimisée pour extraire l'acide ursolique de différents *Ericaceae* **63**
2.3.1 *Extraction de Kalmia angustifolia, Gaultheria procumbens, Arctostaphylos uva-ursi* 63

a. Analyse des extraits obtenus 63
b. Analyse qualitative par CCM 64
2.3.2 Dosage de l'acide ursolique par HPLC 69
CHAPITRE 3 MATÉRIEL ET MÉTHODES 71
3.1 Récolte 72
3.2 Solvants, réactifs et standards 73
3.3 Analyses analytiques 73
3.3.1 CCM 73
3.3.2 HPLC-MS 74
3.3.3 GC-MS et GC-FID 75
3.4 Appareils complémentaires 75
3.5 Tests statistiques 76
3.6 Procédures 76
3.6.1 Comparaison des différentes méthodes d'extraction 76
a. Extractions 76
b. Développement d'une méthode chromatographique d'analyse 79
c. Dosage de l'acide ursolique 80
3.6.2 Optimisation de la méthode d'extraction 86
a. Extraction 86
b. Dosage de l'acide ursolique 87
c. Analyse chromatographique des différents extraits 89
3.6.3 Évaluation de l'efficacité de la méthode d'extraction optimisée pour extraire l'acide ursolique de différents *Ericaceae* 90
a. Extraction de *K. angustifolia*, *G. procumbens*, *A. uva-ursi* 90
b. Analyse qualitative et dosage des différents extraits 90
CONCLUSION 91
LISTE DE RÉFÉRENCES 95
ANNEXES 102

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Différents usages médicinaux des feuilles du thé du Labrador selon les peuples amérindiens[3, 4] 9
Tableau 2 : Constituants principaux possédant un intérêt biologique contenus dans les feuilles de R. groenlandicum 11
Tableau 3 : Rendements d'extraction (n = 3) selon la méthode et le solvant d'extraction pour R. groenlandicum 24
Tableau 4 : Données de dosage selon la colonne utilisée 35
Tableau 5 : Pourcentage de récupération selon l'extrait et la colonne utilisée 36
Tableau 6 : Données de la validation de méthode 37
Tableau 7 : Validation des paramètres de fidélité et de précision - n : nombre de replicata 38
Tableau 8 : Test de recouvrement de l'acide ursolique en fonction de la méthode et du solvant d'extraction - (254 nm) - n : nombre de replicata 39
Tableau 9 : Moyenne des teneurs relatives en acide ursolique (mg/g d'extrait) en fonction du solvant et de la méthode d'extraction - (254 nm) 40
Tableau 10 : Pourcentage de répétabilité des différentes méthodes d'extraction selon le solvant (n = 3) 42
Tableau 11 : Résultats de l'analyse de variance réalisée 43
Tableau 12 : Estimation des pourcentages de variations des différentes composantes de l'approche d'extraction (méthode, solvant, de leur interaction et des résidus) 44
Tableau 13 : Moyenne des 81 rendements d'extraction de la méthode optimisée sur R. groenlandicum - n : nombre de replicata 46
Tableau 14 : Résumé des teneurs moyennes des 81 extractions de la méthode optimisée pour R. groenlandicum - AU : acide ursolique 48
Tableau 15 : Résultats de l'analyse de variance réalisée afin d'évaluer le test des effets de la durée, de la concentration, de la température et de leurs interactions 50
Tableau 16 : Estimation des variations des composantes de la durée, de la concentration, de la température, des différentes interactions et des résidus 53
Tableau 17 : Résumé des rendements d'extraction selon les méthodes pour K. angustifolia, A. uva-ursi, G. procumbens 64

Tableau 18 : Test de recouvrement de l'acide ursolique en fonction de la méthode et du solvant d'extraction pour K. angustifolia, A. uva-ursi et G. procumbens - (254 nm) 69
Tableau 19 : Moyenne des teneurs relatives en acide ursolique (mg/g d'extrait) en fonction du solvant et de la méthode d'extraction pour K. angustifolia, A. uva-ursi et G. procumbens - (254 nm)..... 70
Tableau 20 : Procédure d'extraction des trois méthodes testées - Les températures notées ambiantes n'ont pas été fixées durant ces travaux et les méthodes 2 et 3 ont été agitées à 300 rpm..... 78

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Distribution du R. groenlandicum en Amérique du Nord. 7
Figure 2 : Thé du Labrador. 8
Figure 3 : Structure moléculaire de la (+)-catéchine (1), le terpinèn-4-ol (2), l'α-pinène (3), l'acide chlorogénique (4), l'acide oléanolique (5) et l'uvaol (6). 12
Figure 4 : Structure chimique de l'isoprène (7). 14
Figure 5 : Structure chimique de l'acide ursolique (8) (acide 3β-hydroxy-urs-12-en-28-oique). 14
Figure 6 : Photographies récapitulatives des différents extraits de R. groenlandicum obtenus respectivement par les méthodes 1, 2 et 3 avec l'éthanol 95 % (1) et le méthanol (2). 24
Figure 7 : CCM récapitulative des extraits obtenus selon la méthode et le solvant pour R. groenlandicum - milieu chloroforme-méthanol (80-1) - détection ultraviolet (UV) 365 nm sans révélation. 26
Figure 8 : CCM récapitulative des extraits obtenus selon la méthode et le solvant pour R. groenlandicum - milieu chloroforme-méthanol (80-1) - détection après révélation avec H_2SO_4 à 20 % dans le méthanol et chauffage à 105 °C pendant 5 minutes, observation à la lumière ambiante. 27
Figure 9 : CCM récapitulative des extraits obtenus selon la méthode et le solvant pour R. groenlandicum - milieu chloroforme-méthanol (5-1) - détection après révélation avec H_2SO_4 à 20 % dans le méthanol et chauffage à 105 °C pendant 5 minutes, observation à la lumière ambiante. 28
Figure 10 : Chromatogramme HPLC sur colonne C18 (A) - gradient eau (0,5 % d'acide formique) - méthanol (0,5 % d'acide formique) de 10 à 80 % de méthanol acidifié (30 min) suivi d'un gradient de 80 à 100 % (5 min), rinçage 100 % méthanol (10 min) - 254 nm - Extrait par la méthode 1 (1), par la méthode 2 (2) et par la méthode 3 (3) à l'éthanol 95 %. 30
Figure 11 : Chromatogramme HPLC sur colonne C18 (A) - gradient eau (0,5 % d'acide formique) - méthanol (0,5 % d'acide formique) de 10 à 80 % de méthanol acidifié (30 min) suivi d'un gradient de 80 à 100 % (5 min), rinçage 100 % méthanol (10 min) - 254 nm –- Extrait par la méthode 1 (1), par la méthode 2 (2) et par la méthode 3 (3) au méthanol. 31

Figure 12 : Chromatogramme HPLC sur colonne C18 (A) - gradient eau (0,5 % d'acide formique) - méthanol (0,5 % d'acide formique) de 10 à 80 % de méthanol acidifié (30 min) suivi d'un gradient de 80 à 100 % (5 min), rinçage 100 % méthanol (10 min) - 254 nm - Extrait par la méthode 3 à l'éthanol 95 % (1) et au méthanol (2). *33*

Figure 13 : Chromatogramme HPLC sur colonne C18 (A) - gradient eau (0,5 % d'acide formique) - méthanol (0,5 % d'acide formique) de 10 à 80 % de méthanol acidifié (30 min) suivi d'un gradient de 80 à 100 % (5 min), rinçage 100 % méthanol (10 min) - 254 nm - Extrait par la méthode 2 à l'éthanol 95 % (1) et au méthanol (2). *34*

Figure 14 : Teneurs relatives de l'acide ursolique extrait en fonction du solvant d'extraction et de la méthode d'extraction (♦ méthode 1, × méthode 2 et ▲ méthode 3) - AU : acide ursolique. Moyennes ± erreurs types. *43*

Figure 15 : Teneurs relatives de l'acide ursolique extrait en fonction de la méthode d'extraction - AU : acide ursolique. Moyennes ± erreurs types. Les différentes lettres indiquent des différences significatives (DSH de Tukey). *44*

Figure 16 : Extraits obtenus avec une durée d'extraction de 6 h et 0,5 M de NaOH éthanolique à 45 °C (1) et 1,75 M de NaOH éthanolique 95 % à 65 °C (2). *47*

Figure 17 : Teneurs relatives en acide ursolique extrait en fonction de la température, de la durée et de la concentration de NaOH éthanolique 95 % : ▲ 1,75 M, × 1 M et ♦ 0,5 M - AU : acide ursolique. Moyennes ± erreurs types. Les astérisques rouges indiquent des différences significatives (DSH de Tukey) pour un même niveau de température et de durée. *52*

Figure 18 : Teneurs relatives de l'acide ursolique extrait en fonction de la température d'extraction ▲ pour toutes durées et concentration d'hydroxyde de sodium confondues - AU : acide ursolique. Moyennes ± erreurs types. Les lettres différentes indiquent des différences significatives (DSH de Tukey). *55*

Figure 19 : Teneurs relatives de l'acide ursolique extraits en fonction de la température et de la durée d'extraction : ▲ 2 h, × 4 h et ♦ 6 h pour toutes concentrations d'hydroxyde de sodium confondues - AU : acide ursolique. Moyennes ± erreurs types. *56*

Figure 20 : Teneurs relatives de l'acide ursolique extrait en fonction de la température et de la concentration de NaOH éthanolique 95 % : ♦ 0,5 M, × 1 M et ▲ 1,75 M pour toutes durées confondues - AU : acide ursolique. Moyennes ± erreurs types. L'astérisque rouge indique une différences significatives (DSH de Tukey) à 20 °C. *57*

Figure 21 : Chromatogrammes de GC- FID des extraits obtenus pour 1,75 M d'hydroxyde de sodium éthanolique à 20 °C en 2 h (1) et à 45 °C en 6 h (2). *60*

Figure 22 : Chromatogrammes de GC- FID des extraits obtenus en 2 h avec 1,75 M d'hydroxyde de sodium éthanolique à 20 °C (1), 45 °C (2) et 65 °C (3). 62

Figure 23 : CCM récapitulative des différentes extractions pour Gaultheria procumbens (1) (10 µL déposé), Kalmia angustifolia (2) (15 µL déposé) et Arctostaphylos uva-ursi (3) (15 µL déposé) - milieu chloroforme-méthanol (80-1) - détection après révélation avec H_2SO_4 à 20 % dans le méthanol et chauffage à 105 °C pendant 5 minutes, observation à la lumière ambiante. 66

Figure 24 : CCM récapitulative des différentes extractions pour Arctostaphylos uva-ursi (1) (15 µL déposé), Kalmia angustifolia (2) (15 µL déposé) et Gaultheria angustifolia (3) (10 µL déposé) - milieu chloroforme-méthanol (5-1) - détection après révélation avec H_2SO_4 à 20 % dans le méthanol et chauffage à 105 °C pendant 5 minutes, observation à la lumière ambiante. 68

Figure 25 : Localisation des différents lieux de récolte - : R. groenlandicum, : K. angustifolia, : G. procumbens, : A. uva-ursi. 72

Figure 26 : Plan expérimental n°1 à deux facteurs fixes contenant chacun deux et trois niveaux. 78

Figure 27 : Plan expérimental n°2 à trois facteurs fixes à trois niveaux. 88

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACS : Société américaine de chimie (*American Chemical Society*)

ANOVA : Analyse de variance

AU : Acide ursolique

CCM : Chromatographie sur couche mince

CHEM21 : Méthodes de fabrication de produits chimiques pour les industries pharmaceutiques du 21ème siècle

CV : Coefficient de variation (écart-type relatif)

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DSH : Différence significative honnête

EtOH : Éthanol

FDA : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*Food and Drug Administration*)

GC-FID : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

H_2SO_4 : Acide sulfurique

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

HPLC-MS : Chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse

LASEVE : Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales

LDM : Limite de détection minimale

LQM : Limite de quantification minimale

MeOH : Méthanol

NaOH : Hydroxyde de sodium

NIST : *National Institute of Standards and Technology*

p : Valeur de p

S : Pente

pH : Potentiel hydrogène

r^2 : Coefficient de corrélation

rpm : Tours par minute

TmSH : Hydroxyde de triméthylsulfonium

t_R : Temps de rétention

UV : Ultraviolet

σ : Déviation standard du y-intercepte de la régression linéaire

ω : largeur du pic à la mi-hauteur

REMERCIEMENTS

Comme pour toutes expériences de la vie, rien ne se réalise seul. C'est pourquoi, je tiens à remercier les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce projet.

Je remercie mon directeur de recherche le professeur André Pichette et mon co-directeur le professeur Jean Legault pour m'avoir fait confiance et donné l'opportunité de réaliser ce projet de maîtrise au sein du LASEVE.

Je tiens également à remercier mon superviseur le docteur François Simard ainsi que toutes les personnes qui m'ont aidée au cours de ces recherches notamment le docteur Balla Sylla et les professeurs Mathieu Cusson, Jérome Alsarraf et Vakhtang Mshvildadze. Merci d'avoir participé au bon déroulement de ce projet de par votre accompagnement et vos précieux conseils.

Je n'oublie pas également Dominique Simard et Jacques Ibarzabal pour leur aide dans mes démarches administratives, mais aussi Germain Savard pour sa patience et pour avoir toujours eu le petit mot qui fait sourire même dans les jours les plus gris.

Mes différentes rencontres faites durant ces 2 ans ont fait de cette maîtrise une joyeuse aventure. C'est pourquoi, je remercie tous mes collègues qui m'ont apporté du soutien, des conseils mais aussi de nombreux fou rire pendant cette maîtrise. Merci à Anne Ardaillou pour m'avoir accompagnée pendant ces deux années, pour m'avoir écoutée parler de mon sujet à longueur de journée et pour ses différentes relectures. Merci également à Valentine Coicaud pour m'avoir accompagnée dès mes premiers pas au Québec et sans qui le laboratoire aurait été beaucoup trop calme et Marie Frissard pour sa joie de vivre et sa compréhension dans ma monopolisation de l'HPLC.

Je remercie aussi Alexis St-Gelais pour sa bonne humeur tôt le matin, pour le temps accordé à la relecture de ce mémoire ainsi qu'aux différentes questions que j'ai pu avoir. Merci également pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mon stage de fin d'étude dans le Laboratoire PhytoChemia.

Merci à ma famille et plus particulièrement à mes parents, de m'avoir permis de me rendre au Québec. Bien que sur deux continents différents et séparés par un océan, vos appels m'ont apporté le soutien nécessaire afin de conserver toute ma motivation. Sans vous, rien de tout cela n'aurait été possible.

INTRODUCTION

Rhododendron groenlandicum est un arbuste de la famille des *Ericaceae* répandu dans le nord des États-Unis, au Canada et au Groenland.[1, 2] Sa répartition dans les forêts, notamment les boisés humides de conifères, et sa capacité à s'adapter au climat boréal font que *R. groenlandicum* est abondant dans la région du Saguenay-Lac-St-Jean. *R. groenlandicum*, reconnaissable à ses feuilles inférieurement tomenteuses, a été beaucoup exploité aux fils des années. De sa première application lui vient son nom commun : thé du Labrador.[1] En plus d'être employées comme thé, les feuilles de *R. groenlandicum* ont été utilisées par les Premières Nations pour le traitement de divers maladies telles que l'asthme, les rhumes, les infections rénales ou encore les rhumatismes.[3] Ces remèdes ont suscité l'intérêt des chercheurs qui ont effectué de nombreuses études sur des extraits de feuilles de *R. groenlandicum*, ce qui est notamment le cas du laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales (LASEVE).[4] Ces projets ont mené à la découverte de composés bioactifs comme des composés phénoliques et des triterpènes dont la catéchine ou l'acide ursolique qui ont respectivement des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires.[4, 5] En plus de son activité anti-inflammatoire, l'acide ursolique suscite un grand intérêt pour son potentiel cytotoxique, hypoglycémique, analgésique et chimiopréventif.[4, 6, 7] Ce sont ces propriétés qui font de l'acide ursolique une molécule d'intérêt pour le domaine pharmaceutique mais aussi cosméceutique avec son potentiel « anti-inflammaging »[a].[8, 9]

Cependant, dans un contexte où la recherche de « label naturel » est plus présente et où la situation écologique est préoccupante, l'étude de l'acide ursolique peut susciter des controverses. En effet, son extraction nécessite de nombreux solvants non respectueux de l'environnement et de la santé humaine, pour obtenir des teneurs faibles

[a] Inflammaging : En cosmétologie, il s'agit de la contraction des termes « inflammation » et « aging ». L'inflammaging décrit un processus chronique et silencieux d'inflammation. Liée à l'âge, cette inflammation est responsable de nombreuses pathologies comme l'arthrose mais est aussi un des principaux responsables du vieillissement de la peau et des cheveux.[8, 9]

en mg/g d'extrait.[10-12] Par exemple, des recherches préliminaires ont permis d'isoler dans les feuilles du thé du Labrador, environ 130 mg d'acide ursolique/g d'extrait. De plus, même si diverses méthodes d'éco-extraction utilisant des solvants alternatifs existent déjà, celles-ci ne permettent pas l'extraction optimale de l'acide ursolique.

C'est dans ce contexte qu'est né ce projet de maîtrise qui consistait à obtenir de plus grandes teneurs d'acide ursolique dans les extraits de feuilles du thé du Labrador, en utilisant différentes méthodes d'extraction dont certaines nécessitent un traitement alcalin lequel est plus respectueux de l'environnement et de la santé humaine.

L'objectif principal de ce projet visait le développement et l'optimisation d'une méthode d'éco-extraction pour l'acide ursolique. Une méthode analytique a été développée et validée afin de déterminer avec précision la teneur en acide ursolique des extraits. Cette même méthode a aussi été utilisée dans le but d'analyser les extraits obtenus avec trois méthodes d'extraction différentes, dont deux impliquant des traitements alcalins, avec différents solvants d'extraction notamment l'éthanol 95 % et le méthanol. De plus, différentes approches chromatographiques et analytiques ont été exploitées pour caractériser la composition des différents extraits. La meilleure méthode d'extraction a été optimisée par l'étude de plusieurs facteurs incluant la température, la durée et la concentration alcaline du solvant d'extraction. Pour ce faire, des analyses de la variance (ANOVA) ont été utilisées afin d'interpréter les résultats obtenus dans le cadre de ce projet.

La première partie de ce mémoire présente l'état de la littérature établie au sujet de *R. groenlandicum*, de l'acide ursolique et de l'éco-extraction. La seconde partie porte sur les résultats obtenus et la discussion qui en découle. La troisième partie détaille le matériel et les méthodes utilisées au cours de cette étude. Enfin la dernière

partie présente les conclusions de ces travaux et les perspectives qui pourraient être envisagées.

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Des *Ericaceae* au *Rhododendron groenlandicum*

1.1.1 *Ericaceae*

La famille des *Ericaceae* représente une partie importante de la flore américaine et canadienne. Elle recense plus de 90 genres et près de 1500 espèces dans les forêts d'Amérique du Nord, dans les toundras et les tourbières.[13] Il s'agit généralement de plantes ligneuses possédant des feuilles alternes, simples, sans stipules et souvent persistantes.[13]

Parmi les Éricacées se trouvent, entre autres, les genres *Rhododendron*, *Kalmia*, *Gaultheria* et *Arctostaphylos.*[13] Ces genres sont plus particulièrement ceux dont relève le contenu des présents travaux.

1.1.2 *Rhododendron groenlandicum* (Oeder) Kron et Judd

a. Généralités

Le genre *Rhododendron* regroupe environ 610 espèces dont *Rhododendron groenlandicum*.[13] La dénomination initiale de *R. groenlandicum* était *Ledum groenlandicum*. Cette dernière a été changée suite à des recherches effectuées par Kron et Judd sur la nature monophylétique du genre ont conduit au changement de la classification.[14] Cela a permis d'établir que le genre *Ledum* était congénérique du genre *Rhododendron*.[14, 15] Ce dernier, comme le montre la Figure 1, est répandu dans le nord des États-Unis, au Canada et au Groenland.[1, 2] Il est présent notamment dans les tourbières, les fondrières, les marécages, les bords de cours d'eau et les boisés humides de conifères, surtout dans les forêts d'épinettes noires.[16]

(CC-BY) Vascan
(https://data.canadensys.net/vascan/name/Rhododendron%20groenlandicum?lang=fr)

Figure 1: Distribution du *R. groenlandicum* en Amérique du Nord.

R. groenlandicum, illustré sur la Figure 2, est plus communément appelé thé du Labrador puisqu'il a remplacé le thé aux États-Unis pendant la guerre d'indépendance.[1] Ses rameaux sont densément tomenteux et à feuilles alternes aux bords révolutés, persistantes et odorantes lors de leur froissage.[13] La partie supérieure des feuilles est verte tandis que la partie inférieure est brune-tomenteuse. Les fleurs de *R. groenlandicum* sont blanches et en ombelles ou en corymbes avec un petit calice.[13]

Figure 2 : Thé du Labrador.

R. groenlandicum est bien acclimaté aux climats frais boréaux, tempérés, continentaux et mésothermaux. Il s'adapte aussi aux fortes variations de températures et de précipitations grâce à sa capacité de photosynthèses. En effet, plus la température est basse, plus *R. groenlandicum* a un taux de photosynthèse élevé.[17, 18] *R. groenlandicum* est réputé de nuisible de par sa capacité à ralentir et empêcher le développement de plusieurs espèces végétales. En effet, il compétitionne avec les autres espèces du milieu pour bénéficier au maximum des nutriments du sol. Il inhibe, par exemple, la régénération et la croissance de l'épinette noire après un feu en modifiant la chimie du sol.[19]

b. Utilisations du thé du Labrador par les Premières Nations

Avant de remplacer le thé lors de la guerre d'indépendance, les feuilles du thé du Labrador étaient déjà employées par les peuples amérindiens, notamment Chippewa, comme boisson sous forme de tisane en raison de leurs propriétés curatives. Ces derniers utilisaient également ses racines réduites en poudre, en application externe, comme traitement des brûlures. Les Innus, quant à eux, appliquaient la plante sous

forme de cataplasme ou d'infusion pour le traitement de la fièvre ou de la jaunisse.[3] La plante ou ses différentes parties étaient donc utilisées par les Premières Nations pour ses nombreuses vertus.[3] Le Tableau 1 recense l'utilisation médicinale traditionnelle des feuilles de *R. groenlandicum* selon les différents peuples amérindiens.

Tableau 1: Différents usages médicinaux des feuilles du thé du Labrador selon les peuples amérindiens[3, 4]

Nation	Forme	Usage
Abnaki	Poudre	Traitement contre l'inflammation nasale
	Remède froid	Traitement contre le rhume
Algonquin, Québec	Infusion	Breuvage médicinal
Bella Coola	Décoction	Analgésique
		Aide gastro-intestinale
		Antispasmodique
Cree	Cataplasme de poudres	Traitement contre les brûlures et les échaudures
	Infusion	Diurétique
	Non spécifié	Émétique
Cree, Hudson Bay	Cataplasme	Traitement des plaies
Cree, Woodlands	Cataplasme	Traitement dermatologique du sein
	Poudre	Traitement contre les éruptions cutanées chez le nourrisson
Gitksan	Décoction	Diurétique
Haisla & Hanasksiala	Infusion	Traitement contre le rhume
	Décoction	Traitement contre l'inappétence
	Infusion	Traitement contre la tuberculose

Nation	Forme	Usage
Kitasoo	Décoction	Traitement contre le rhume
		Traitement contre les difficultés respiratoires
Kwakiutl	Non spécifié	Narcotique
Makah	Infusion	Purification du sang
		Aide à l'accouchement
		Traitement contre les infections rénales
Micmac	Décoction	Diurétique
	Non spécifié	Traitement contre le rhume
		Traitement contre les infections rénales
		Traitement contre le Scorbut
		Traitement contre l'asthme
	Infusion	Détoxification
Innus	Infusion	Purification du sang
		Traitement contre le rhume
Nithinaht	Infusion	Traitement contre l'inappétence
Okanagan-Colville	Infusion	Traitement contre les infections rénales
Oweekeno	Infusion	Traitement contre le rhume
Patawatomi	Infusion	Traitement contre des maladies non spécifiés
Quinault	Infusion	Traitement contre les rhumatismes
Shuswap	Infusion	Traitement contre la cécité
		Traitement contre l'irritation des yeux
		Traitement du Sumac vénéneux

D'autre part, l'utilisation du thé du Labrador a été recommandée par Foster et Duke pour le soin des voies respiratoires, notamment dans le cas de toux, de bronchites ou d'asthme mais aussi dans le cas d'inflammations et d'infections légères des voies otorhinolaryngologies et respiratoires ou d'états grippaux.[1, 20]

c. Recherche des actifs et de la composition chimique du thé du Labrador

Les différents remèdes amérindiens préparés à partir des feuilles du thé du Labrador, comme leur utilisation dans le traitement contre l'asthme, les rhumatismes ou les brûlures, ont permis de mettre en évidence un potentiel biologique, plus particulièrement anti-inflammatoire. C'est pourquoi plusieurs laboratoires, incluant le LASEVE, ont travaillé sur l'identification de ses actifs.[4] Suite à ces recherches, de quelques familles de composés aux potentiels biologiques démontrés (Tableau 2) ont été isolées à partir des feuilles du thé du Labrador tel que présenté à la Figure 3. Parmi ces composés, sont retrouvés la (+)-catéchine (**1**), le terpinèn-4-ol (**2**), l'α-pinène (**3**), l'acide chlorogénique (**4**), l'acide oléanolique (**5**) et l'uvaol (**6**).

Tableau 2 : Constituants principaux possédant un intérêt biologique contenus dans les feuilles de *R. groenlandicum*

Famille	Composé chimique	Potentiels biologiques principaux
Flavonoïdes	(+)-Catéchine[21]	antibactérien[22]
		anti-oxydant[23]
	(-)-Épicatéchine[21]	antioxydant[23]
	Quercétine[21]	antioxydant[4, 23, 24]
		anti-inflammatoire[25]
		antibactérien[26]

Famille	Composé chimique	Potentiels biologiques principaux
Acides phénoliques	Acide chlorogénique[27]	antibactérien[28]
		antioxydant[29, 30]
	Acide *p*-coumarique[27]	antibactérien[31]
Terpènes	Acide ursolique[4]	anti-inflammatoire[4]
		anticancéreux[4]
	Acide oléanolique[4]	anti-inflammatoire[32]
	Sabinène[33, 34]	Anti-inflammatoire[35]
	α-Pinène[33, 34]	antimalarique[36]
Alcool monoterpénique	Terpinèn-4-ol[33]	antifongique[37]

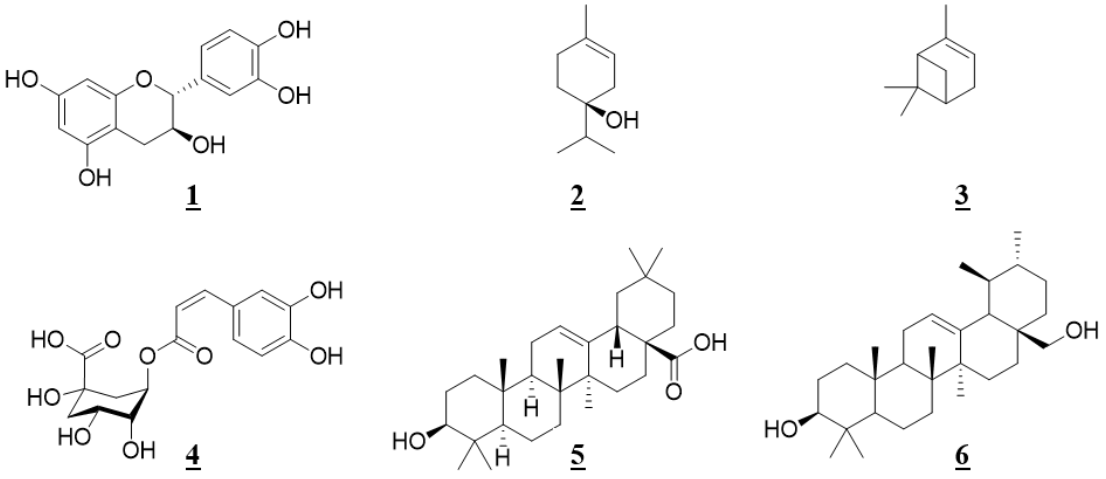


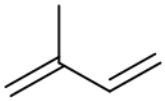
Figure 3 : Structure moléculaire de la (+)-catéchine (**1**), le terpinèn-4-ol (**2**), l'α-pinène (**3**), l'acide chlorogénique (**4**), l'acide oléanolique (**5**) et l'uvaol (**6**).

Toutefois, il est important de noter, que différentes études rapportent des résultats divergents quant à la composition chimique du thé du Labrador, notamment au sujet de

son huile essentielle. Par exemple, Belleau et Collin ont reporté que les composés majoritaires de l'huile essentielle des feuilles du thé du Labrador sont le sabinène (16-17 %), le terpinen-4-ol (7-6 %) et le myrténal (3,5 %) tandis que des travaux réalisés par Marion Étienne au LASEVE ont mis en évidence que la composition majoritaire de l'huile essentielle des feuilles de *R. groenlandicum* sont l'α-sélinène (14,0 %), le germacrène B (13,2 %) et l'α-pinène (8,6 %).[33, 38] De plus, une étude réalisée par Collin a mis en évidence qu'il y avait d'importantes variations de composition de l'huile essentielle selon la provenance des feuilles dans une même région.[39] Ces variations chimiques suggèrent l'existence de différents chémotypes du *R. groenlandicum*. Il a été suggéré l'existence de 7 chémotypes qui touchent plus particulièrement les sesquiterpènes, le limonène ou encore le sabinène.[40] Parmi les composés précédemment cités (Tableau 2), l'acide ursolique est le composé qui a été étudié durant ce projet de maîtrise. Il possède de nombreuses activités biologiques, notamment anti-inflammatoire et est utilisé dans différents secteurs tels que cosmétique et pharmaceutique.[3, 41]

1.2 Acide ursolique

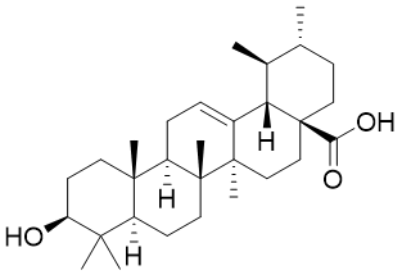
L'acide ursolique est un triterpène. Les terpènes sont des hydrocarbures issus de la condensation de plusieurs unités isopréniques **7** (Figure 4). L'isoprène est une molécule constituée de cinq carbones. La classification des terpènes est établie sur le nombre d'unités isopréniques qui a été nécessaire dans la voie de biosynthèse de la molécule. Par exemple, les monoterpènes (C10) sont formés à partir de deux unités isopréniques, alors que les triterpènes sont issus de six unités.



7

Figure 4 : Structure chimique de l'isoprène (**7**).

L'acide ursolique **8** (Figure 5) est un triterpène pentacyclique de type « ursane ».[42] Il a été isolé pour la première fois en 1854 par Trommsdorff dans les feuilles de *Arctostaphylos uva-ursi*.[43] L'acide ursolique est retrouvé naturellement dans de nombreux végétaux comme par exemple dans les pelures de pommes, les Sarracéniacées, les Plantaginacées ou encore les Éricacées.[4, 44-46] Il existe sous forme d'aglycone ou d'hétérosides dans des saponines triterpéniques. [47, 48]



8

Figure 5 : Structure chimique de l'acide ursolique (**8**) (acide 3β-hydroxy-urs-12-en-28-oique).

Un grand intérêt s'est développé autour de l'acide ursolique en raison de ses effets bénéfiques dus notamment à ses propriétés anti-inflammatoires, analgésiques, anticancéreuses et antioxydantes.[4, 6, 7, 49] Il est également étudié en synthèse organique en tant que précurseur d'autres triterpènes, mais aussi pour le développement d'analogues plus actifs. Par exemple, l'acide ursolique a été employé pour la synthèse

d'uvaol, lui-même nécessaire pour la synthèse de glycoside d'uvaol à l'activité cytotoxique supérieure à l'uvaol.[50, 51] L'acide ursolique a également été utilisé pour la synthèse d'analogues cytotoxiques ou de dérivés anti-cancéreux plus efficaces et plus sélectifs. Par exemple, des modifications structurelles en position C-3 se sont avérées importantes pour la cytotoxicité et l'ajout d'un dérivé 3β-amino à l'acide ursolique a permis d'augmenter jusqu'à 20 fois son activité cytotoxique.[52] Aussi, des dérivés obtenus par des réactions entre le 1,2-dibromoéthane et la position C-28 de l'acide ursolique ont présenté une activité inhibitrice plus importante que l'acide ursolique.[53]

En plus d'être largement étudié en chimie organique, l'acide ursolique est également une molécule d'intérêt dans le domaine de la cosméceutique. En effet, il possède une activité anti-inflammatoire et antioxydante intéressante.[54, 55] L'activité anti-inflammatoire de l'acide ursolique est due à sa capacité à inhiber la formation d'enzymes impliquées dans le processus inflammatoire, comme l'oxyde nitrique synthase et la cyclooxygénase.[7, 56] L'acide ursolique permet également d'inhiber la libération d'histamine par les mastocytes, ainsi que la prostaglandine E2.[7, 57] Il se révèle donc être efficace contre « l'inflammaging ». Ce terme décrit un processus chronique et silencieux d'inflammation. Liée à l'âge, cette dernière est responsable de nombreuses pathologies comme l'arthrose mais serait aussi un des principaux moteurs du vieillissement de la peau et des cheveux.[9, 58] L'inflammation chronique peut engendrer, par le biais de facteurs chimiques, la synthèse et l'activation d'enzymes comme la collagénase et l'élastase qui peuvent dégrader la matrice extracellulaire du derme entrainant ainsi un vieillissement de la peau.[59, 60] L'acide ursolique inhibe l'activité de l'élastase et stimule la synthèse du collagène ce qui pourrait permettre de prévenir la dégradation de la matrice extracellulaire du derme.[7, 61-63] Son mécanisme d'action fait de l'acide ursolique une molécule intéressante pour le développement de produits anti-âge. En effet, l'acide ursolique s'est révélé efficace dans l'amélioration de la fonction de la barrière épidermique, notamment dans la production de collagène. Cette molécule d'intérêt permet l'amélioration de l'hydratation de la peau, une

réduction de la desquamation et une amélioration de l'élasticité de la peau. Ces propriétés font de l'acide ursolique un bon candidat pour le domaine cosméceutique et plus particulièrement dans les gammes « anti-inflammaging ».[62-66] L'extrait de thé du Labrador contenant de l'acide ursolique est d'ailleurs utilisé par Lise Watier Cosmétiques© dans sa gamme « Sublimessence ».[67] De plus, la compagnie AmorePacific a développé une gamme de produits cosméceutiques anti-âge contenant de l'acide ursolique pour protéger la peau du stress et des facteurs toxiques.[7] Finalement, les entreprises cosméceutiques cherchent de plus en plus à obtenir une certification verte afin de répondre à la demande de « Label Naturel », entraînant un intérêt croissant vers les composés actifs naturels tel que ce triterpène.[68]

L'acide ursolique, malgré les connaissances déjà acquises, reste une molécule qui nécessite encore beaucoup d'études. Actuellement, plusieurs travaux de recherches sont en cours. Par exemple, l'équipe de Hua Jin combine l'acide ursolique avec des nanoparticules afin de cibler son action cytotoxique et de régler ses problèmes de solubilité limitée ou encore sa mauvaise biodisponibilité.[69, 70] Un autre potentiel de l'acide ursolique est lié directement au fait qu'il s'agit d'une molécule capable de moduler plusieurs voies de signalisation moléculaire associées au cancer, à l'inflammation, aux maladies neurologiques et cardiovasculaires.[71] Mais aussi, au fait que la synthèse de dérivés de l'acide ursolique pourrait être utilisé comme une future approche pour surmonter la résistance cellulaire et augmenter l'efficacité thérapeutique vis-à-vis des maladies ciblées.[71] Ces recherches nécessitent la consommation d'acide ursolique. Or, pour une pureté supérieure à 90 %, le prix est d'environ 95 $CAD pour 50 mg chez MilliporeSigma et d'environ 90 $CAD pour 100 mg chez MP Biomedicals™ et son extraction nécessite l'utilisation de solvants en grande quantité. Il serait donc pertinent de pouvoir en obtenir plus avec moins de biomasse pour des raisons environnementales et de coût. De plus, à ce jour, il n'existe pas de voie de synthèse permettant d'en obtenir.

Pour toutes ses raisons, il est intéressant d'étudier l'acide ursolique contenu dans *R. groenlandicum*, d'en déterminer sa teneur et d'augmenter son taux d'extraction. En effet, obtenir plus d'acide ursolique permettrait de faciliter les approvisionnements pour le domaine cosméceutique, pharmaceutique et pour la chimie organique.

1.3 Éco-extraction

L'acide ursolique est généralement isolé par extraction sous reflux au dichlorométhane ou au méthanol,[10, 11] le tout suivi de nombreuses étapes de purification sollicitant de grands volumes de solvants organiques.[72] Cependant, le méthanol est considéré par le consortium Méthodes de fabrication de produits chimiques pour les industries pharmaceutiques du 21ème siècle (CHEM21) comme un solvant dangereux pour la santé. Le dichlorométhane, quant à lui, est déconseillé pour la santé et pour l'environnement. [73]

De plus, l'acide ursolique n'est pas toujours présent en grande quantité dans les plantes. Ainsi l'obtention d'une petite quantité d'acide ursolique par ces méthodes d'extraction nécessite une importante consommation de biomasse. En effet, d'après les tests préliminaires réalisés au LASEVE, la méthode classique d'extraction au méthanol assistée par ultrasons a permis d'extraire environ 160 mg/g d'extrait d'acide ursolique dans le thé du Labrador.

Diverses problématiques chimiques environnementales et sanitaires sont actuellement une préoccupation du 21ème siècle. Ces problématiques se retrouvent dans l'utilisation des procédés d'extraction longs et couteux en énergie, des solvants toxiques pour la santé humaine et l'environnement, l'élimination difficile des déchets générés et le questionnement du caractère renouvelable de la matière première. Ainsi, La phytochimie permet d'y faire face par la valorisation d'extraction saine et sécuritaire

pour la santé humaine et l'environnement : il s'agit de l'éco-extraction végétale.[74] Le concept a émergé en 2010 et s'inspire des 12 principes de la chimie verte dont les principaux sont de :

- « favoriser l'innovation par la sélection variétale et l'utilisation de ressources végétales renouvelables,
- privilégier l'utilisation de solvants alternatifs et principalement ceux issus des agro-ressources,
- réduire la consommation énergétique par l'assistance des technologies innovantes et de favoriser la récupération d'énergie, la création de coproduits au lieu de déchets pour intégrer la voie de la bio- ou agro-raffinerie,
- réduire les opérations unitaires grâce à l'innovation technologique
- favoriser les procédés sûrs, robustes et contrôlés,
- privilégier un produit non dénaturé, biodégradable, sans contaminants et surtout porteur de valeurs « éco-extrait ». »[74]

Il existe aujourd'hui différentes méthodes répondant aux critères de l'éco-extraction dont l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction assistée par ultrasons. La première méthode permet de mieux diffuser la chaleur en réalisant une pénétration thermique instantanée avec une élévation rapide de la température. En effet, les micro-ondes augmentent les cinétiques d'extraction en augmentant la température de la plante et du solvant. Cette méthode permet, avec l'utilisation de solvants polaires comme l'éthanol, d'extraire sélectivement les composés polaires.[75, 76] En effet, l'extraction de molécules apolaires nécessite, pour ce procédé, l'utilisation de solvant comme l'hexane qui est non approuvé par la CHEM 21.[73, 77] L'acide ursolique n'étant pas une molécule polaire, cette méthode d'extraction n'est probablement pas la plus efficace. La seconde méthode, l'extraction assistée par ultrasons, permet quant à elle de maintenir des températures d'extraction plus faibles avec des durées plus courtes en

raison de la diffusion rapide des solutés dans le milieu d'extraction.[78, 79] Ces méthodes, pour répondre aux principes d'éco-extraction, doivent favoriser l'utilisation de solvants dits alternatifs, c'est-à-dire des solvants éco-responsables qui possèdent un bon profil en terme d'hygiène, de sécurité et d'environnement.[80] D'après la CHEM21, l'éthanol 95 % répond à ces différents critères.[73] En effet, l'éthanol provient de la fermentation des sucres contenus dans les biomasses. Il est donc plus facile à éliminer en comparaison aux solvants chlorés et est moins toxique pour l'opérateur que le méthanol.[73, 81] Cependant, ce solvant ne permet pas d'optimiser l'extraction de tous les composés d'intérêt comme les triterpènes et ce, même combiné à une extraction assistée par ultrasons, car l'éthanol a une polarité supérieure à celle du dichlorométhane utilisé usuellement. Pour pallier ce problème, des chercheurs se sont alors concentrés sur des extractions faisant intervenir des traitements alcalins tout en utilisant des méthodes d'extractions classiques comme des montages à reflux.[82, 83] Ces traitements alcalins peuvent être combinés à une solution aqueuse (dans une moindre mesure) ou à des solvants respectueux de l'environnement. L'hydroxyde de sodium utilisé pour ceux-ci ne représente qu'un risque de corrosion, ce qui représente un moindre risque pour la santé humaine.[84] Ces traitements alcalins permettent non seulement de limiter la consommation de solvants chlorés mais aussi d'enrichir les extraits en hydrolysant certaines macromolécules indésirables comme la chlorophylle. L'hydrolyse des fonctions esters d'un composé permet d'obtenir un dérivé plus soluble dans l'eau, ce qui rend par la suite possible son élimination du solvant organique. En outre, lorsque l'acide ursolique est présent sous la forme de saponines triterpéniques, cette technique permettrait de libérer l'aglycone. Toutefois, aucun article ne recense la présence de saponine triterpénique dans le thé du Labrador. Par ailleurs, le traitement alcalin déprotone, par augmentation du pH, les acides carboxyliques présents sur les acides terpéniques, ce qui les rend plus solubles dans l'éthanol.[82, 85] Suite à cette déprotonation, une acidification permet, par la suite, de faire précipiter ces composés et de ce fait, ces méthodes d'extraction alcalines devraient permettre d'obtenir une plus grande teneur en acide ursolique. Cependant, l'emploi de traitements alcalins entraine

également des réactions parasitaires comme l'hydrolyse des esters d'acides gras et nécessite des montages expérimentaux, adaptés aux reflux, aux coûts énergétiques plus élevés.[82, 83, 86] C'est pour ces raisons que certains chercheurs se sont concentrés sur l'optimisation de ces méthodes d'extraction.[87] Les facteurs évalués sont, le plus souvent, la durée de l'extraction, la concentration de l'hydroxyde de sodium et la température d'extraction.[87-89]

Ce projet de maîtrise a donc pour objectif principal d'optimiser cette approche d'extraction respectueuse de l'environnement et de la santé humaine au travers de l'application de conditions d'extraction les plus douces possibles (température, durée…).

- Hypothèse 1 : Il existe une méthode d'extraction éco-responsable permettant, avec de l'éthanol, d'obtenir un extrait avec une plus grande teneur en acide ursolique qu'avec le méthanol à partir de *R. groenlandicum*

- Hypothèse 2 : Les plus grandes teneurs relatives en acide ursolique des extraits seront attribuables aux pré-traitements alcalins

- Hypothèse 3 : La méthode permettant d'extraire la plus grande teneur relative en acide ursolique est optimisable tout en répondant aux critères d'éco-responsabilité

Afin de répondre à ces hypothèses, plusieurs démarches ont été réalisées. La première a été de comparer les différentes méthodes d'extraction en fonction du solvant utilisé (solvant alternatif ou usuel). La seconde étape a été d'optimiser la méthode permettant d'obtenir l'extrait le plus enrichi en acide ursolique. Pour finir, la dernière

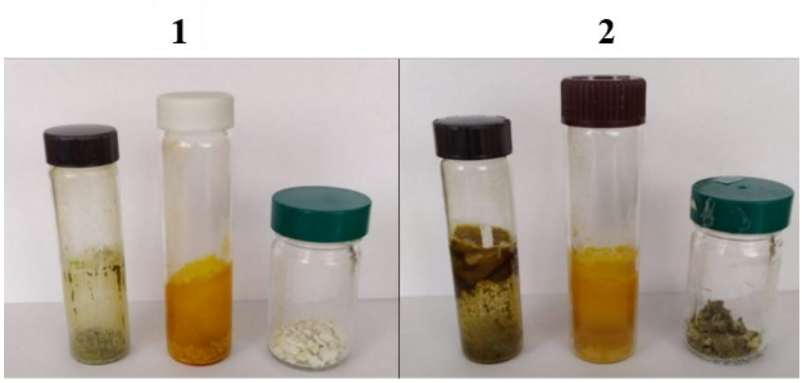
démarche a été d'étendre la méthode optimisée de l'extraction de l'acide ursolique à d'autres Éricacées.

CHAPITRE 2
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

2.1 Comparaison des différentes méthodes d'extraction du thé du Labrador

2.1.1 Extraits de *R. groenlandicum*

Afin de déterminer quelle méthode d'extraction permet d'obtenir un extrait plus riche en acide ursolique, trois méthodes d'extraction ont été réalisées avec pour solvant le méthanol ou l'éthanol 95 %. La première méthode a été choisie selon la méthode utilisée dans les travaux préliminaires effectués au LASEVE. En ce qui concerne les méthodes 2 et 3, ces dernières ont été testées en raison de leur potentiel référencé dans la littérature, pour l'extraction de l'acide ursolique.[82, 83] Les protocoles sont décrits à la partie 3.2 - 3.2.1 section a. La première méthode consiste en une extraction assistée par ultrasons à température ambiante pendant 30 min, la deuxième en un pré-traitement alcalin aqueux chauffé à 60 °C pendant 8 h à deux reprises, suivi de la récupération et du séchage de la plante traitée. La plante traitée sèche est ensuite extraite par la méthode 1. La troisième méthode est une extraction couplée d'un traitement alcalin à 0,5 M dans le solvant choisi à température ambiante, pendant 6 h. Comme le montre la Figure 6, chacune des méthodes d'extraction a permis d'obtenir des extraits de couleurs et d'apparences différentes. En ce qui concerne les méthodes 1 et 2, le solvant d'extraction n'a semblé avoir aucun effet sur la couleur de l'extrait. En effet, que le solvant soit de l'éthanol 95 % ou du méthanol, la méthode 1 a donné des extraits poudreux de couleur verte et la méthode 2 a permis d'obtenir des extraits poudreux de couleur jaune. En ce qui concerne la méthode 3, l'extraction à l'éthanol 95 % a permis d'obtenir un extrait d'une couleur blanche tandis que le méthanol a donné un extrait poudreux de couleur marron-beige. La perte de couleur verte des extraits obtenus par les méthodes 2 et 3 suggère une dégradation de la chlorophylle ou que celle-ci n'a pas été extraite tel que rapporté dans la littérature.[82] De plus les couleurs des deux extraits de la méthodes 3 sont distinctes, ce qui pourrait laisser penser que leur composition chimique est différente.



©Fanny Charlier

Figure 6 : Photographies récapitulatives des différents extraits de *R. groenlandicum* obtenus respectivement par les méthodes 1, 2 et 3 avec l'éthanol 95 % (**1**) et le méthanol (**2**).

Afin d'avoir une vue d'ensemble des extraits, le rendement de chaque extraction a été calculé et est représenté dans le Tableau 3. Aucune analyse statistique n'a été réalisée sur ces résultats.

Tableau 3 : Rendements d'extraction ($n = 3$) selon la méthode et le solvant d'extraction pour *R. groenlandicum*

	Éthanol 95 %			Méthanol		
	Méthode 1[a]	Méthode 2[b]	Méthode 3[c]	Méthode 1[a]	Méthode 2[b]	Méthode 3[c]
Rendement moyen des triplicatas (% m/m)	8,8 ± 0,7	5,2 ± 1,1	9,3 ± 0,3	10,4 ± 0,5	6,7 ± 0,8	11,0 ± 1,5

[a] : Méthode 1 : extraction assistée par ultrasons
[b]: Méthode 2 : pré-traitement alcalin suivi d'une extraction assistée par ultrasons de la planté pré-traitée
[c] : Méthode 3 : Extraction couplée au traitement alcalin

Globalement, l'extraction au méthanol a permis d'obtenir de meilleurs rendements d'extraction qu'avec l'éthanol 95 %. En effet, pour chaque méthode, le

rendement d'extraction a été supérieur avec le méthanol. Le solvant a donc influencé les rendements d'extraction. De plus, quel que soit le solvant utilisé, la méthode 3 a permis d'extraire la plus grande quantité de composés par rapport à la méthode 2. Toutefois, les rendements obtenus par la méthode 3, quel que soit le solvant sont similaires à ceux obtenus avec la méthode 1. Cependant, la corrélation entre le rendement d'extraction et la teneur en acide ursolique n'est pas établie. Il sera donc important d'évaluer la teneur en acide ursolique dans les extraits par dosage.

2.1.2 Développement de méthodes chromatographiques d'analyse

Afin d'obtenir un portrait d'ensemble qualitatif des différents extraits obtenus, des analyses par chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie liquide haute performance (HPLC) et chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) ont été réalisées.

a. CCM

Une première analyse a été réalisée dans un milieu apolaire afin d'étudier la partie la plus apolaire des différents extraits (Figure 7). L'analyse par CCM dans un milieu apolaire a permis de confirmer que la chlorophylle n'a pas été extraite par l'utilisation des méthodes d'extraction avec un traitement alcalin.[82] En effet, l'encadré rouge de la Figure 7 montre la présence ou l'absence de chlorophylle pour chacune des méthodes extraites au méthanol et à l'éthanol. La chlorophylle est présente dans les extraits obtenus par la méthode 1 pour chacun des solvants, tandis qu'elle est absente des extraits obtenus par les méthodes 2 et 3. De plus, ces analyses montrent que, pour des mêmes composés, les intensités des taches semblent plus ou moins forte selon la méthode et le solvant d'extraction. Comme une quantité fixe d'extrait a été déposée sur chaque bande, ce comportement laisse présager des différences de proportions des

composés. En ce qui concerne la Figure 8, l'encadré violet montre la tache - de rapport frontal (R_f) de 0,13, qui, à l'aide d'un témoin d'acide ursolique, a été identifiée comme ce dernier. Cette dernière est plus notable pour les méthodes 2 et 3 que pour la 1. Cette analyse n'a pas permis de montrer une différence pour une même méthode d'extraction selon le solvant.

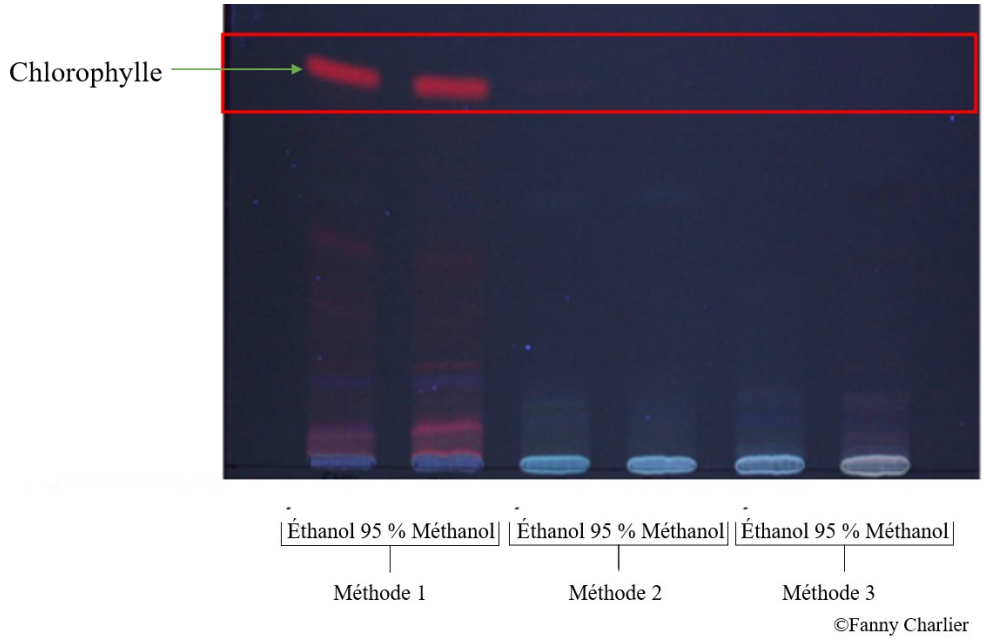


Figure 7 : CCM récapitulative des extraits obtenus selon la méthode et le solvant pour *R. groenlandicum* - milieu chloroforme-méthanol (80-1) - détection ultraviolet (UV) 365 nm sans révélation.

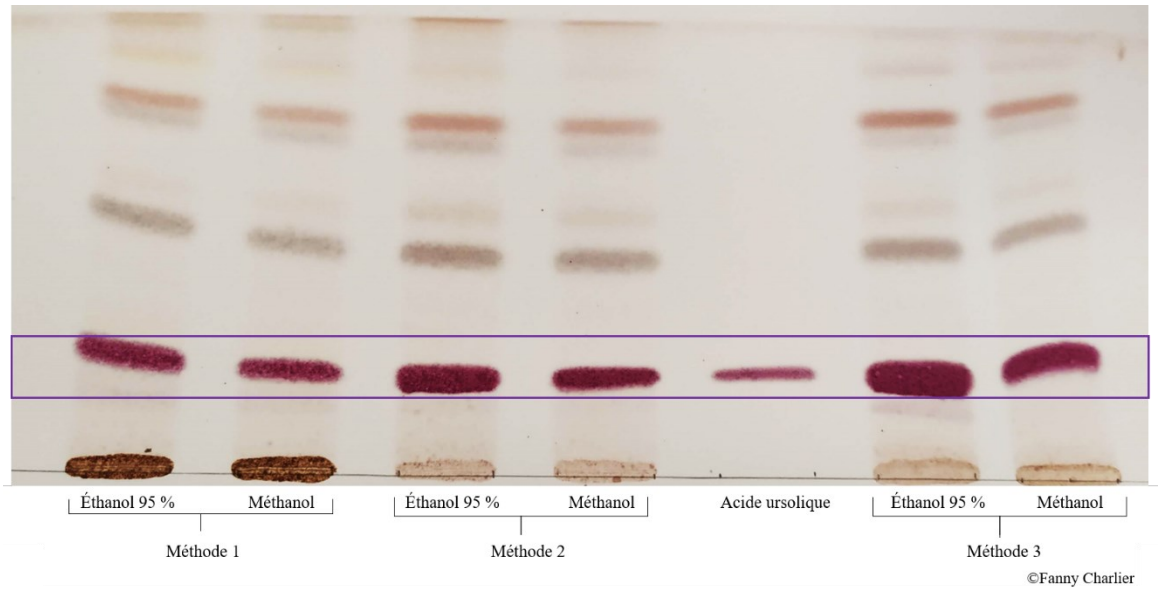


Figure 8 : CCM récapitulative des extraits obtenus selon la méthode et le solvant pour *R. groenlandicum* - milieu chloroforme-méthanol (80-1) - détection après révélation avec H_2SO_4 à 20 % dans le méthanol et chauffage à 105 °C pendant 5 minutes, observation à la lumière ambiante.

La CCM, représentée par la Figure 9, a été réalisée dans un milieu plus polaire que la première analyse. Ce milieu a permis de montrer que la composition des différents extraits semble varier davantage dans la partie polaire des extraits. En effet, cette CCM a permis de mettre en évidence le fait que les traitements alcalins des méthodes 2 et 3 ont permis de ne pas extraire certains composés non recherchés comme les composés polaires (sucres par exemple). L'encadré bleu de la Figure 9 met en évidence l'absence notable de la plupart des composés polaires de l'extrait obtenu par la méthode 1 par rapport aux méthodes 2 et 3. Ce fait est notamment flagrant sur la ligne de base où les extraits de la méthode 1 semblent contenir des composés glycosylés tandis qu'ils sont absents des autres extraits.

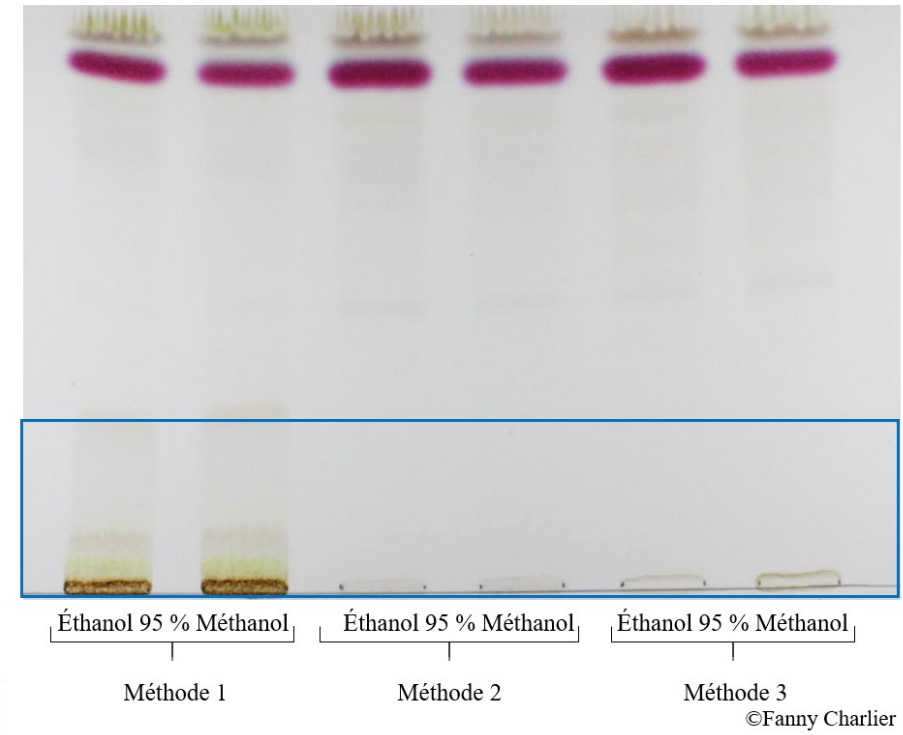


Figure 9 : CCM récapitulative des extraits obtenus selon la méthode et le solvant pour *R. groenlandicum* - milieu chloroforme-méthanol (5-1) - détection après révélation avec H_2SO_4 à 20 % dans le méthanol et chauffage à 105 °C pendant 5 minutes, observation à la lumière ambiante.

b. HPLC couplée à un spectromètre de masse (HPLC-MS)

Afin d'étudier plus en détail la composition chimique des extraits, une analyse HPLC a été réalisée selon le protocole établi dans la partie 3.2 - 3.2.1 section b - ii. L'analyse HPLC a permis de confirmer que les méthodes 2 et 3 ont évité l'extraction des composés polaires contrairement à la méthode 1 et ce, quel que soit le solvant d'extraction (Figure 10 - Figure 11). De plus, les travaux préliminaires réalisés au LASEVE ainsi qu'une analyse des spectres de masse (MS) ont permis de proposer une identification pour certains de ces composés polaires, qui se révèlent être des composés phénoliques (acide chlorogénique) ou encore des flavonoïdes (catéchine). Ce sont donc

ces composés phénoliques et ces flavonoïdes qui n'ont pas été extraits par les traitements alcalins. Cela suggère une meilleure sélectivité d'extraction de ces méthodes.

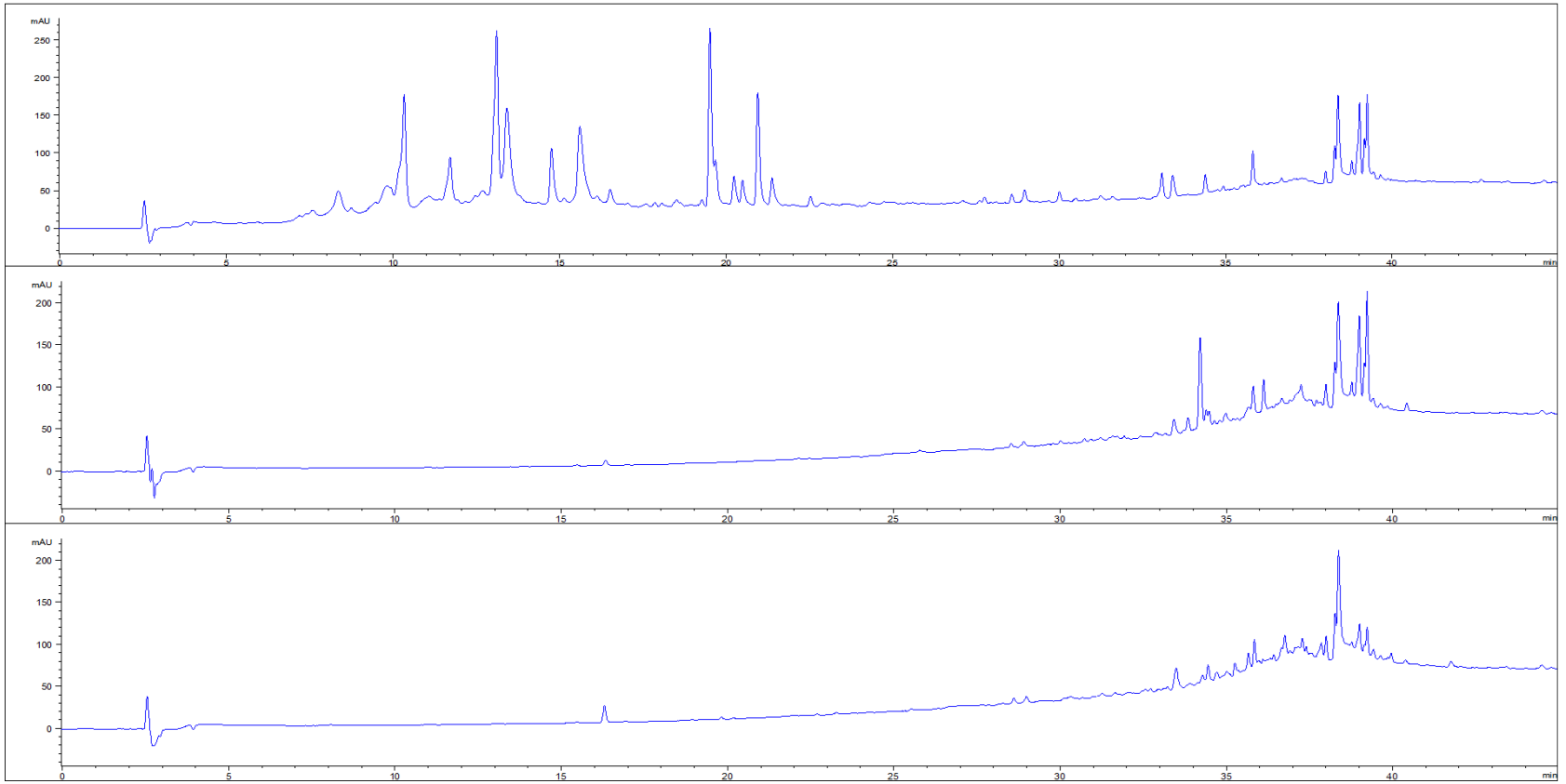


Figure 10 : Chromatogramme HPLC sur colonne C18 (A) - gradient eau (0,5 % d'acide formique) - méthanol (0,5 % d'acide formique) de 10 à 80 % de méthanol acidifié (30 min) suivi d'un gradient de 80 à 100 % (5 min), rinçage 100 % méthanol (10 min) - 254 nm - Extrait par la méthode 1 (**1**), par la méthode 2 (**2**) et par la méthode 3 (**3**) à l'éthanol 95 %.

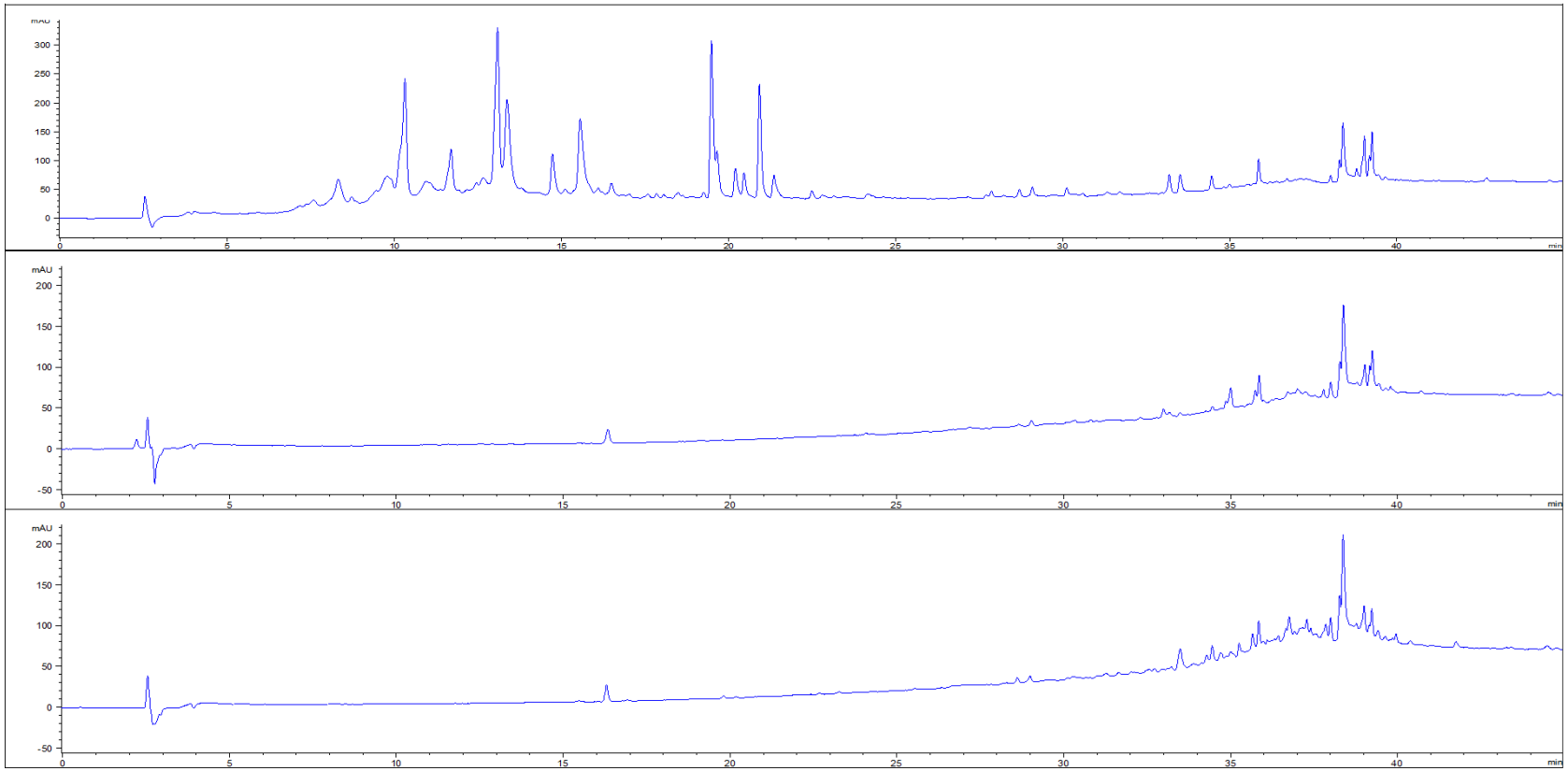


Figure 11 : Chromatogramme HPLC sur colonne C18 (A) - gradient eau (0,5 % d'acide formique) - méthanol (0,5 % d'acide formique) de 10 à 80 % de méthanol acidifié (30 min) suivi d'un gradient de 80 à 100 % (5 min), rinçage 100 % méthanol (10 min) - 254 nm –-Extrait par la méthode 1 (**1**), par la méthode 2 (**2**) et par la méthode 3 (**3**) au méthanol.

À propos de la méthode 3, les couleurs des extraits éthanoliques et méthanoliques sont visuellement très différentes (2.1 - 2.1.1 - Figure 6). La comparaison des deux extraits dans la partie des composés polaires par HPLC à 254 nm (Figure 12) a été réalisée visuellement en raison de l'injecteur de l'HPLC qui présente une certaine variabilité, et le fait qu'aucun standard interne n'ait été injecté afin d'évaluer les aires des composés ciblés. Toutefois, cette comparaison suggère qu'un composé ayant un temps de rétention de 16,35 min possède une aire qui semble plus grande pour l'extraction au méthanol par rapport à l'extraction à l'éthanol. La partie apolaire du chromatogramme a permis de mettre en évidence la différence de teneurs de deux composés ayant des temps de rétention respectif de 34,25 min et 39,24 min et de deux composés co-élués au temps de rétention de 39,01 min. En effet, leurs aires dans l'extrait méthanolique ont paru, de manière visuelle, largement inférieure à leurs aires dans l'extrait éthanolique. Cela tend à confirmer que les couleurs d'extraits sont dues à des variations notables des compositions relatives des deux extraits. Il n'est cependant pas possible de déterminer les composés responsables de la coloration. Toutefois, la méthode HPLC développée pour la partie des composés apolaires n'est pas optimale pour évaluer les différences précises entre les extraits obtenus avec les deux solvants. Au sujet de la méthode 2, les extraits éthanoliques et méthanoliques ne présentent pas visuellement de grandes variations de composition (Figure 13).

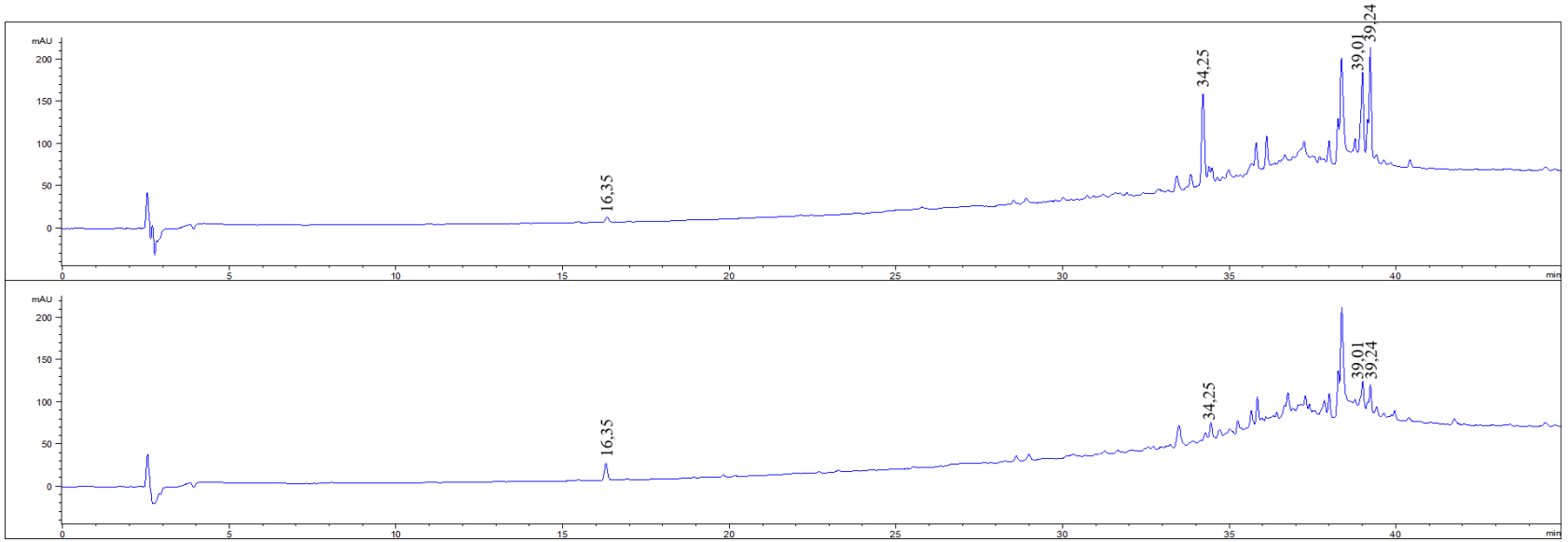


Figure 12 : Chromatogramme HPLC sur colonne C18 (A) - gradient eau (0,5 % d'acide formique) - méthanol (0,5 % d'acide formique) de 10 à 80 % de méthanol acidifié (30 min) suivi d'un gradient de 80 à 100 % (5 min), rinçage 100 % méthanol (10 min) - 254 nm - Extrait par la méthode 3 à l'éthanol 95 % (**1**) et au méthanol (**2**).

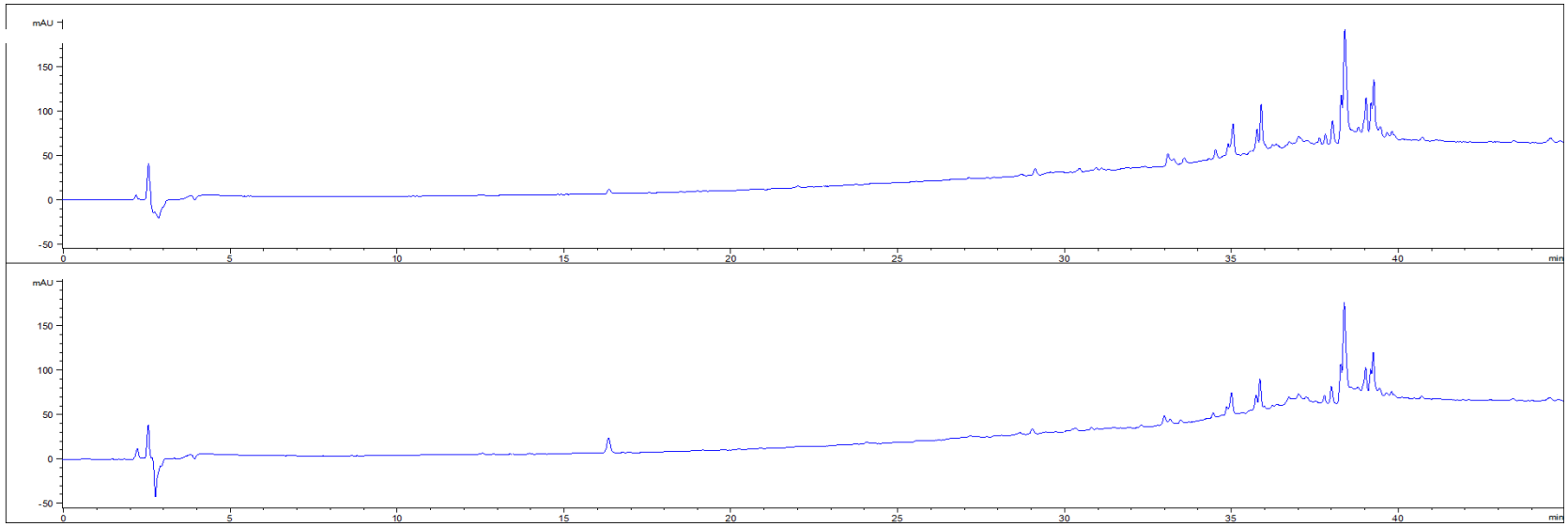


Figure 13 : Chromatogramme HPLC sur colonne C18 (A) - gradient eau (0,5 % d'acide formique) - méthanol (0,5 % d'acide formique) de 10 à 80 % de méthanol acidifié (30 min) suivi d'un gradient de 80 à 100 % (5 min), rinçage 100 % méthanol (10 min) - 254 nm - Extrait par la méthode 2 à l'éthanol 95 % (**1**) et au méthanol (**2**).

2.1.2 Dosage de l'acide ursolique

a. Développement de la méthode analytique

Afin de choisir la colonne utilisée pour réaliser le dosage de l'acide ursolique dans les différents extraits, la première étape a été de préparer une courbe de calibration pour chaque colonne afin d'établir les coefficients de corrélation (R^2) de chaque droite (Tableau 4). La longueur d'onde UV choisie a été de 254 nm.

Tableau 4 : Données de dosage selon la colonne utilisée

	Droite d'étalonnage	Temps de rétention
Colonne Thermo Scientific™ Hypersil Gold [ANNEXE 1]	y = 4626,4x + 14,203	Variable
Colonne Kinetex® C18 courte [ANNEXE 2]	y = 7112,4x + 185,91	Fixe
Colonne Kinetex® C18 [ANNEXE 3]	y = 5790,1x + 71,905	Fixe

La colonne Thermo Scientific™ Hypersil Gold a présenté des temps de rétention variables durant une même séquence d'analyse. En effet, la différence entre les temps de rétention a été de plus 3 min. C'est pourquoi, elle a été rejetée.

Afin de vérifier un potentiel effet de matrice de l'extrait et de contrôler si les deux colonnes apportaient une même réponse, une quantité connue d'acide ursolique a été ajoutée dans les extraits de la méthode 3 afin d'établir le pourcentage réel retrouvé. (Tableau 5).

Tableau 5 : Pourcentage de récupération selon l'extrait et la colonne utilisée

	Concentration de la solution d'acide ursolique ajoutée (mg/mL)	Colonne Kinetex®	% de récupération
Méthode 3 – Éthanol 95 %	0,540	Colonne C18 courte	82,0 ± 1,2
		Colonne C18	96,8 ± 0,3
Méthode 3 - Méthanol	0,630	Colonne C18 courte	86,5 ± 2,5
		Colonne C18	99,2 ± 0,4

La colonne Kinetex® C18 courte a présenté un biais systématique élevé avec un pourcentage de récupération inférieur à 90 % selon la concentration en acide ursolique ; cela est probablement dû à un effet de matrice non contrôlé. La méthode par calibrage externe ne saurait donc être valide pour cette colonne dans le domaine étudié. De plus, l'essai sur la colonne Kinetex® C18 a permis de révéler que l'effet de matrice était dû à une co-élution résolue avec cette colonne (ANNEXE 3). Elle a donc été choisie pour le dosage. Les résolutions, définies dans la partie 3.2 - 3.2.1 section c – ii, entre les composés entourant l'acide ursolique et ce dernier ont toutes été de 1,33.

b. Validation de la méthode analytique

i. Linéarité et sensibilité : limite de détection (LDM) et de quantification (LQM)

Le Tableau 6 résume les résultats de l'étalonnage de l'HPLC pour l'acide ursolique. Une bonne corrélation a été trouvée entre l'aire du pic et les concentrations ($R^2 > 0,9995$) pour tous les niveaux de calibrage testés à leur longueur d'onde de détection (254 nm). Les LDM et LQM, établies selon le protocole décrit partie 3.2 -

3.2.1 section c - ii, étaient respectivement de 0,04 mg/mL et de 0,12 mg/mL. Ces valeurs ont été suffisamment faibles pour doser l'analyte.

Tableau 6 : Données de la validation de méthode

Équation de la droite de régression	y = 5790,1x + 71,905
R^2	0,9998
ɣ-intercept	71,905
Linéarité (mg/mL) (minimum : maximum)	0,12 : 2,00
LDM (mg/mL)	0,04
LQM (mg/mL)	0,12

ii. *Réplicabilité, répétabilité et justesse*

La précision et la justesse de la méthode de dosage, répertoriées dans le Tableau 7, ont été évaluées selon les recommandations de la conférence de l'harmonisation (ICH) et de la FDA.[90, 91] La méthode est d'une bonne précision car la variabilité interjournalière moyenne obtenue était de 1,50 % et la variabilité intrajournalière moyenne de 1,64 %. Ces valeurs sont bien en dessous de la limite de 15 % recommandée par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA).

Tableau 7 : Validation des paramètres de fidélité et de précision - n : nombre de *replicata*

		Fidélité - Écart relatif (CV) (%)				Erreur relative (%)
	Concentration (mg/mL)	Variabilité intra-journalière		Variabilité inter-journalière		Justesse
		Temps de rétention	Aire du pic	Temps de rétention	Aire du pic	
Acide ursolique	2,00 n = 3	0,28	0,95	0,55	0,92	0,78
	1,50 n = 3	0,34	1,4	0,55	1,4	0,45
	1,00 n = 3	0,39	1,0	0,51	1,1	2,3
	0,50 n = 3	0,24	2,1	0,51	1,8	1,3
	0,25 n = 3	0,33	2,7	0,54	2,2	2,8
Moyenne	-	0,32	1,6	0,53	1,5	1,5

Il est important de prendre en compte le fait que lors de la validation de la méthode, la colonne C18 (A) n'avait pas encore été utilisée, et était donc dans son état optimal. Il serait donc intéressant de confirmer la validation de la méthode à ce jour, étant donné que la colonne usager, avant de réaliser un nouveau dosage.

iii. Test de recouvrement

En raison de l'objectif du projet, le test de recouvrement n'a pas été réalisé comme suggéré par la conférence internationale sur l'harmonisation.[90] En effet, d'après leurs recommandations, le test de recouvrement vise à vérifier que l'analyte recherché

est extrait dans sa totalité. Or, ce projet n'avait pas pour but d'extraire en totalité l'acide ursolique mais bien d'en obtenir la plus grande quantité relative dans l'extrait. C'est pourquoi ce test (Tableau 8) a été réalisé uniquement dans le but de vérifier si l'acide ursolique était mesuré en totalité à l'aide du détecteur UV et qu'il n'y avait aucun effet de matrice. Pour ce faire, une quantité connue d'acide ursolique a été ajoutée à chacun des extraits préparés à une concentration de 5 mg/mL en triplicata. Ce test a donc servi d'aide pour le choix de la méthode analytique en dévoilant ou non la présence de co-élutions. Celui-ci a été réalisé pour chaque méthode à deux concentrations différentes. Le test de recouvrement réalisé a permis d'établir que l'acide ursolique est détectable à 254 nm au minimum à 95,9 %.

Tableau 8 : Test de recouvrement de l'acide ursolique en fonction de la méthode et du solvant d'extraction - (254 nm) - n : nombre de *replicata*

		Recouvrement (%)		
	Concentration de la solution d'acide ursolique ajoutée (mg/mL)	Méthode 1 (n = 3)	Méthode 2 (n = 3)	Méthode 3 (n = 3)
Éthanol 95 %	0,540 ± 0,003	102,0 ± 0,2	96,8 ± 0,3	96,8 ± 0,3
Méthanol	0,630 ± 0,003	95,9 ± 0,4	101,0 ± 0,5	99,2 ± 0,4

c. Réalisation du dosage

i. Préparation des extraits

Grâce à l'analyse des extraits par la méthode analytique décrite partie 3.2 - 3.2.1 section c - ii, il a été possible, en utilisant la droite d'étalonnage décrite dans le Tableau 6, de calculer la teneur relative en acide ursolique dans les extraits obtenus (Tableau

9). Par simple observation, la méthode 3 semble permettre d'obtenir une plus grande quantité d'acide ursolique, quel que soit le solvant utilisé. En effet, cette méthode a permis d'obtenir respectivement avec de l'éthanol ou du méthanol 271 ± 17 mg d'acide ursolique/g d'extrait et 207 ± 18 mg d'acide ursolique/g d'extrait. De plus, ces valeurs retranscrites en pourcentage d'acide ursolique présents dans les feuilles sèches du thé du Labrador avant extraction, ont montré pour la méthode 3, quel que soit le solvant utilisé, une moyenne de 2,4 %. Pour les méthodes 1 et 2, quel que soit le solvant utilisé, ce pourcentage est nettement inférieur à 2,4 % (de 1,5 % pour la méthode 1 et de 1,1 % pour la 2), ce qui signifie que l'extraction de l'acide ursolique n'a pas été complète.

Tableau 9 : Moyenne des teneurs relatives en acide ursolique (mg/g d'extrait) en fonction du solvant et de la méthode d'extraction - (254 nm)

	Éthanol 95 %			Méthanol		
	Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3	Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3
Teneur relative moyenne en acide ursolique (mg/g d'extrait)	177 ± 7	206 ± 19	271 ± 17	121 ± 9	162 ± 12	207 ± 18
Rendement moyen en acide ursolique dans les feuilles sèches (% m/m)	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,2	2,5 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,1 ± 0,2	2,2 ± 0,1

ii. Répétabilité de la méthode d'extraction

Le pourcentage de répétabilité des différentes méthodes d'extraction a été évalué (Tableau 10). La répétabilité des extractions a varié selon la méthode. En effet, les méthodes 2 et 3 présentent les pourcentages les plus élevés des écarts-relatifs (CV) ce qui signifie que pour ces deux méthodes les valeurs sont plus dispersées. Cela s'explique, pour la méthode 2, par le fait qu'elle a nécessité la filtration et la récupération de la plante prétraitée avant d'en faire l'extraction. Cette récupération de la plante lors de la filtration n'a pas été optimale. En effet, le fait que le filtrat soit composé en partie d'eau a compliqué cette étape, nécessitant une filtration sur membrane de 0,45 µm pour éviter le maximum de perte qui se produisait par dégradation des filtres standards. De plus, le séchage de la plante, précédant l'extraction, a entrainé sa rétractation et son noircissement de manière aléatoire selon les échantillons. Pour la méthode 3, lors de ses tests préalables, la température dite « pièce » n'a pas été fixée, ce qui a pu avoir un impact sur les résultats. En effet, la température du laboratoire fluctue en général entre 18 °C et 21 °C. Pour les trois méthodes, le pourcentage CV, étant inférieur à 10 %, reste tout de même acceptable,.[39] Pour pallier ce problème et améliorer ces résultats, les sacs de plantes broyées obtenues lors de la même récolte ont tous été mélangés de manière manuelle.

Tableau 10 : Pourcentage de répétabilité des différentes méthodes d'extraction selon le solvant (n = 3)

	Éthanol 95 %			Méthanol		
	Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3	Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3
Concentration relative moyenne d'acide ursolique (mg/mL)[1]	0,88	1,04	1,40	0,62	0,81	1,05
Écart-type (mg/mL)	0,04	0,10	0,08	0,04	0,06	0,09
CV (%)	3,7	9,2	6,1	7,0	7,5	8,7

[1] : pour une solution à 5 mg d'extrait/mL.

d. Tests statistiques

Les résultats du dosage de l'acide ursolique, présentés dans le Tableau 9, ont pu être analysés par une ANOVA pour un seuil de confiance de 95 % (Tableau 11). Comme expliqué dans la partie 3.2 - 3.2.1 section c - iv, les valeurs de p ont été corrigées par la méthode d'Holm.[92] Celle-ci a permis de mettre en évidence les différences significatives de teneur relative en acide ursolique selon la méthode d'extraction ($p_{corrigé}$ = 0,003) et selon le solvant ($p_{corrigé}$ = 0,003). Il existe donc bien une variation de la teneur relative en acide ursolique dans les extraits selon le solvant et la méthode employés. Cependant, l'interaction entre le solvant et la méthode n'est significative, ce qui signifie que le solvant et la méthode ne s'influencent pas entre-eux. Le résultat, présenté à la Figure 14, montre que les différentes combinaisons ne se croisent jamais. En effet, les droites caractéristiques des méthodes 1, 2 et 3 selon le solvant sont parallèles entre-elles.

Tableau 11 : Résultats de l'analyse de variance réalisée

Variable / Source de variations	Degré de liberté	Rapport de Fisher	Valeur de p	Valeur de p corrigée[92]
Méthode	2	63,83	**< 0,001**	**0,003**
Solvant	1	71,52	**< 0,001**	**0,003**
Méthode x Solvant	2	0,51	0,615	0,615
Résidus	12			
Total corrigé	17			

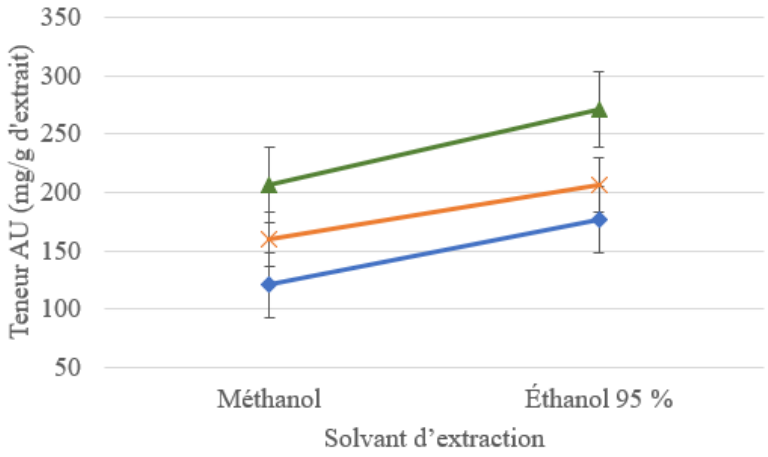


Figure 14 : Teneurs relatives de l'acide ursolique extrait en fonction du solvant d'extraction et de la méthode d'extraction (♦ méthode 1, × méthode 2 et ▲ méthode 3) - AU : acide ursolique. Moyennes ± erreurs types.

D'après l'estimation des variations des composants mentionné dans le Tableau 12, la méthode a été le facteur qui a influencé le plus la récupération d'acide ursolique dans l'extrait (46,2 %), suivi par le solvant (39,3 %) puis par les résidus[b] (14,5 %). Un test de comparaison multiple DSH de Tukey a mis en évidence la méthode qui se

[b] Résidus : Employé dans ce mémoire comme terme statistiques définissant les erreurs observées.

distingue le plus (Figure 15). L'ANOVA ayant traduit une différence significative concernant le solvant d'extraction, aucun test *post-hoc* n'a été réalisé sur ce facteur. Ces tests ont montré que pour obtenir des extraits enrichis en acide ursolique, il a été préférable d'utiliser la méthode 3 et l'éthanol 95 %. La combinaison des deux n'ayant aucune influence sur la teneur en acide ursolique, c'est cette dernière qui a été choisie.

Tableau 12 : Estimation des pourcentages de variations des différentes composantes de l'approche d'extraction (méthode, solvant, de leur interaction et des résidus)

Source de variations	Pourcentage de variation (%)
Méthode	46,2
Solvant	39,3
Méthode x Solvant	0
Résidus	14,5

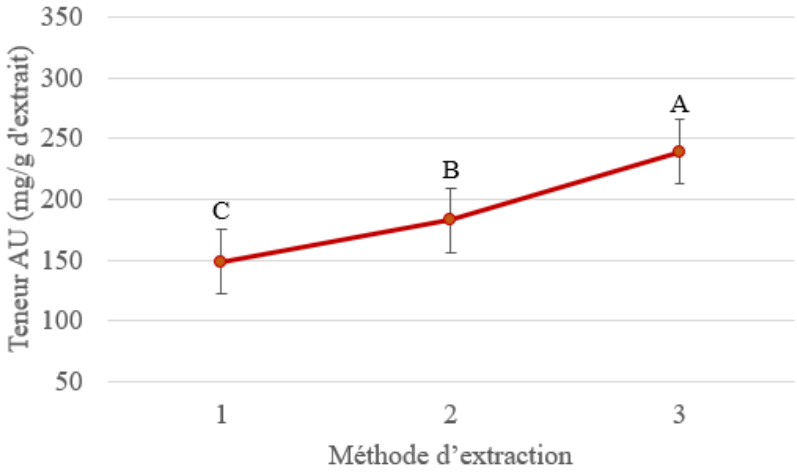


Figure 15 : Teneurs relatives de l'acide ursolique extrait en fonction de la méthode d'extraction - AU : acide ursolique. Moyennes ± erreurs types. Les différentes lettres indiquent des différences significatives (DSH de Tukey).

2.2 Optimisation de la méthode 3

2.2.1 Optimisation des rendements d'extraction

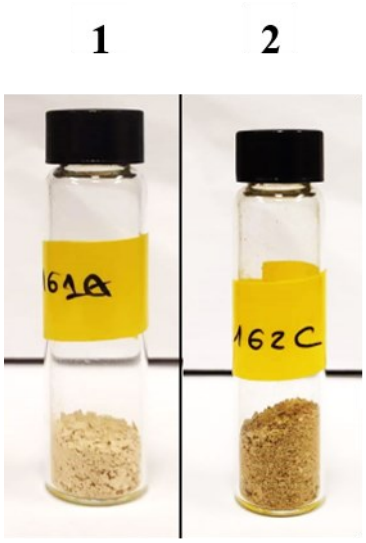
Afin de réaliser l'optimisation de la méthode d'extraction la plus adaptée, un plan d'expériences doit être mis en place. Ce dernier est choisi à partir du nombre de facteurs à tester et du nombre de leurs niveaux. Idéalement, les conditions d'extraction permettant d'enrichir le plus les extraits en acide ursolique devraient être celles qui limitent le plus l'hydrolyse des esters d'acides gras et améliorent les conditions de solubilité de l'acide ursolique et diminuent celles des acides gras. Une étude réalisée par le groupe de Salimon a permis d'établir les niveaux de concentration d'hydroxyde de sodium éthanolique, de température et de durée permettant de maximiser l'hydrolyse des esters d'acides gras.[87] Les trois niveaux de concentration d'hydroxyde de sodium éthanolique testés ont été 0,5 M, 1 M et 1,75 M, les durées évaluées ont été 2 h, 4 h et 6 h et pour finir les températures testées ont été 20 °C, 45 °C et 65 °C. Dans ce projet de maîtrise, ces trois facteurs à trois niveaux ont été testés à l'aide d'un plan factoriel complet à facteur fixe afin d'établir l'effet des facteurs mais aussi l'effet des interactions possibles entre ces derniers.[93] L'analyse de variance (ANOVA) en découlant nécessite des données indépendantes avec une distribution normale et des variances relativement homogènes.

La méthode 3 a été optimisée à l'aide de 27 expériences réalisées en *triplicata*. Chacune des expériences a donné un rendement d'extraction différent allant de 6 % à 10 % m/m, et des couleurs d'extraits différentes allant du beige au doré (Tableau 13 - Figure 16). Le rendement de l'extraction testé par la méthode 3 éthanolique a été de 7 % m/m contre 10 % m/m lors des premiers tests d'optimisation. Cela s'explique par les changements effectués pour rendre l'optimisation faisable en termes de coût, de temps et des matériaux (évaporation de l'extrait à sec, vitesse d'agitation, température plus

contrôlée, plante mieux mélangée). Ces changements ont pu influencer le rendement en le rendant ainsi incomparable aux premiers résultats préliminaires (partie 2.1 - 2.1.1 -Tableau 3).

Tableau 13 : Moyenne des 81 rendements d'extraction de la méthode optimisée sur *R. groenlandicum* - n : nombre de *replicata*

Durée (h)	Concentration NaOH (M)	Température (°C)	Moyenne rendements des *replicata* (% m/m) (n = 3)
2	0,5	20	7,1 ± 0,5
2	0,5	45	7,2 ± 1,5
2	0,5	65	8,1 ± 0,6
2	1	20	6,4 ± 0,4
2	1	45	6,9 ± 0,3
2	1	65	8,2 ± 1,5
2	1,75	20	6,1 ± 0,9
2	1,75	45	6,3 ± 2,6
2	1,75	65	8,4 ± 1,1
4	0,5	20	6,8 ± 0,7
4	0,5	45	7,9 ± 0,1
4	0,5	65	8,3 ± 0,2
4	1	20	6,9 ± 0,2
4	1	45	8,2 ± 0,6
4	1	65	9,2 ± 0,8
4	1,75	20	6,6 ± 0,5
4	1,75	45	7,6 ± 1,1
4	1,75	65	9,6 ± 0,8
6	0,5	20	7,2 ± 1,1
6	0,5	45	8,0 ± 0,2
6	0,5	65	7,9 ± 1,7
6	1	20	6,8 ± 0,5
6	1	45	8,2 ± 0,2
6	1	65	9,8 ± 0,6
6	1,75	20	6,3 ± 0,6
6	1,75	45	8,1 ± 0,5
6	1,75	65	9,4 ± 0,5



©Fanny Charlier

Figure 16 : Extraits obtenus avec une durée d'extraction de 6 h et 0,5 M de NaOH éthanolique à 45 °C (**1**) et 1,75 M de NaOH éthanolique 95 % à 65 °C (**2**).

2.2.2 Dosage de l'acide ursolique

Il est important de noter que la teneur relative de l'acide ursolique évaluée avant les travaux d'optimisation de la méthode 3 est différente de celle obtenue lors des premiers tests comparatifs (Tableau 14). Cela est dû, tout comme pour le rendement en extrait total, aux changements apportés à l'extraction (partie 2.1 - 2.1.2 section c - Tableau 9).

Tableau 14 : Résumé des teneurs moyennes des 81 extractions de la méthode optimisée pour *R. groenlandicum* - AU : acide ursolique

Durée (h)	Concentration NaOH (M)	Température (°C)	Teneur relative en AU (mg/g d'extrait)
2	0,5	20	328 ± 12
2	1	20	333 ± 13
2	1,75	20	401 ± 8
2	0,5	45	285 ± 6
2	1	45	296 ± 8
2	1,75	45	295 ± 4
2	0,5	65	263 ± 16
2	1	65	256 ± 8
2	1,75	65	259 ± 15
4	0,5	20	289 ± 2
4	1	20	328 ± 18
4	0,5	45	293 ± 15
4	1,75	45	315 ± 12
4	0,5	65	256 ± 17
4	1	65	272 ± 7
4	1	45	275 ± 6
4	1,75	20	335 ± 6
4	1,75	65	256 ± 22
6	0,5	20	337 ± 6
6	0,5	45	303 ± 26
6	0,5	65	293 ± 6
6	1	20	319 ± 2
6	1	45	289 ± 8
6	1	65	256 ± 4
6	1,75	20	348 ± 25
6	1,75	45	238 ± 25
6	1,75	65	249 ± 16

a. Tests statistiques

i. Détermination des facteurs significatifs

Afin d'étudier si les facteurs : durée (h), température (°C) et concentration d'hydroxyde de sodium (M) influençaient le rendement d'extraction de l'acide ursolique, une ANOVA à 3 facteurs fixes a été réalisée avec un seuil de confiance de 95 % (Tableau 15). Comme expliqué dans la partie 3.2 - 3.2.1 section c - iv, les valeurs de p ont été corrigées par la méthode d'Holm.[92] Cette analyse a mis en évidence l'existence de facteurs significatifs. En effet, la température influence la teneur en acide ursolique avec une valeur de $p_{corrigé} < 0{,}001$. La durée d'extraction et la concentration d'hydroxyde de sodium ne sont pas significatives. De plus, chacune des interactions doubles est significative pour des valeurs de $p_{corrigé} < 0{,}001$. Il en est de même pour l'interaction triple.

Tableau 15 : Résultats de l'analyse de variance réalisée afin d'évaluer le test des effets de la durée, de la concentration, de la température et de leurs interactions

Variable	Degrés de liberté	Rapport de Fisher	Valeur de p	Valeur de p corrigé[92]
Durée (h)	2	4,87	**0,0114**	0,0230
Concentration (M)	2	2,38	0,1024	0,1024
Durée (h) x Concentration (M)	4	13,3	**< 0,0001**	**< 0,001**
Température (°C)	2	198	**< 0,0001**	**< 0,001**
Durée (h) x Température (°C)	4	8,13	**< 0,0001**	**< 0,001**
Concentration (M) x Température (°C)	4	13,6	**< 0,0001**	**< 0,001**
Durée (h) x Concentration (M) x Température (°C)	8	4,76	**0,0002**	**< 0,001**
Résidus	54			
Total corrigé	80			

ii. Interprétation de l'interaction triple

L'interaction triple[c] étant significative ($p_{corrigé} < 0,001$), elle est prioritaire pour l'interprétation des analyses. Un test de comparaison multiple DSH de Tukey a été réalisé afin d'établir s'il y avait des différences significatives entre les différents niveaux des facteurs (Figure 17). L'effet des combinaisons sur la teneur relative en acide ursolique dans les extraits a été difficile à interpréter en raison des liens entre les différentes conditions qui permettent d'extraire différents composés. Cela se traduit sur la Figure 17 par le croisement des différents niveaux.

Tenant compte des résultats obtenus par Salimon et *al*, il a été supposé qu'une concentration d' hydroxyde de sodium à 1,75 M à une température de 65 °C

[c] En statistiques, l'interaction triple définit l'influence de l'effet de deux facteurs sur un troisième selon leur valeur prise.

favoriserait, peu importe la durée, l'hydrolyse des esters d'acides gras et donc l'obtention d'extraits plus riche en acide gras et ainsi avec une teneur plus faible en acide ursolique.[87] Ainsi, il a donc été supposé qu'une plus faible concentration en hydroxyde de sodium et une plus faible température d'extraction favoriserait l'obtention d'extrait enrichi en acide ursolique. Toutefois, l'analyse de l'interaction triple a permis de conclure que les conditions permettant d'extraire la plus grande teneur relative d'acide ursolique sont 20 °C, 2 h et 1,75 M d'hydroxyde de sodium éthanolique, et que la combinaison de l'ensemble de ces facteurs contribue à l'optimum. Cela ne corrobore pas l'hypothèse émise spécifiant que l'extrait le plus enrichi en acide ursolique serait obtenu à plus faible concentration en hydroxyde de sodium. Concernant la moins bonne combinaison, elle s'est révélée être 45 °C, 6 h et 1,75 M d'hydroxyde de sodium éthanolique. Toutefois, le test DSH de Tukey a mis en évidence le fait que les différents niveaux sont liés entre eux, notamment par une ou plusieurs lettres car ils ne sont pas statistiquement différenciables (ANNEXE 4). C'est pourquoi, il a été choisi d'étudier les différences significatives pour un même niveau de température et de durée (Figure 17). Ces derniers sont marqués d'une astérisque. À titre d'exemple, à 20 °C pour une durée de 4 h, le niveau 0,5 M a été significativement différent des autres et cette combinaison s'est révélée être la combinaison fournissant la plus faible teneur d'acide ursolique. Au contraire, à 65 °C pour une durée de 6 h, la teneur extraite pour cette même concentration (0,5 M) a été significativement différente des autres et cette combinaison a permis l'extraction de la plus forte teneur en acide ursolique pour ce même niveau.

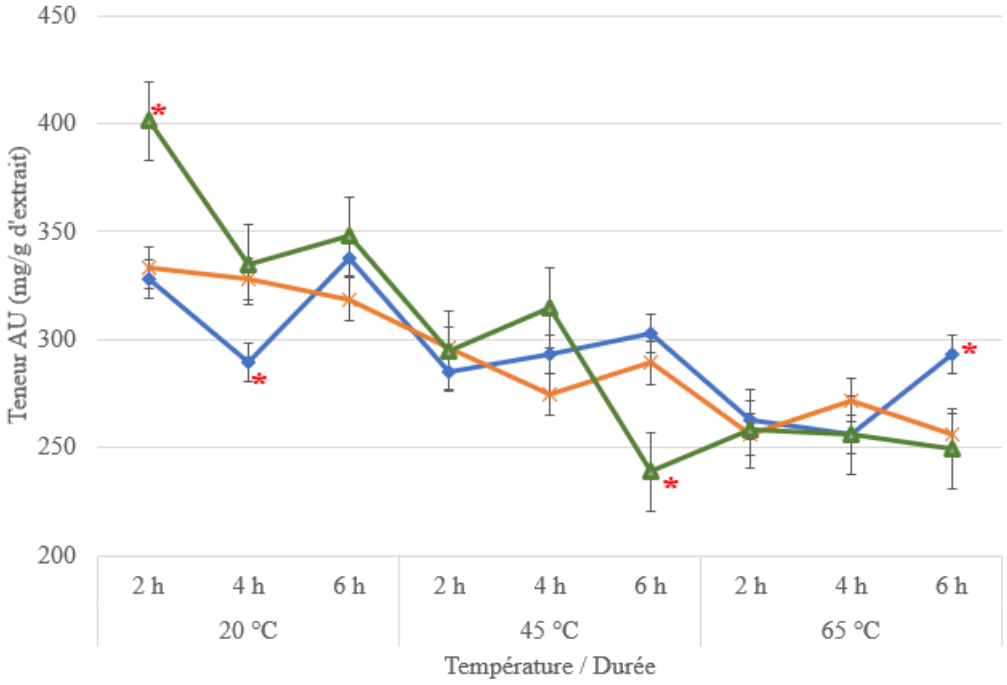


Figure 17 : Teneurs relatives en acide ursolique extrait en fonction de la température, de la durée et de la concentration de NaOH éthanolique 95 % : ▲ 1,75 M, × 1 M et ♦ 0,5 M - AU : acide ursolique. Moyennes ± erreurs types. Les astérisques rouges indiquent des différences significatives (DSH de Tukey) pour un même niveau de température et de durée.

iii. Effet général des facteurs

Influence du facteur température

La teneur relative en acide ursolique variant avec les 3 facteurs, l'effet général a été étudié. Conséquemment, l'estimation de variation des composants a été examinée (Tableau 16). La température s'est révélée être le facteur influençant le plus la teneur

des extraits en acide ursolique. En effet, ce dernier a été responsable de 32 % de la variation, contre 14 % pour l'interaction triple. Les interactions doubles ont expliqué la variation à 9,9 % pour l'interaction durée / température, 13 % pour l'interaction concentration / température et 14 % pour l'interaction durée / concentration. Les résidus ont influencé le résultat à 13 % tandis que la concentration et la durée seule, facteurs qui étaient tous deux non significatifs, ont influencé respectivement à 1,8 % et à 3,8 %. En vue de leur impact sur la variance, la température et les interactions doubles ont été étudiées pour émettre des hypothèses sur ce qui a pu se produire pendant l'optimisation. Sans ces études, il ne serait pas possible d'émettre des hypothèses quant à son déroulement.

Tableau 16 : Estimation des variations des composantes de la durée, de la concentration, de la température, des différentes interactions et des résidus

Source de variation	Pourcentage de variation (%)
Durée	3,8
Concentration	1,8
Température	32
Durée x Concentration	14
Durée x Température	9,9
Concentration x Température	13
Durée x Concentration x Température	14
Résidus	13

Un test de comparaisons multiples DSH de Tukey a permis de mettre en évidence le fait que les trois niveaux de températures ont été significativement différents les uns des autres (Figure 18) et que 20 °C a été le niveau avec la teneur en acide ursolique la plus élevée et 65 °C la plus basse, et ce quelle que soit la durée de l'extraction ou la concentration d'hydroxyde de sodium utilisée. Le milieu d'extraction étant basique, il a été supposé que la réaction parasitaire principale à l'extraction de l'acide ursolique

est l'hydrolyse des lipides présents dans les tissus végétaux et ainsi l'extraction des acides gras due à leur propriété de précipitation par acidification. En effet, selon cette hypothèse, lors de l'extraction de l'acide ursolique, les conditions utilisées ont pu favoriser l'hydrolyse de lipides générant alors des acides gras plutôt que l'acide ursolique ou en plus de celui-ci. Dans ce cas précis, la température est un facteur de solubilité important, en plus d'être un facteur d'hydrolyse. En effet, si une extraction à température ambiante est réalisée, alors l'hydrolyse nette des esters d'acide gras est plus faible, voire inexistante et leur solubilité ainsi que celle des acides gras est également faible ce qui permet alors l'extraction majoritaire de l'acide ursolique.[94] Cela pourrait expliquer le fait que la température est le facteur le plus influent de cette optimisation. Cela se traduit par des meilleures teneurs d'acide ursolique à 20 °C. Afin de corroborer ces résultats, l'étude des différents rendements d'extraction a été réalisée (Tableau 13). Elle a mis en évidence le fait que les rendements d'extraction les plus élevés sont associés à la condition 65 °C tandis que les rendements les plus faibles sont obtenus à 20 °C. Ceci confirmerait le fait qu'à 65 °C des composés supplémentaires, comme des acides gras seraient extraits, ce qui augmenterait ainsi le rendement. Il est important de noter que même si les rendements à 20 °C sont plus faibles, les extraits sont enrichis en acide ursolique, ce qui permet d'obtenir avec une pureté plus importante. De plus, pour toutes températures confondues, en raison de la couleur des extraits (Figure 16), la chlorophylle semble ne pas avoir été extraite. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'à cette température, lors de l'étape d'enrichissement en milieu acide, l'acide ursolique a précipité alors que ce ne serait pas le cas de la chlorophylle ou son résidu hydrolysé.

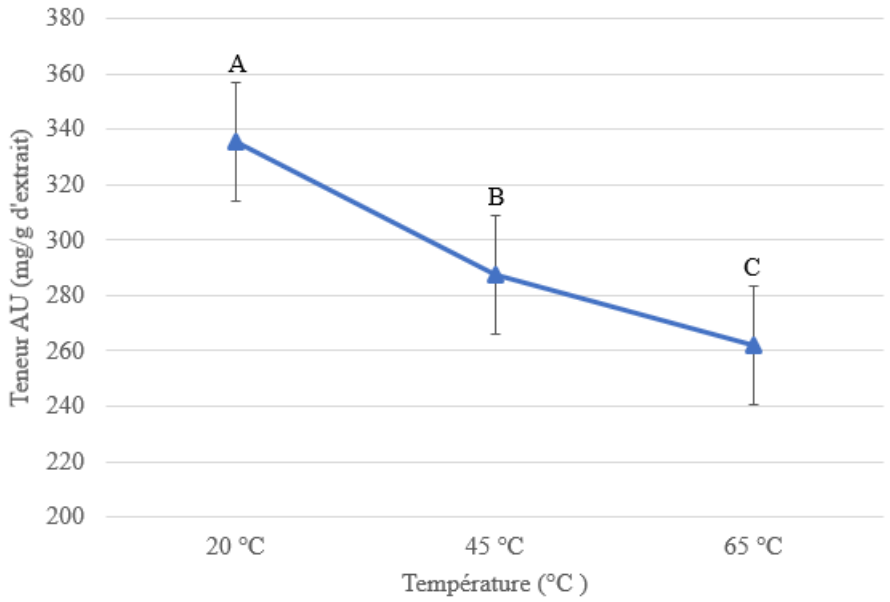


Figure 18 : Teneurs relatives de l'acide ursolique extrait en fonction de la température d'extraction ▲ pour toutes durées et concentration d'hydroxyde de sodium confondues - AU : acide ursolique. Moyennes ± erreurs types. Les lettres différentes indiquent des différences significatives (DSH de Tukey).

Influence des interactions température / durée et température / concentration

En ce qui concerne l'effet de l'interaction de la température avec la durée d'extraction, un test de comparaison multiple DSH de Tukey, présenté à la Figure 19, a permis de les différencier par niveaux pour toutes concentrations en hydroxyde de sodium confondues. Il en est ressorti qu'une extraction à 20 °C, quelle que soit la durée, a permis d'obtenir une teneur en acide ursolique relative significativement différente qu'à 45 °C et 65 °C. Toutefois, l'interaction température / durée reste une interaction complexe car les différentes teneurs obtenues, toutes concentrations d'hydroxyde de sodium confondues, ont été influencées de manière aléatoire en fonction de la durée (ANNEXE 5).

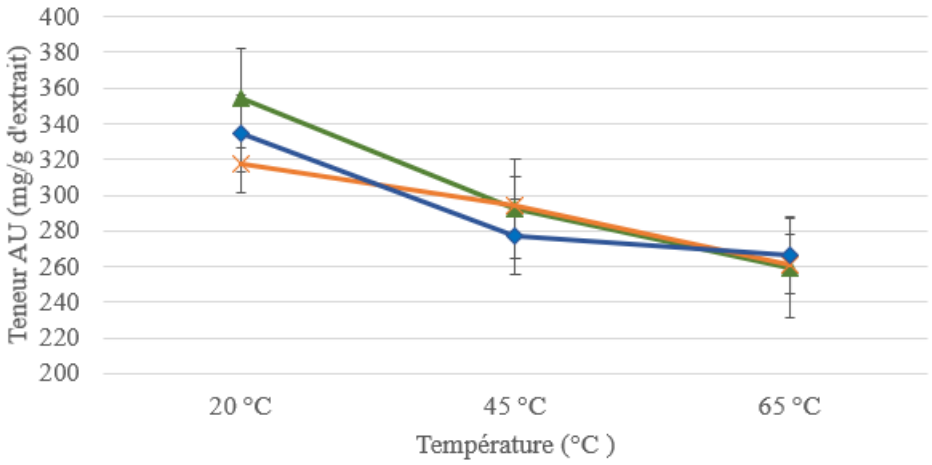


Figure 19 : Teneurs relatives de l'acide ursolique extraits en fonction de la température et de la durée d'extraction : ▲ 2 h, × 4 h et ♦ 6 h pour toutes concentrations d'hydroxyde de sodium confondues - AU : acide ursolique. Moyennes ± erreurs types.

Un autre test de comparaison multiple DSH de Tukey a permis de distinguer l'effet des différents niveaux d'interaction de la température avec la concentration de la solution d'hydroxyde de sodium. D'après la Figure 20, à 20 °C, une grande concentration en hydroxyde de sodium a permis d'obtenir des extraits plus enrichis significativement différents (*) qu'avec des concentrations de 0,5 M et 1 M. Toutefois, à 45 °C et à 65 °C, des concentrations plus faibles d'hydroxyde de sodium ont permis d'obtenir des extraits plus enrichis (ANNEXE 6). Comme mentionné précédemment, en plus des facteurs de solubilité, l'une des réactions parasitaires peut alors être l'hydrolyse des esters d'acides gras. En plus d'être possiblement dépendante de la température, cette réaction s'inscrit également dans la durée. En effet, elle pourrait expliquer la différence de teneurs aux différents temps d'extraction à 20 °C. Le fait que la température associée à la concentration a un effet sur la teneur relative d'acide

ursolique extraite peut être dû au fait que la solubilité liée à la température présenterait un facteur plus important que l'hydrolyse des lipides. Il est ainsi possible qu'à 20 °C, la concentration d'hydroxyde de sodium éthanolique la plus élevée (1,75 M) permette de mieux déprotoner l'acide ursolique, favorisant alors sa solubilité, c'est-à-dire son passage dans l'éthanol et sa récupération par précipitation lors de l'acidification. Cependant, si la concentration en hydroxyde de sodium (Tableau 16) influence le moins l'obtention d'extrait enrichis en acide ursolique ainsi que l'extraction d'acides gras, cela pourrait s'expliquer par le fait que les concentrations étudiées sont supérieures à celles utilisées pour la saponification, qui sont usuellement comprises entre 0,1 M et 0,5 M.[95] C'est pourquoi les modifications effectuées n'influencent pas les teneurs relatives. Toutefois, l'interaction de la concentration avec la température marque une différence dans les extraits enrichis.

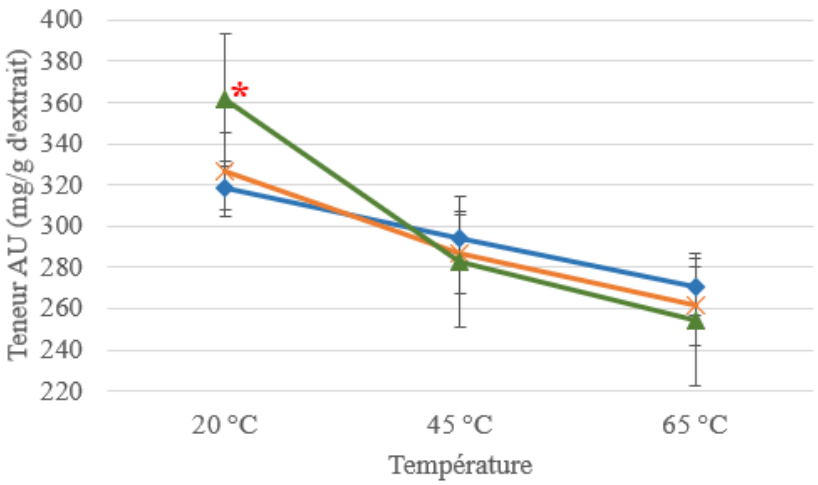


Figure 20 : Teneurs relatives de l'acide ursolique extrait en fonction de la température et de la concentration de NaOH éthanolique 95 % : ♦ 0,5 M, × 1 M et ▲ 1,75 M pour toutes durées confondues - AU : acide ursolique. Moyennes ± erreurs types. L'astérisque rouge indique une différences significatives (DSH de Tukey) à 20 °C.

b. Analyse qualitative des différents extraits

En vue d'étudier la composition des extraits selon les différents paramètres d'extraction, des analyses par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) et à un détecteur à ionisation de flamme GC-FID ont été réalisées. Dans un premier temps, une analyse GC-MS a été réalisée sur l'extrait obtenu par la méthode 3 non optimisée (ANNEXE 7). Cette analyse a permis de mettre en évidence, à l'aide de la correspondance avec le MS, la présence d'acides gras communs - comme l'acide palmitique - mais aussi de dérivés d'acides gras non identifiés avec certitude, ou encore de triterpénoïdes tels que l'α-amyrine et la β-amyrine. Ce sont ces composés qui ont été comparés dans les différents extraits obtenus selon les différents niveaux de facteurs.

i. Composition des extraits «2 h, 1,75 M, 20 °C » par rapport à «6 h, 1,75 M, 45 °C »

L'analyse des chromatogrammes obtenus par GC-FID, présentés Figure 21, de l'extrait présentant la plus grande teneur (**1**) et la plus faible teneur (**2**) en acide ursolique a permis de mettre en évidence que les pourcentages des composés varient d'un extrait à l'autre, notamment en ce qui concerne les acides gras, leurs dérivés et les triterpènes. Les différences ont été évaluées qualitativement par normalisation de surface des pics. Il s'agit d'une méthode qui suppose les concentrations des composés équivalentes aux pourcentages de surfaces des pics considérés. L'extrait **2** possède en effet 2 fois plus d'acide palmitique (composé **a)** et en moyenne 1,3 fois plus de dérivés d'acides gras (composé **b**, **c et d**) que l'extrait **1**. Au sujet des triterpènes et triterpénoïdes (composés **e**, **f**, **g** et **i**), ils sont à l'inverse en moyenne 1,3 fois plus présents dans l'extrait **1** que **2**. Même si la variation des concentrations en dérivés d'acides gras reste faible, cela a permis de démontrer que l'augmentation des facteurs

durée et température a entraîné dans les extraits une extraction supplémentaire d'acides gras et de leurs dérivés mais aussi que les conditions propices à l'extraction de l'acide ursolique (2h, 1,75 M, 20 °C) ont également permis celle d'autres triterpénoïdes et triterpènes. De plus, il est intéressant de noter que les α-amyrine (composé **f**) et β-amyrine (composé **e**) sont extraits dans des ratios similaires quelles que soient les conditions utilisées.

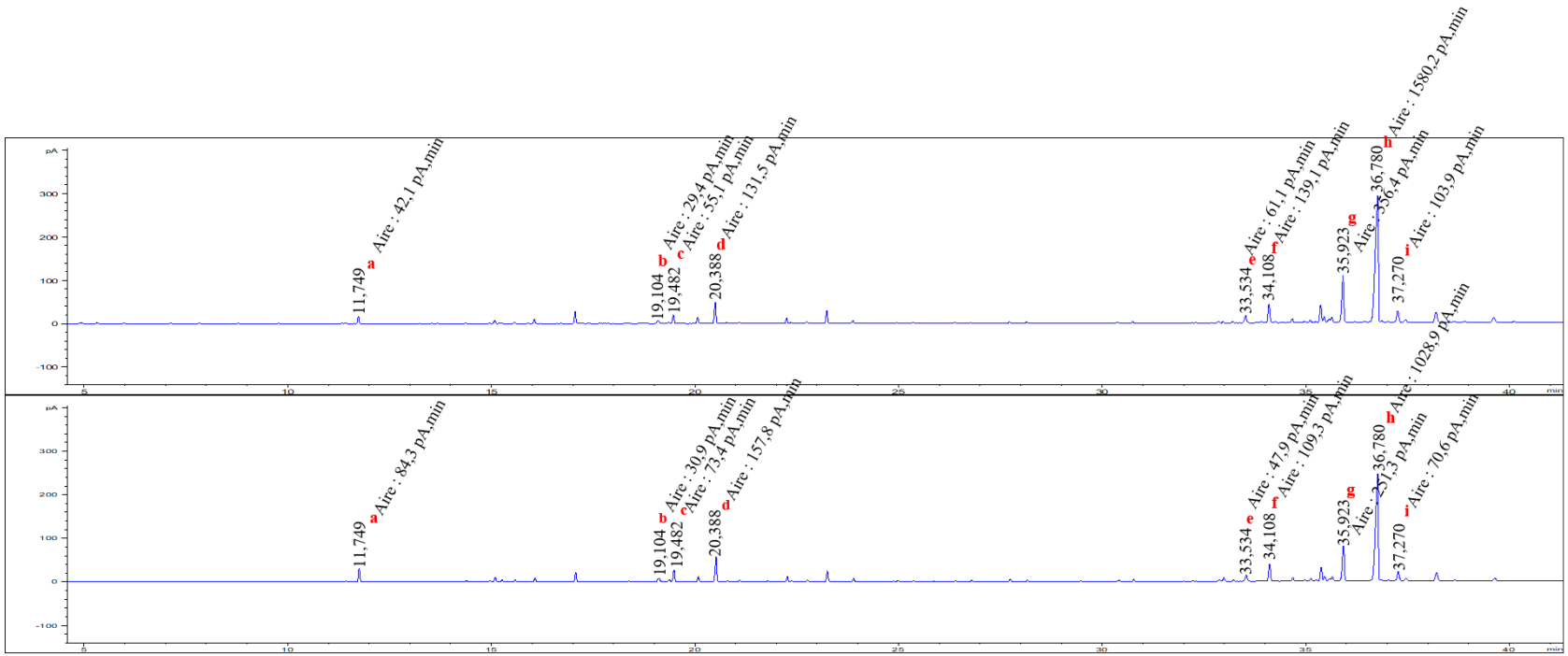


Figure 21 : Chromatogrammes de GC- FID des extraits obtenus pour 1,75 M d'hydroxyde de sodium éthanolique à 20 °C en 2 h **(1)** et à 45 °C en 6 h **(2)**.

ii. Influence de la température

L'analyse des chromatogrammes obtenus par GC-FID (Figure 22) des extraits obtenus à durée fixe d'extraction de 2 h, concentration fixe de 1,75 M de NaOH et température variable : 20 °C (**1**), 45 °C (**2**) et 65 °C (**3**) a permis de mettre en évidence que la présence d'acide palmitique (composé **a)** a varié avec la température. En effet, la normalisation des surfaces de pics ont permis d'établir que dans l'extrait **3** à 65 °C, il y a eu 2 fois plus de composé **a** que dans l'extrait **1** à 20 °C. Cependant, à 20 °C et à 45 °C, le pourcentage du composé **a** n'a pas été différent tandis que les composés **c** et **d** ont été en moyenne 1,2 fois plus présents dans l'extrait **2** dès 45 °C par rapport à 20 °C. Cela signifie que l'extraction des dérivés d'acides gras (**c** et **d**) semble avoir été favorisée dès 45 °C et celle des acides gras (**a**) entre 45 °C et 65 °C, limitant ainsi la proportion de l'acide ursolique. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Salimon et *al*,[87] et confirme les hypothèses émises à partir des travaux de Salimon et *al* spécifiant que l'hydrolyse des esters d'acides gras a été favorisée à haute température ainsi que leur faible solubilité à 20 °C.[87]

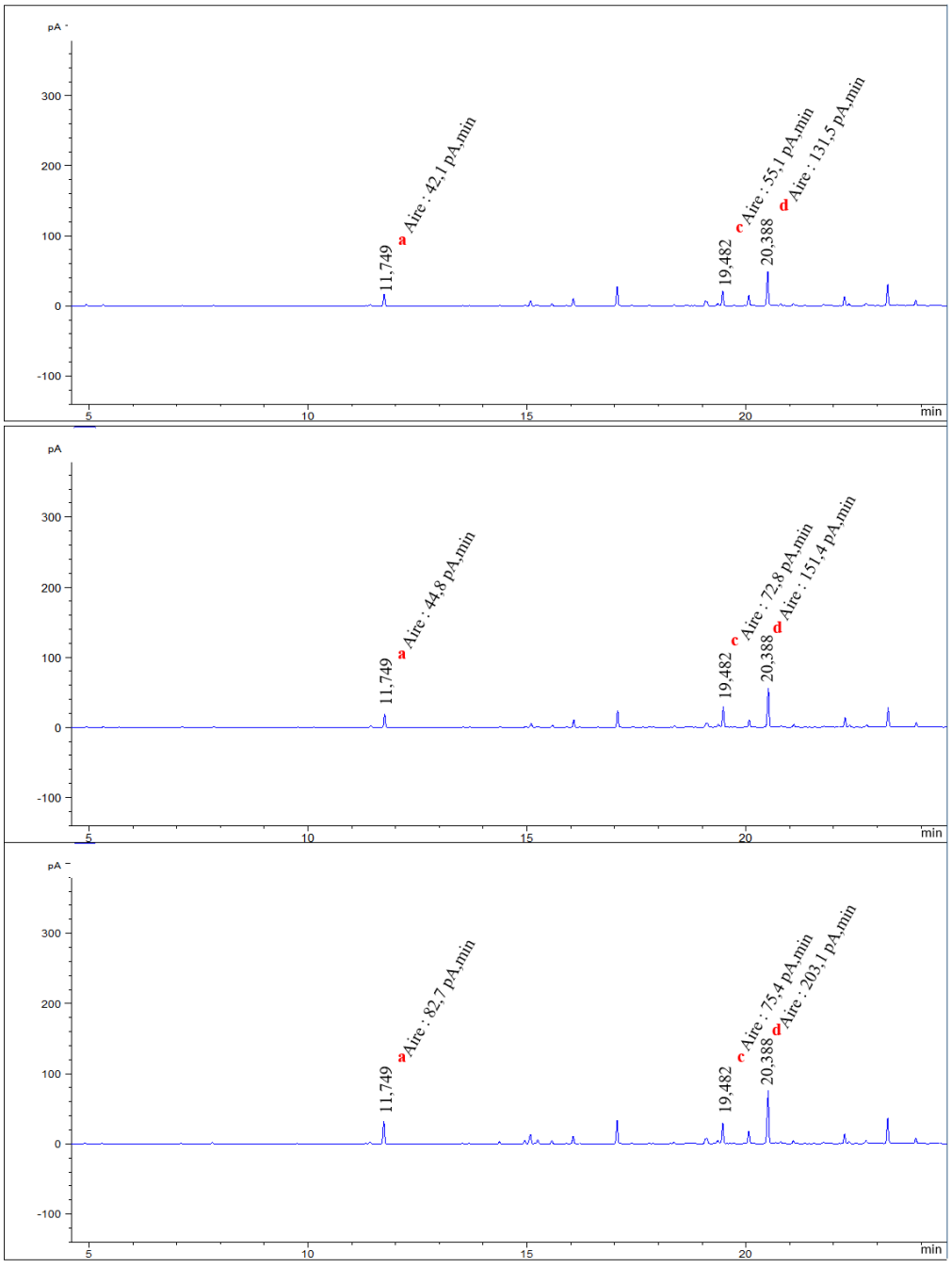


Figure 22 : Chromatogrammes de GC- FID des extraits obtenus en 2 h avec 1,75 M d'hydroxyde de sodium éthanolique à 20 °C (**1**), 45 °C (**2**) et 65 °C (**3**).

2.3 Évaluation de l'efficacité de la méthode d'extraction optimisée pour extraire l'acide ursolique de différents *Ericaceae*

2.3.1 *Extraction de Kalmia angustifolia, Gaultheria procumbens, Arctostaphylos uva-ursi*

La méthode 3 optimisée a été appliquée à trois autres Éricacées recensées dans la littérature pour leur production de triterpènes, et notamment d'acide ursolique, pour évaluer son efficacité sur d'autres Éricacées.[43, 96-98] Afin de vérifier si la méthode 3 optimisée augmente également la teneur relative en acide ursolique dans les extraits, elle a été comparée à la méthode 1 réalisée avec de l'éthanol 95 % et du méthanol. Les extraits ont donc été obtenus selon les conditions respectivement établies partie 3.2 - 3.2.1 section a et partie 2.2 - 2.2.2 section a.

a. Analyse des extraits obtenus

La méthode 1 a donné pour les trois espèces un extrait de couleur vert foncé, que ce soit à l'éthanol ou au méthanol, tandis que la méthode 3 a permis d'obtenir un extrait beige clair pour le *Kalmia* et l'*Arctostaphylos* et un extrait marron pour la *Gaultheria.* Les rendements moyens des trois espèces sont également différents selon la méthode d'extraction utilisée (Tableau 17).

Tableau 17 : Résumé des rendements d'extraction selon les méthodes pour *K. angustifolia*, *A. uva-ursi*, *G. procumbens*

	Rendement (% m/m)		
	K. angustifolia	*A. uva-ursi*	*G. procumbens*
Méthode 1 EtOH 95 %	14,3 ± 1,0	12,7 ± 2,8	10,8 ± 0,9
Méthode 1 MeOH	28,7 ± 2,6	21,5 ± 2,9	17,2 ± 1,2
Méthode 3 optimisée	4,1 ± 0,6	5,4 ± 0,3	2,8 ± 0,0*

* *:* moyenne réalisée sur 2 extraits en raison d'une perte lors de la centrifugation

L'extraction par la méthode 1 avec le méthanol a permis, pour les trois espèces, d'obtenir un meilleur rendement suivi de près par la méthode 1 utilisant l'éthanol 95 %. La plante ayant les meilleurs rendements pour la méthode 1 avec le méthanol ou avec l'éthanol 95 % a été *K. angustifolia*. Pour la méthode 3, le meilleur résultat a été obtenu avec l'*A. uva-ursi*, avec un rendement de 5,4 % m/n. Cependant, la méthode 1 avec le méthanol et l'éthanol 95 % entrainent l'extraction de nombreux composés autres que l'acide ursolique, ce qui peut donner une fausse impression d'efficacité. Par exemple, *K. angustifolia* présente un rendement de 4,1 % m/m selon la méthode optimisée. Ce rendement pourrait être jugé faible mais si sa composition est majoritairement de l'acide ursolique, alors cela pourrait compétitionner les rendements plus élevés dont la composition serait plus dispersée. Un dosage de l'acide ursolique dans ces extraits ainsi qu'une analyse de leur composition a donc été fait afin d'évaluer la pertinence de la méthode d'extraction 3 optimisée sur ces Éricacées.

b. Analyse qualitative par CCM

Les extraits des trois Éricacées ont été analysés par CCM suivant les conditions établies pour le thé du Labrador (Partie 2.1 - 2.1.1 section a). L'analyse dans un milieu apolaire a permis de valider la présence d'acide ursolique (encadré violet) et a permis

d’observer visuellement des différences du niveau de l’abondance de certains composés apolaires (Figure 23). Cette première analyse chromatographique suggère que pour les trois plantes, l’acide ursolique est enrichi dans les extraits obtenus par la méthode 3 optimisée.

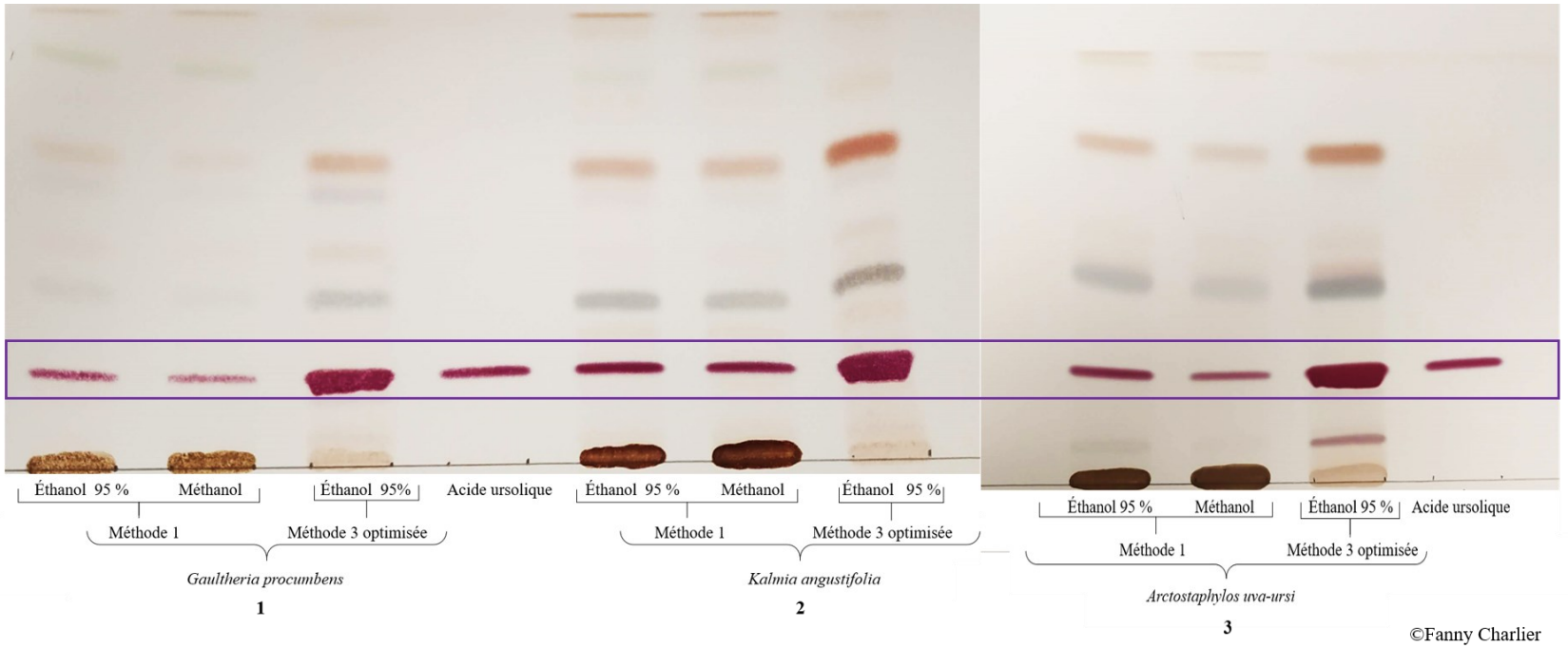


Figure 23 : CCM récapitulative des différentes extractions pour *Gaultheria procumbens* (**1**) (10 µL déposé), *Kalmia angustifolia* (**2**) (15 µL déposé) et *Arctostaphylos uva-ursi* (**3**) (15 µL déposé) - milieu chloroforme-méthanol (80-1) - détection après révélation avec H_2SO_4 à 20 % dans le méthanol et chauffage à 105 °C pendant 5 minutes, observation à la lumière ambiante.

L’analyse dans un milieu plus polaire que la première analyse a été réalisée (Figure 24). Ce milieu a permis de montrer que la composition des différents extraits semble différente dans la partie polaire des extraits (encadré rouge). En effet, la méthode 1 comporte, pour les deux solvants et pour les trois espèces, des taches plus intenses que pour la méthode 3 optimisée. La méthode 3 optimisée a donc permis d’apporter une sélectivité dans l’extraction des composées apolaires.

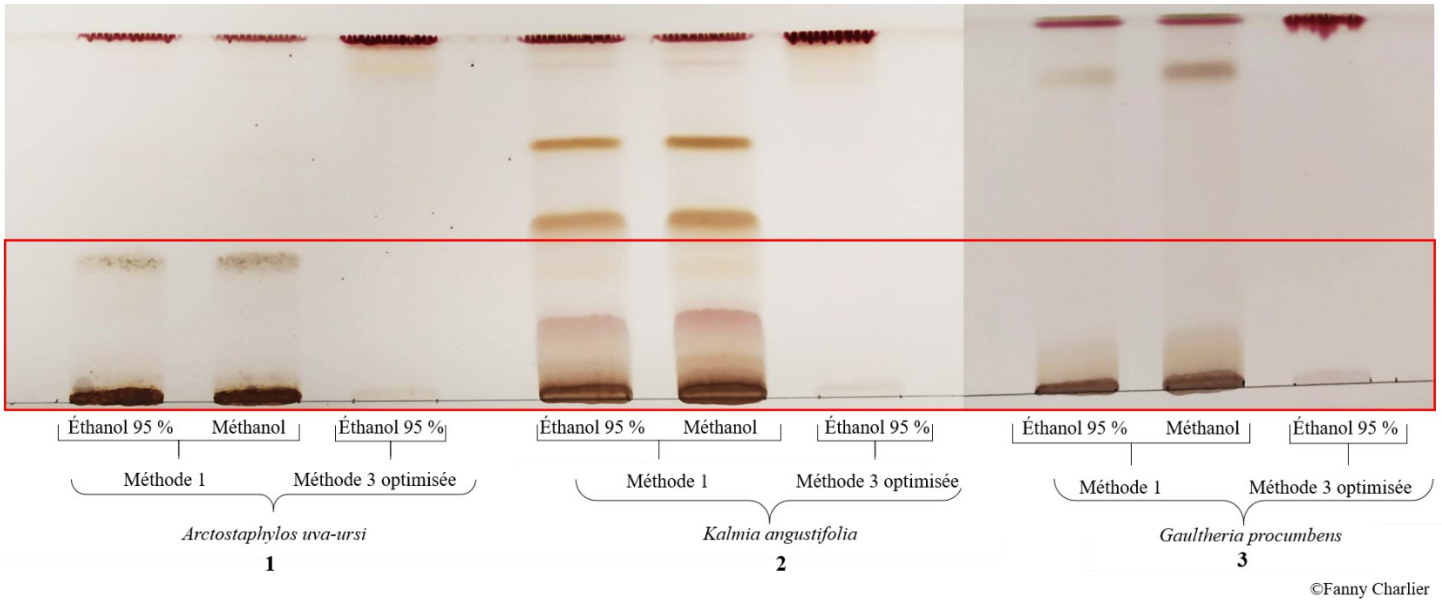


Figure 24 : CCM récapitulative des différentes extractions pour *Arctostaphylos uva-ursi* (**1**) (15 µL déposé), *Kalmia angustifolia* (**2**) (15 µL déposé) et *Gaultheria angustifolia* (**3**) (10 µL déposé) - milieu chloroforme-méthanol (5-1) - détection après révélation avec H_2SO_4 à 20 % dans le méthanol et chauffage à 105 °C pendant 5 minutes, observation à la lumière ambiante.

2.3.2 Dosage de l'acide ursolique par HPLC

Afin d'évaluer l'efficacité de la méthode 3 optimisée pour enrichir les extraits d'Éricacées en acide ursolique, un dosage HPLC a été réalisé sur plusieurs extraits obtenus soit par ultrasons à l'éthanol 95 % et au méthanol soit par la méthode 3 optimisée (partie 2.3 - 2.3.1 section a). La méthode de dosage HPLC ayant été développée sur le thé du Labrador (partie 2.1 - 2.1.2) et la résolution des pics étant identiques à ceux obtenus précédemment, la même méthode a été utilisée telle quelle pour le dosage des différents extraits de *K. angustifolia*, *G. procumbens* et *A. uva-ursi*. Cependant, dans le but de s'assurer de la bonne applicabilité de cette dernière, un contrôle d'effet de matrice a été réalisé sur les trois plantes analysées par un contrôle du taux de recouvrement (Tableau 18). Les valeurs obtenues pour *K. angustifolia* et *G. procumbens* ont montré qu'il n'y a pas eu d'effet de matrice. Le taux de recouvrement, inférieur à 95 %, réalisé pour *A. uva-ursi* a montré qu'il y avait un léger effet de matrice. Ce dernier a été jugé acceptable pour cette approche.

Tableau 18 : Test de recouvrement de l'acide ursolique en fonction de la méthode et du solvant d'extraction pour *K. angustifolia*, *A. uva-ursi* et *G. procumbens* - (254 nm)

		Recouvrement (%)		
	Concentration de la solution d'acide ursolique ajoutée (mg/mL)	*K. angustifolia*	*A. uva-ursi*	*G. procumbens*
Méthode 3 optimisée (éthanol 95 %)	0,630	107,9 ± 1,1	90,7 ± 0,8	100,6 ± 0,2
Méthode 1 (méthanol)		101,8 ± 0,7	93,9 ± 1,3	97,8 ± 1,9

L'analyse des extraits par la méthode analytique décrite partie 3.2 - 3.2.1 section c - ii, a permis, en utilisant la droite d'étalonnage décrite dans le Tableau 6 ,de calculer la teneur relative en acide ursolique dans les extraits obtenus (Tableau 19). Aucun test statistique n'a été réalisé sur les valeurs, mais par observation, il a été possible d'établir que la méthode 3 optimisée a permis d'enrichir notablement les différentes plantes étudiées en acide ursolique par rapport à la méthode 1 extraite avec l'éthanol 95 % ou avec le méthanol. En effet, par rapport à la méthode 1 extraite au méthanol, la méthode 3 optimisée a permis d'obtenir 7 fois plus d'acide ursolique présent dans l'extrait de *K. angustifolia*, 10 fois plus dans *A. uva-ursi* et 12 fois plus pour G. *procumbens*. La méthode 3 optimisée a donc été jugée applicable aux autres Éricacées riches en acide ursolique. Les trois Éricacées ont présenté des teneurs relatives en acide ursolique similaires. Cependant, le rendement d'extraction pour cette même méthode varie d'un Éricacée à l'autre. *Kalmia angustifolia* et *Arctostaphylos uva-ursi* présentent des rendements d'extraction respectif de 4,1 % m/m et 5,4 % m/m, soit deux fois plus que pour *Gaultheria procumbens*. Ce sont donc les deux plantes les plus favorables pour obtenir un extrait à la fois enrichi en acide ursolique et avec un bon rendement.

Tableau 19 : Moyenne des teneurs relatives en acide ursolique (mg/g d'extrait) en fonction du solvant et de la méthode d'extraction pour *K. angustifolia*, *A. uva-ursi* et *G. procumbens* - (254 nm)

	Teneur en acide ursolique (mg/g d'extrait)		
	K. angustifolia	*A. uva-ursi*	*G. procumbens*
Méthode 1 EtOH 95 %	81 ± 3	38± 1	27 ± 1
Méthode 1 MeOH	39 ± 1	28 ± 2	23 ± 2
Méthode 3 optimisée	266 ± 7	269 ± 2	271 ± 8

CHAPITRE 3

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Récolte

Rhodondendron groenlandicum (29 septembre 2015), *Kalmia angustifolia* (4 et 8 juillet 2019), *Gaultheria procumbens* (20 août 2019) et *Arctostaphylos uva-ursi* (12 juillet 2019) ont été récoltés par Luc Godin, biologiste. Les différentes récoltes ont été réalisées au Saguenay-Lac-Saint-Jean comme indiqué à la Figure 25.

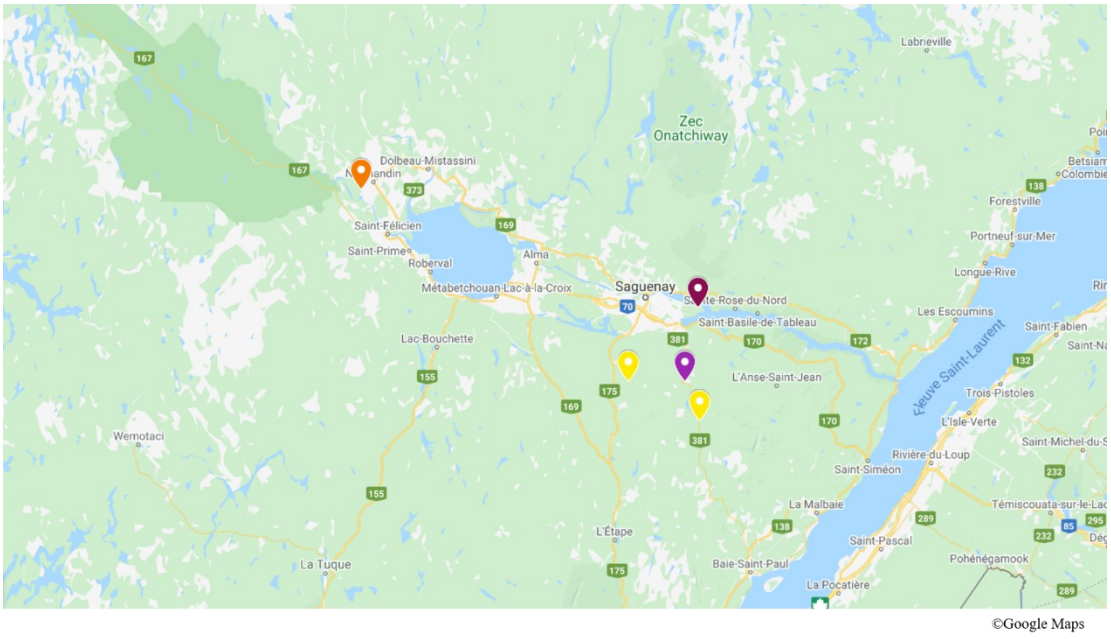


Figure 25 : Localisation des différents lieux de récolte - : *R. groenlandicum*, : *K. angustifolia*, : *G. procumbens*, : *A. uva-ursi.*

3.2 Solvants, réactifs et standards

Les solvants utilisés pour les extractions étaient de grade de la société américaine de chimie (ACS). Le méthanol et l'éthanol 95 % ont été fournis par Fisher Scientific (Toronto, ON, Canada). L'eau a été distillée et déminéralisée. L'acide chlorhydrique à 37 % en solution dans de l'eau également de grade ACS a été fourni par Fisher Scientific (Toronto, ON, Canada) et les perles d'hydroxyde de sodium de pureté 97 % par Oakwood Chemical (Estill, SC, Etats-Unis). Le standard de l'acide ursolique de pureté 99.27 % a été acheté chez Calbiochem® (Temecula, CA, États-Unis).

Les solvants utilisés pour les analyses HPLC (méthanol et acétonitrile) étaient de grade HPLC et ont été achetés chez Fisher Scientific (Toronto, ON, Canada). Les extraits et le standard ont été dilués dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) acheté chez Fisher Scientific (Toronto, ON, Canada).

3.3 Analyses analytiques

3.3.1 CCM

Les plaques utilisées, de la marque Millipore Sigma fournies par VWR (Mississauga, ON, Canada), étaient de phase normale. Il s'agissait de plaques de gel de silice d'épaisseur 200 µm, de pores 60 Å et d'indice de fluorescence F254. Les plaques CCM ont été visualisées et photographiées sous lumière ultraviolet à 254 nm et à 365 nm à l'aide d'un cabinet Chromato-Vue® C-75 (UVP) grâce au logiciel DocItLS. La révélation des plaques a été faite par pulvérisation à l'acide sulfurique à 20 % v-v dans du méthanol de grade ACS (H_2SO_4 20 %), puis par chauffage pendant 10 min à 100 °C dans un four Heratherm^{TM} (Thermo Scientific). Cette méthode de révélation a permis

de mettre en évidence les composés triterpéniques de couleur rose à pourpre en lumière visible après chauffage.

3.3.2 HPLC-MS

La préparation des échantillons a été réalisée à l'aide de micropipettes Finnpipette® F2 allant de 2 à 20 µL et de 100 à 1000 µL, ou à l'aide de fioles jaugées de 5 mL ± 0,025 mL et de 10 mL ± 0,025 mL. Les solvants utilisés étaient soit le méthanol pour l'analyse qualitative soit le DMSO pour le dosage. Elles ont été filtrées avec des filtres HPLC SYR de 0,45 µm de diamètre de pores et ont été transférées à l'aide de seringues de 1 mL dans des vials HPLC ambrés de 2 mL, fournis par Canadian Life Science (Peterborough, ON, Canada).

L'HPLC utilisée était un appareil Agilent de série 1100, sauf pour les modules de dégazage et d'injection où il s'agissait de modules de série 1200. Il était composé d'un compartiment à colonne (G1316A), d'un module de détection à barrette d'iodes (G1315B) et d'une pompe avec un cabinet à solvant (G1310A) équipé d'un dégazeur (G1379B). Le spectromètre de masse associé était de marque Agilent de série (G1956B) et le mode d'ionisation utilisait une méthode par électrospray et par ionisation chimique à pression atmosphérique particulière. L'appareil était un quadrupole. Les phases stationnaires étaient une colonne Kinetex® C18 (A) de taille de pores 100 Å, de longueur et de diamètre intérieur 250 x 4,6 mm, et de taille de particules 5 µm reçue le 31/07/2019, une colonne Thermo Scientific™ Hypersil Gold (B) de dimension 250 x 4,6 mm et de taille de particules 5 µm pour une taille de pore de 100 Å reçu le 05/05/2015 et une dernière colonne Kinetex® C18 polaire (C), reçue le 26/06/2019, de même taille de pores que les précédentes, mais de longueur et diamètre intérieur 150 x 4,6 mm et de taille de particules 2,6 µm.

3.3.3 GC-MS et GC-FID

La préparation des échantillons a été réalisée suivant la même procédure que pour l'HPLC-MS sans l'étape de filtration. Cette méthode a été suivie d'une méthylation à l'aide d'une solution d'hydroxyde de triméthylsulfonium (TMSH) à environ 0,25 M mélangée en proportion égale avec la solution méthanolique de l'extrait et chauffé rapidement à 40 °C dans un bain-marie pendant 1 à 2 min. Les analyses GC-MS et GC-FID ont été réalisées à l'aide d'un appareil Agilent Technologies 7890A (G3440A) associé pour la GC-MS à un MS Agilent Technologies 5975C (G3174A). Les colonnes utilisées pour la GC-MS et GC-FID ont été installées en 2019. Il s'agissait de colonne Agilent de type DB-5, de 30 m de longueur avec un diamètre de 0,25 mm et des particules de 0,25 µm. Le gaz vecteur était l'hélium à un débit constant de 20 mL/min. La méthode utilisée était une méthode sur 45 min, partant avec un palier de 5 min à 175 °C puis augmentant de 5 °C/min jusque 325 °C. Cette température finale a été maintenue pendant 10 min. Afin d'améliorer la qualité des pics, un split de 20 pour 1 était utilisé pour un volume d'injection de 1,0 µL. Le délai de solvant était de 2 minutes.

3.4 Appareils complémentaires

Le broyeur utilisé pour toutes les plantes était un Universal cutting mill pulvérisette 19 de marque Fritsch. Le tamis utilisé contenait des perforations de 4 mm de diamètre.

Afin de peser les échantillons avec une précision de 4×10^{-4} g, une balance Mettler Toledo (Mississauga, ON, Canada) de type New classic MF (MS304S/c3) a été utilisée.

Les extractions assistées par ultrasons ont été réalisées à l'aide d'un appareil à ultrasons de modèle FS220D qui provient de Fisher Scientific (Toronto, ON, Canada). Seul le mode *set sonic* à 250 W a été appliqué.

Le montage de type reflux a d'une part été réalisé à l'aide d'un ballon bi-col avec un thermomètre et chauffé à l'aide d'une mante chauffante thermostatée, et d'autre part dans un ballon uni-col à l'aide d'une plaque Ika® RCT basic chauffante thermostatée avec thermomètre intégré, modèle RCT B S1.

La centrifugeuse utilisée était une Hettich zentrigugen Rotofix 32 D-78532. La rotation était de 4000 rpm pour une durée de 20 minutes pour chaque centrifugation. Afin de sécher les extraits obtenus, un lyophilisateur Labconco Corporation a été utilisé.

3.5 Tests statistiques

Les tests statistiques et différents graphiques ont été réalisés à l'aide des logiciel JMP® 15, PRIMER-e 7 et Excel.

3.6 Procédures

3.6.1 Comparaison des différentes méthodes d'extraction

a. Extractions

Trois méthodes d'extraction ont été testées préliminairement. Afin de comparer la teneur en acide ursolique en fonction du solvant et de la méthode d'extraction, un

plan d'expérience a été réalisé (Figure 26). Pour ce faire, environ 15 g de feuilles de *R. groenlandicum* broyées ont été pesés pour chaque procédure décrite dans le Tableau 20. La méthode 1 a consisté en une extraction assistée par ultrasons, la 2 par une extraction précédée d'un traitement alcalin aqueux suivi d'une extraction selon la méthode 1 et la méthode 3 une extraction alcaline éthanolique suivi d'une acidification. Pour chaque méthode, le volume de solvant utilisé a été de 225 mL. Pour l'acidification un volume de 150 mL d'acide chlorhydrique a été utilisé. Après extraction, les méthodes 1 et 2 ont été suivies d'une filtration sur Büchner. La méthode 1 a été suivie d'une évaporation à sec tandis que les résidus récupérés de la méthode 2 ont été séchés à l'air libre pendant 2 jours puis réextraits suivant le processus de la méthode 1. Les extraits secs des méthodes 1 et 2 ont été stockés dans un réfrigérateur à 3 °C. La méthode 3, quant à elle, a été suivie d'une évaporation laissant un dixième du solvant de départ. Ce dernier a ensuite été acidifié avec 50 mL d'une solution d'acide chlorhydrique à 4 mol/L dans de l'eau déminéralisée. L'extrait acidifié a été réfrigéré pendant 1 heure à 3 °C puis a été centrifugé afin d'éliminer le surnageant. Le précipité a ensuite été trituré avec de l'eau déminéralisée puis décanté à l'aide de la centrifugeuse, une procédure répétée jusqu'à obtenir un pH d'environ 4 ou 5 dans le surnageant. Une fois au bon pH, le précipité a été mis à sécher pendant 7 jours au lyophilisateur puis a été stocké au réfrigérateur à 3°C. Un extrait obtenu pour chaque méthode à l'éthanol 95 % et au méthanol a été analysé par CCM et par HPLC-MS.

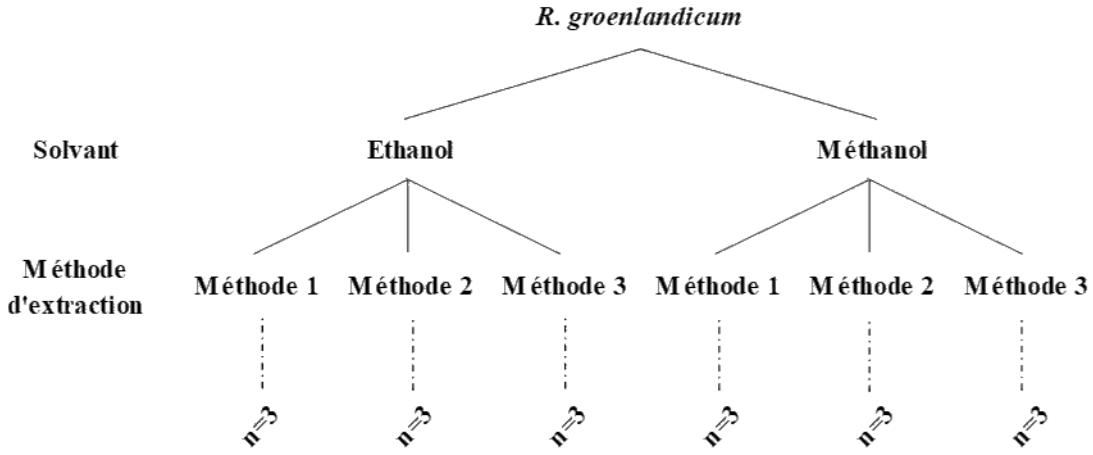


Figure 26 : Plan expérimental n°1 à deux facteurs fixes contenant chacun deux et trois niveaux.

Tableau 20 : Procédure d'extraction des trois méthodes testées - Les températures notées ambiantes n'ont pas été fixées durant ces travaux et les méthodes 2 et 3 ont été agitées à 300 rpm

	Nombre d'étapes	Solvant	Traitement	Durée	Méthode	Température
Méthode 1[86]	1	Éthanol 95 %	NON	30 min	Ultrasons	Ambiante
		Méthanol				
Méthode 2[82]	2	Éthanol 95 %	0,1 M NaOH dans H_2O	2 x 8 h	-	60°C
		Méthanol	NON	30 min	Ultrasons	Ambiante
Méthode 3[83]	2	-	0,5 M NaOH dans EtOH / MeOH	6 h	-	Ambiante
		HCl 4 M	-	1 h	-	-

b. Développement d'une méthode chromatographique d'analyse

i. CCM

Dans le but de comparer les différents extraits obtenus selon la méthode et le solvant d'extraction utilisés, des milieux d'élution pour CCM ont été recherchés. Le milieu 80 :1 chloroforme-méthanol a été retenu afin de comparer les parties apolaires des extraits et le milieu 5 :1 chloroforme-méthanol pour comparer la partie plus polaire. Chaque CCM réalisée dans ces deux milieux a été observées à 365 nm et 254 nm avant révélation, puis après révélation à l'acide sulfurique dans 20 % de méthanol à 365 nm et dans le visible.

ii. HPLC-MS

Les compositions des différents extraits obtenus, selon la méthode et selon le solvant utilisé, ont été comparées par HPLC-MS. La méthode d'analyse retenue utilise le méthanol et l'eau, tous deux acidifiés à l'acide formique à 0,1 %, à un débit de 1,000 mL/min. Elle a été réalisée sur la colonne Kinetex C18 (A) avec une observation à 254 nm. La méthode a consisté en un gradient de 10 à 80 % de méthanol acidifié sur 30 minutes suivi d'un gradient de 80 à 100 % pendant 5 minutes, puis terminée par un rinçage à 100 % pendant 10 minutes.

iii. GC-MS et GC-FID

Après méthylation, l'analyse GC-MS a permis d'identifier la présence de composés selon la correspondance des spectres de masse obtenus avec ceux du NIST14 (National Institute of Standards and Technology). Par la suite, la méthode GC-MS a été utilisée en GC-FID afin de pouvoir établir les différents pourcentages de ces composés selon les différents niveaux de facteurs. Les pourcentages ont été établis par normalisation interne. Cela signifie que les concentrations ont été supposées équivalentes aux pourcentages de surface des pics considérés.

c. Dosage de l'acide ursolique

i. Développement de la méthode analytique

Dans le but de réaliser la validation de méthode pour le dosage de l'acide ursolique selon la méthode et le solvant d'extraction, plusieurs méthodes HPLC ont été testées. Pour les trois méthodes, les solvants étaient le méthanol pur et l'eau acidifiée à l'acide formique à 0,05 %. La première méthode a été développée sur la colonne Thermo Scientific™ Hypersil Gold, par élution isocratique de 80 % de méthanol pendant 40 minutes, suivi d'un rinçage à 100 % pendant 10 minutes, le tout à un débit de 1,000 mL/min. La deuxième méthode a été développée sur la colonne Kinetex® C18 courte avec un débit de 0,300 mL/min par élution isocratique à 91,3 % de méthanol pendant 20 minutes suivi de 5 minutes de rinçage à 100 % de méthanol. La dernière méthode a été développée sur la colonne Kinetex® C18 avec un débit de 0,600 mL/min. La méthode consiste en une élution isocratique de 87 % pendant 30 minutes, suivi d'un rinçage 100 % de méthanol 5 minutes.

ii. Validation de la méthode analytique

La méthode HPLC utilisée a été la méthode développée sur la colonne Kinetex® C18 avec une élution isocratique à 87 % de méthanol pendant 30 minutes suivi d'un rinçage à 100 % pendant 5 minutes. Afin de s'assurer une méthode d'analyse robuste et fiable, il a été nécessaire de la valider selon les directives du protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie et de l'« International Conference on Harmonisation ».[90, 91] Certaines valeurs ont été validées suivant les recommandations de la FDA.

Facteur de résolution

Le facteur de résolution est calculé afin d'évaluer la bonne séparation de deux composés consécutifs sur le chromatogramme HPLC. Il est défini par la formule Équation 1 et dépend des temps de rétentions des deux composés (t_R) et de leur largeur de pic à mi-hauteur (ω) et doit être supérieur à 1,00 :

$$R = 2\frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(\omega_1 + \omega_2)}$$

Équation 1 : Équation du facteur de résolution

Linéarité

La linéarité de la méthode analytique a été évaluée à l'aide de six concentrations (2,00 ; 1,50 ; 1,00 ; 0,5 ; 0,25 et 0,13 mg/mL) du standard, préparées et analysées en triplicata pour chaque concentration. Une courbe de calibration a été mise en place à partir de ces six concentrations différentes en mesurant l'aire sous le pic correspondant à la concentration du standard. La linéarité a été par la suite déterminée par le calcul de la pente, du y-intercept et du coefficient de corrélation (r^2) à l'aide d'une régression par les moindres carrés.

Sensibilité

La sensibilité d'une méthode est examinée afin de vérifier qu'une faible variation de la valeur analysée ne provoque pas de grande variation de l'indication du système de mesure. La sensibilité est par définition égale au coefficient directeur de la droite.

Limite de détection minimale (LDM) et de quantification minimale (LQM)

La limite de détection représente le plus petit pic détectable du standard tandis que la limite de quantification représente la concentration minimale de l'analyte pouvant être quantifiée avec la méthode d'analyse (Équation 2). Pour ce faire, la concentration des étalons préparés a été diminuée successivement au plus petit pic détectable. La limite de détection se base sur la déviation standard du y-intercept de la régression linéaire (σ) et de la pente (S).

$$LDM = \frac{3{,}3 \times \sigma}{S}$$

Équation 2 : Équation de la LDM

La limite de quantification se base sur les mêmes données mathématiques que la LDM (Équation 3).

$$LQM = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

Équation 3 : Équation de la LQM

Réplicabilité et répétabilité

La répétabilité et la précision de la méthode proposée ont été évaluées à l'aide du CV de l'aire du pic correspondant au standard. Ces mesures de répétabilité en termes de précision intra-journalière et inter-journalière ont été répétées trois fois dans la même journée et une fois par jour pendant trois jours successifs pour le second. Pour le premier cas, les échantillons ont été préparés dans la même journée, par la même personne et analysés sur le même appareil. La journée de préparation a différé pour la précision interjournalière, mais la même personne et le même appareil ont été impliqués.

Justesse

La justesse de la méthode a été calculée par la méthode des ajouts dosés, à partir de trois solutions de témoins à trois différentes concentrations préparées (0,5 mg/mL, 1 mg/mL et 1,5 mg/mL) en triplicata. Elle est définie par l'erreur relative entre la

concentration nominale et la concentration calculée grâce à l'équation de la droite d'étalonnage.

Test de recouvrement

Le test de recouvrement vise à vérifier que l'analyte recherché est extrait dans sa totalité. Pour ce faire, une extraction devrait être réalisée en ajoutant une quantité connue de standard en plus de la matière végétale (Équation 4). Cette dernière est comparée à une extraction sans ajout. Il caractérise donc l'efficacité de l'extraction et est calculé selon la formule suivante :

$$\%Recouvrement = \frac{A - B}{C} \times 100$$

Équation 4: Équation du pourcentage de recouvrement

A = Concentration du standard dans l'extrait dopé
B = Concentration du standard dans l'extrait sans ajout
C = Concentration du standard dans la solution témoin

Robustesse

La robustesse d'une méthode est vérifiée en s'assurant que des variations de conditions n'ont pas d'influence sur les résultats obtenus. Cette étape n'a pas été réalisée pour la validation de la méthode HPLC.

iii. Réalisation du dosage

Préparation des extraits

Pour réaliser le dosage de l'acide ursolique contenu dans les différents extraits méthanolique ou éthanolique obtenus par les trois méthodes différentes, 50 mg de chaque extrait ont été pesés trois fois. Ces 50 mg ont été mis en solution avec du DMSO dans une fiole jaugée de 10 mL. À l'aide de pipettes jaugées, 2,5 mL ont été déposés dans des fioles jaugées de 5 mL complétée au trait de jauge avec du DMSO. Chaque extrait a ainsi eu une concentration de 5 mg/mL et a été analysé par HPLC en utilisant la méthode développée et validée sur la colonne Kinetex® C18.

Répétabilité de la méthode d'extraction

La répétabilité de la méthode d'extraction est déterminée à l'aide de l'écart-type relatif de l'aire du pic de l'analyte étudié pour chacune des méthodes d'extractions.

iv. Tests statistiques

Les résultats quantitatifs ont été exprimés en tant que moyenne de rendement ± l'écart-type. Les variations de la teneur en acide ursolique ont été étudiées par une analyse de variance (ANOVA) pour rechercher d'abord un éventuel effet du solvant, puis de la méthode et de leur possible interaction. Il s'agit d'une ANOVA à deux facteurs fixes répondant aux conditions de faisabilité d'une ANOVA soit que les échantillons suivent une loi Normale, les variances sont homogènes et que les

échantillons sont répartis aléatoirement et indépendamment. Les valeurs de p brutes ont été rapportées pour un niveau de significativité $\alpha = 0,05$ pour toutes les analyses statistiques. La correction de Holm a été utilisée pour révéler une fausse signification avec $p \leq 0,05$ considéré à tort comme statistiquement significatif.[92] Lorsque l'analyse de variance a montré l'existence d'une différence significative, les moyennes significatives des échantillons de chaque facteur ont été comparées par un test DSH de Tukey pour les méthodes. Afin de vérifier le pourcentage de variation des résidus liés à un ou plusieurs facteurs, l'estimation des composantes de la variation a été réalisée sur PRIMER-e 7.

3.6.2 Optimisation de la méthode d'extraction

a. Extraction

L'optimisation de l'extraction de l'acide ursolique à l'éthanol par la méthode 3 a été réalisée avec un plan factoriel complet (Figure 27). Pour chaque expérience, 5 g d'un lot de feuilles de thé du Labrador préalablement broyées et homogénéisées ont été pesés dans des ballons de 250 mL. Afin de réduire la variabilité de la composition du thé du Labrador, les feuilles ont été régulièrement mélangées à nouveau.[39]

Chaque montage a été réalisé à l'aide de la plaque Ika® RCT basic. La vitesse de rotation a été fixée à 90 rpm avec un volume de solvant fixé à 75 mL. Pour des raisons pratiques, les extraits ont été évaporés à sec. L'acidification a été réalisée dans un délai maximal d'une semaine après évaporation. Pour ce faire, l'extrait a été solubilisé dans 30 mL d'éthanol 95% puis acidifié avec 30 mL d'acide chlorhydrique à 4 mol/L. La suite de la démarche a été la même que celle développée partie 3.2 - 3.2.1 section a.

b. Dosage de l'acide ursolique

i. Préparation des extraits

Dans le but d'évaluer la teneur en acide ursolique contenue dans les 81 extraits, la méthode analytique validée dans la partie 3.2 - 3.2.1 section c - i a été utilisée. Pour ce faire, 5 mg de chaque extrait a été pesé trois fois. Ces 5 mg ont été mis en solution dans 1 mL de DMSO à l'aide d'une micropipette, pour obtenir des solutions de 5 mg/mL. À l'aide d'une micropipette, 0,5 mL de l'extrait à 5 mg/mL a été prélevé et dilué dans 0,5 mL de DMSO. Chaque extrait a ainsi été dilué à une concentration finale de 2,5 mg/mL et a été filtré avant d'être analysé.

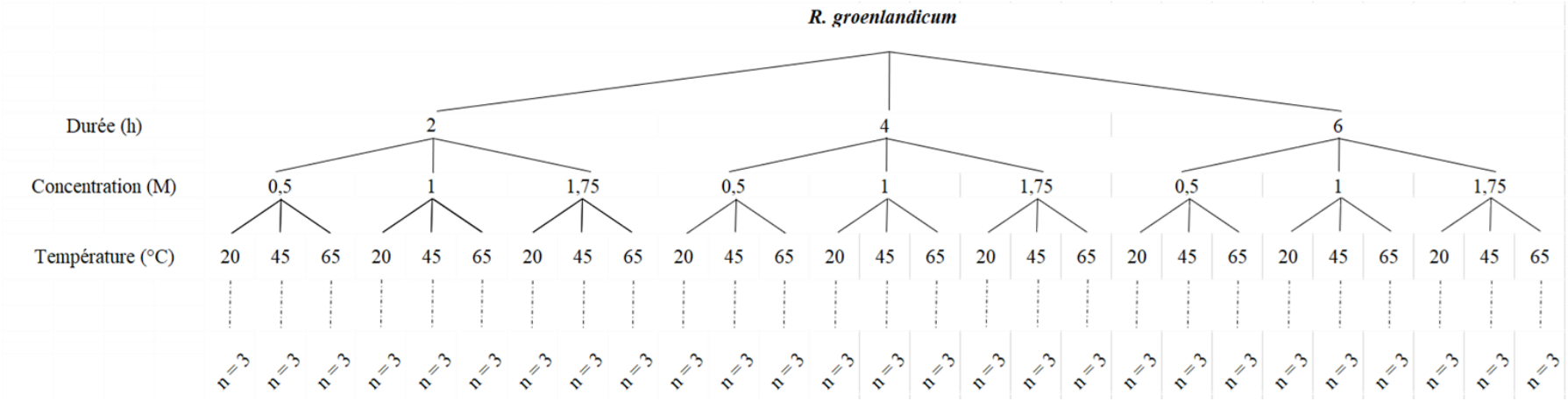


Figure 27 : Plan expérimental n°2 à trois facteurs fixes à trois niveaux.

ii. Tests statistiques

Les résultats quantitatifs ont été exprimés en tant que moyen de rendement ± l'écart-type. Les variations de la teneur en acide ursolique ont été étudiées par une ANOVA pour rechercher d'abord un éventuel effet de la durée, de la concentration en hydroxyde de sodium dans l'éthanol 95 %, de la température et de leurs différentes possibles interactions. Il s'est agi d'une ANOVA à trois facteurs fixes soit que les échantillons suivent une loi Normale, les variances sont homogènes et que les échantillons sont répartis aléatoirement et indépendamment. Les valeurs de p brutes ont été rapportées pour un niveau de signification $\alpha = 0,05$ pour toutes les analyses statistiques. La correction de Holm a été utilisée pour révéler une fausse signification avec $p \leq 0,05$ considéré à tort comme statistiquement significatif.[92] Lorsque l'analyse de variance a montré l'existence d'une différence significative, les moyennes significatives des échantillons, de chaque facteur ou interactions, ont été comparées par un test DSH de Tukey. Afin de vérifier le pourcentage de variation des résidus liés à un ou plusieurs facteurs, l'estimation des composantes de la variation a été réalisée sur PRIMER-e 7.

c. Analyse chromatographique des différents extraits

En vue d'étudier la composition des extraits selon les différents paramètres d'extraction, des analyses GC-MS et GC-FID ont été réalisées sur les différents extraits suivant la partie 3.2 - 3.2.1 section b - iii.

3.6.3 Évaluation de l'efficacité de la méthode d'extraction optimisée pour extraire l'acide ursolique de différents *Ericaceae*

a. Extraction de *K. angustifolia*, *G. procumbens*, *A. uva-ursi*

Les feuilles de chaque plante ont été préalablement broyées et mélangées. Une portion d'environ précisément 15 g de chacune d'entre elle ont été extraits trois fois avec le protocole de la méthode 1 avec pour solvant l'éthanol 95 % et trois fois avec le protocole de la méthode 3 optimisée; soit une extraction avec 225 mL d'hydroxyde de sodium à 1,75 mol/L dans de l'éthanol 95 % à température ambiante pendant 2 heures avec une agitation de 90 rpm (Tableau 20). Pour des raisons logistiques, la température n'a pas été contrôlée précisément à 20 °C.

b. Analyse qualitative et dosage des différents extraits

Les différents extraits ont été comparés entre eux par chromatographie sur couche mince suivant les paramètres établis dans la partie 3.2 - 3.2.1 section b - i. Dans le cadre de la réalisation du dosage de l'acide ursolique dans *K. angustifolia*, *G. procumbens* et *A. uva-ursi*, la méthode appliquée à *R. groenlandicum* développée partie 2.1-2.1.2 a été appliquée et contrôlée par des ajouts dosés d'acide ursolique dans les extraits. Cette méthode équivaut au test de recouvrement et a eu pour but de contrôler que tout l'acide ursolique ajouté aux extraits été retrouvés lors du dosage.

CONCLUSION

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était de trouver une nouvelle méthode d'extraction de l'acide ursolique dans *Rhododendron groenlandicum* respectant les conditions d'éco-extraction. Cet objectif a été atteint. En effet, il a été démontré, à l'aide d'un dosage et d'une ANOVA, qu'une extraction réalisée avec l'éthanol 95 % alcalin a permis d'extraire 1,5 fois plus d'acide ursolique comparativement avec une extraction assistée par ultrasons à l'éthanol 95 %, et 2,5 fois plus qu'une extraction avec le méthanol.

Le second objectif consistait à optimiser cette méthode d'extraction. Il a été mis en évidence, à l'aide d'un dosage et d'une ANOVA, qu'une extraction de 2 h, avec 1,75 M d'hydroxyde de sodium éthanolique et maintenue à 20 °C a permis d'extraire 1,5 fois plus d'acide ursolique que cette même méthode comparativement aux paramètres initiaux. Cette optimisation constitue une avancée importante puisqu'elle permet d'extraire l'acide ursolique plus efficacement par rapport aux extractions dites classiques au méthanol. Cette extraction de courte durée avec l'éthanol 95 % alcalin sans chauffage, pourrait être un atout dans plusieurs domaines utilisant l'acide ursolique comme la cosméceutique. De ce fait, la méthode développée permet d'envisager une production d'extraits enrichis en acide ursolique à grande échelle car elle nécessite peu de ressources végétales, peu d'énergie et des matières premières (NaOH, éthanol 95 %) peu dispendieuses. De plus, la méthode d'extraction est sélective pour les composés apolaires ce qui permet d'obtenir des extraits ciblés. Il serait également important de réaliser un cycle de vie des produits utilisés pour contrôler l'impact écologique de cette méthode optimisée.

Dans le but de contribuer à augmenter la pureté de l'acide ursolique extrait, des tests de recristallisation sur les extraits enrichis en acide ursolique avec des solvants alternatifs pourraient être étudiés.

Une troisième partie de ce projet a consisté à appliquer cette méthode d'extraction à trois Éricacées riches en acide ursolique incluant *Kalmia angustifolia*, *Gaultheria procumbens* et *Arctostaphylos uva-ursi*. La méthode optimisée a permis d'obtenir des extraits 3 fois plus riche en acide ursolique pour *K. angustifolia* par rapport à celle assistée par ultrasons avec l'éthanol, 10 fois plus riche pour *G. procumbens* et 7 fois plus riche pour *A. uva-ursi*. Les résultats obtenus montrent que cette méthode est aussi applicable à d'autres *Ericaceae* contenant de l'acide ursolique. Ces résultats préliminaires ont également mis en évidence que *K. angustifolia* et *A. uva-ursi* présentent les teneurs relatives en acide ursolique les plus importantes pour de meilleur rendement d'extraction. Toutefois, elle ne surpasse pas les extraits enrichis du thé du Labrador obtenus par cette même méthode d'extraction.

Ce projet de maîtrise a donc permis de mettre en évidence une nouvelle méthode d'éco-extraction, permettant d'extraire de l'acide ursolique en plus grande quantité avec un solvant alternatif contrairement aux méthodes traditionnelles qui utilisent des solvants non alternatifs comme le méthanol. Afin d'évaluer l'ampleur et les limites de l'extraction par cette méthode optimisée, il serait intéressant de la comparer à une méthode d'extraction enzymatique reconnue comme une méthode verte.

Pour aller plus loin, il serait intéressant d'approfondir davantage l'utilisation de cette méthode optimisée avec d'autres plantes, riches en acide ursolique, comme *salvia officinalis* ou *Sambucus canadensis* mais aussi d'étudier si cette méthode est applicable à d'autres composés comme l'acide bétulinique dans *Betula pendula* par exemple.[99-101] Par ailleurs, afin d'enrichir les résultats rapportés au thé du Labrador, il serait aussi judicieux de réaliser de nouveaux dosages de l'acide ursolique selon la saison, l'année et le lieu de récolte afin d'évaluer l'influence des variations temporelles en acide ursolique chez *R. groenlandicum* et les autres Éricacées. D'autre part, il serait intéressant de répéter plusieurs fois l'extraction établie selon la méthode 3 optimisée

sur les feuilles du thé du Labrador afin de vérifier si l'extraction de l'acide ursolique contenue dans ces dernières est complète.

Finalement, la robustesse de la méthode analytique permettant de quantifier l'acide ursolique, devrait être évaluée. Notamment, l'optimisation a été réalisée sur une colonne neuve et il pourrait être judicieux, après usure, de revalider la méthode analytique.

LISTE DE RÉFÉRENCES

1. Chartier, C.; Staub, H.; Goetz, P., Thé du Labrador (lédon du groenland) (*Ledum groenlandicum* Oeder). *Phytothérapie* **2005,** *3* (2), 84-87.
2. USDA NRCS National Plant Data Team BOG LABRADOR TEA : *Ledum groenlandicum* Oeder. https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=LEGR (accessed 31 septembre 2018).
3. Moerman, D. E., *Native American ethnobotany*. Timber Press: Portland, 1998; p 927.
4. Dufour, D.; Pichette, A.; Mshvildadze, V.; Bradette-Hebert, M. E.; Lavoie, S.; Longtin, A.; Laprise, C.; Legault, J., Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *Journal of Ethnopharmacology* **2007,** *111*, 22-28.
5. Dufour, D. Évaluation de l'activité biologique du *Ledum groenlandicum* Retzius. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, 2006.
6. Ovesná, Z.; Kozics, K.; Slameňová, D., Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2006,** *600* (1-2), 131-137.
7. López-Hortas, L.; Pérez-Larrán, P.; González-Muñoz, M. J.; Falqué, E.; Domínguez, H., Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. A review. *Food Research International* **2018,** *103*, 130-149.
8. Franceschi, C., Inflammaging as a major characteristic of old people : can it be rrevented or cured ? *Nutrition Reviews* **2007,** *65* (12), 173-176.
9. Franceschi, C.; Bonafe, M.; Valensin, S.; Olivieri, M.; De Luca, F.; Ottaviani, E.; De Benedictis, G., Inflamm-aging an evolutionary perspective on immunosenescence *Annals of the New York Academy of Sciences* **2000,** *908*, 244-254.
10. Castola, V.; Bighelli, A.; Rezzi, S., Composition and chemical variability of the triterpene fraction of dichloromethane extracts of cork (*Quercus suber* L.). *Industrial Crops and Products* **2002,** *15*, 15-22.
11. Cunha, W. R.; de Matos, G. X.; Souza, M. G.; Tozatti, M. G.; Andrade e Silva, M. L.; Martins, C. H.; da Silva, R.; Da Silva Filho, A. A., Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of *Miconia ligustroides*, isolated triterpene acids, and ursolic acid derivatives. *Pharmaceutical Biology* **2010,** *48* (2), 166-9.
12. Chandramu, C.; Manohar, R. D.; Krupadanam, D. G.; Dashavantha, R. V., Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* **2003,** *17* (2), 129-134.
13. Frère Marie-Victorin, *Flore laurentienne*. 3e éd. / mise à jour et annotée par Luc Brouillet et *al* ed.; G. Morin: Boucherville, Québec, 2002; p 1093.

14. Judd, W.; Kron, K., *Rhododendron Linnaeus*. Oxford University Press: Oxford, 2009; Vol. 8, p 455.
15. Harmaja, H., Taxonomic notes on *Rhododendron* subsection *Ledum* (*Ledum*, *Ericaceae*), with a key to its species. *Annales Botanici Fennici* **1991**, 171-173.
16. Dampc, A.; Luczkiewicz, M., Labrador tea–the aromatic beverage and spice: a review of origin, processing and safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2015,** *95* (8), 1577-1583.
17. Berry, J.; Bjorkman, O., Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of plant physiology* **1980,** *31* (1), 491-543.
18. Riebesell, J. F., Photosynthetic adaptations in bog and alpine populations of *Ledum groenlandicum*. *Ecology* **1981,** *62* (3), 579-586.
19. Hébert, F.; Thiffault, N., The Biology of Canadian Weeds. 146. *Rhododendron groenlandicum* (Oeder) Kron and Judd. *Canadian journal of plant science* **2011,** *91* (4), 725-738.
20. Foster, S.; Duke, J., *A field guide to medicinal plants (Eastern / Central)*. Houghton Mifflin Harcourt Books: USA, 1990; Vol. 2, p 366.
21. Eid, H. M.; Ouchfoun, M.; Saleem, A.; Guerrero-Analco, J. A.; Walshe-Roussel, B.; Musallam, L.; Rapinski, M.; Cuerrier, A.; Martineau, L. C.; Arnason, J. T., A combination of (+)-catechin and (−)-epicatechin underlies the in vitro adipogenic action of Labrador tea (*Rhododendron groenlandicum*), an antidiabetic medicinal plant of the eastern James Bay Cree *pharmacopeia*. *Journal of ethnopharmacology* **2016,** *178*, 251-257.
22. Bais, H. P.; Walker, T. S.; Stermitz, F. R.; Hufbauer, R. A.; Vivanco, J. M., Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (±)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. *Plant Physiology* **2002,** *128* (4), 1173-1179.
23. Iacopini, P.; Baldi, M.; Storchi, P.; Sebastiani, L., Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape : Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis* **2008,** *21* (8), 589-598.
24. Gordon, M. H.; Roedig-Penman, A., Antioxidant activity of quercetin and myricetin in liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* **1998,** *97* (1), 79-85.
25. Rogerio, A.; Kanashiro, A.; Fontanari, C.; Da Silva, E.; Lucisano-Valim, Y. M.; Soares, E. G.; Faccioli, L. H., Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation research* **2007,** *56* (10), 402-408.
26. Shu, Y.; Liu, Y.; Li, L.; Feng, J.; Lou, B.; Zhou, X.; Wu, H., Antibacterial activity of quercetin on oral infectious pathogens. *African Journal of Microbiology Research* **2011,** *5* (30), 5358-5361.
27. Rapinski, M.; Liu, R.; Saleem, A.; Arnason, J. T.; Cuerrier, A., Environmental trends in the variation of biologically active phenolic compounds in Labrador tea, *Rhododendron groenlandicum,* from northern Quebec, Canada. *Botany* **2014,** *92* (11), 783-794.

28. Lou, Z.; Wang, H.; Zhu, S.; Ma, C.; Wang, Z., Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *Journal of Food Science* **2011,** *76* (6), 398-403.
29. Jung, H. A.; Park, J. C.; Chung, H. Y.; Kim, J.; Choi, J. S., Antioxidant flavonoids and chlorogenic acid from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Archives of pharmacal research* **1999,** *22* (2), 213.
30. Wu, L., Effect of chlorogenic acid on antioxidant activity of *Flos Lonicerae* extracts. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* **2007,** *8* (9), 673-679.
31. Lou, Z.; Wang, H.; Rao, S.; Sun, J.; Ma, C.; Li, J., p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food control* **2012,** *25* (2), 550-554.
32. Dharmappa, K. K.; Kumar, R. V.; Nataraju, A.; Mohamed, R.; Shivaprasad, H. V.; Vishwanath, B. S., Anti-inflammatory activity of oleanolic acid by inhibition of secretory phospholipase A2. *Planta medica* **2009,** *75* (03), 211-215.
33. Belleau, F.; Collin, G., Composition of the essential oil of *Ledum groenlandicum*. *Phytochemistry* **1993,** *33* (1), 117-121.
34. Collin, G.; Gagnon, H., Aromas from Quebec. IV. Chemical composition of the essential oil of *Ledum groenlandicum*: A review. *Am. J. Essent. Oils Nat. Prod* **2015,** *2* (3), 06-11.
35. Valente, J.; Zuzarte, M.; Gonçalves, M.; Lopes, M.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L.; Cruz, M., Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil. *Food and chemical toxicology* **2013,** *62*, 349-354.
36. Van Zyl, R. L.; Seatlholo, S. T.; Van Vuuren, S. F.; Viljoen, A. M., The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *Journal of Essential Oil Research* **2006,** *18*, 129-133.
37. Morcia, C.; Malnati, M.; Terzi, V., In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1, 8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2012,** *29* (3), 415-422.
38. Étienne, M. Valorisation d'extraits de fleurs de *Rhododendron groenlandicum* pour des applications cosmétiques. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, 2018.
39. Collin, G., Aromas from Quebec. IV. Chemical composition of the essential oil of *Ledum groenlandicum* : A review. *American Journal of Essential Oils and Natural Products* **2015,** *2* (3), 06-11.
40. St-Gelais, A.; Roger, B.; Desrosiers, K.; Marceau, H., Entitled Chemometric exploration of *Rhododendron groenlandicum* reveals complex patterns,. *50th International Symposium on Essential Oils in Vienna, Austria* **2019**.
41. Lopez-Hortas, L.; Perez-Larran, P.; Gonzalez-Munoz, M. J.; Falque, E.; Dominguez, H., Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. *Food Research International,* **2018,** *103*, 130-149.
42. Ikeda, Y.; Murakami, A.; Ohigashi, H., Ursolic acid : An anti-and pro-inflammatory triterpenoid. *Molecular nutrition & food research* **2008,** *52* (1), 26-42.
43. Csuk, R.; Siewert, B., A convenient separation of ursolic and oleanolic acid. *Tetrahedron letters,* **2011,** *52* (49), 6616-6618.

44. Frighetto, R. T.; Welendorf, R. M.; Nigro, E. N.; Frighetto, N.; Siani, A. C., Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography. *Food Chemistry,* **2008,** *106* (2), 767-771.
45. Morrison, S. A.; Li, H.; Webster, D.; Johnson, J. A.; Gray, C. A., Antimycobacterial triterpenes from the Canadian medicinal plant *Sarracenia purpurea*. *Journal of ethnopharmacology,* **2016,** *188*, 200-203.
46. Ringbom, T.; Segura, L.; Noreen, Y.; Perera, P.; Bohlin, L., Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *Journal of natural products,* **1998,** *61* (10), 1212-1215.
47. Liu, J., Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of ethnopharmacology* **1995,** *49* (2), 57-68.
48. Gauthier, C. Amélioration du comportement biopharmaceutique de triterpènes naturels anticancéreux par synthèse de saponines mono-et bidesmosidiques. Thèse de Doctorat, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, 2008.
49. Yin, R.; Li, T.; Tian, J. X.; Xi, P.; Liu, R. H., Ursolic acid, a potential anticancer compound for breast cancer therapy. *Critical reviews in food science and nutrition* **2018,** *58* (4), 568-574.
50. Herailh, C. Hémisynthese de glycosides d'uvaol et évaluation de leur activité cytotoxique. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, 2019.
51. Innocente, A. M.; Silva, G. N.; Cruz, L. N.; Moraes, M. S.; Nakabashi, M.; Sonnet, P.; Gosmann, G.; Garcia, C. R.; Gnoatto, S. C., Synthesis and antiplasmodial activity of betulinic acid and ursolic acid analogues. *Molecules* **2012,** *17* (10), 12003-12014.
52. Ma, C.-M.; Cai, S.-Q.; Cui, J.-R.; Wang, R.-Q.; Tu, P.-F.; Hattori, M.; Daneshtalab, M., The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2005,** *40* (6), 582-589.
53. Khwaza, V.; Oyedeji, O. O.; Aderibigbe, B. A., Ursolic acid-based derivatives as potential anti-cancer agents : an update. *International Journal of Molecular Sciences* **2020,** *21* (16), 5920.
54. Srinivasan, R.; Aruna, A.; Lee, J. S.; Kim, M.; Shivakumar, M. S.; Natarajan, D., Antioxidant and antiproliferative potential of bioactive molecules Ursolic acid and Thujone isolated from *Memecylon edule* and *Elaeagnus indica* and their inhibitory effect on topoisomerase II by molecular docking approach. *BioMed research international* **2020,** *2020*, 1-12.
55. Liang, Y.; Niu, Q.; Zhao, Y., Pharmacological research progress of ursolic acid for the treatment of liver diseases. *Traditional Medicine Research* **2021,** *6* (4), 38.
56. Litalien, C.; Beaulieu, P., Molecular mechanisms of drug actions: From receptors to effectors. In *Pediatric critical care*, Elsevier: 2011; pp 1553-1568.
57. Ringbom, T.; Segura, L.; Noreen, Y.; Perera, P.; Bohlin, L., Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *Journal of natural products* **1998,** *61* (10), 1212-1215.
58. Franceschi, C.; Capri, M.; Monti, D.; Giunta, S.; Olivieri, F.; Sevini, F.; Panourgia, M. P.; Invidia, L.; Celani, L.; Scurti, M.; Cevenini, E.; Castellani, G. C.;

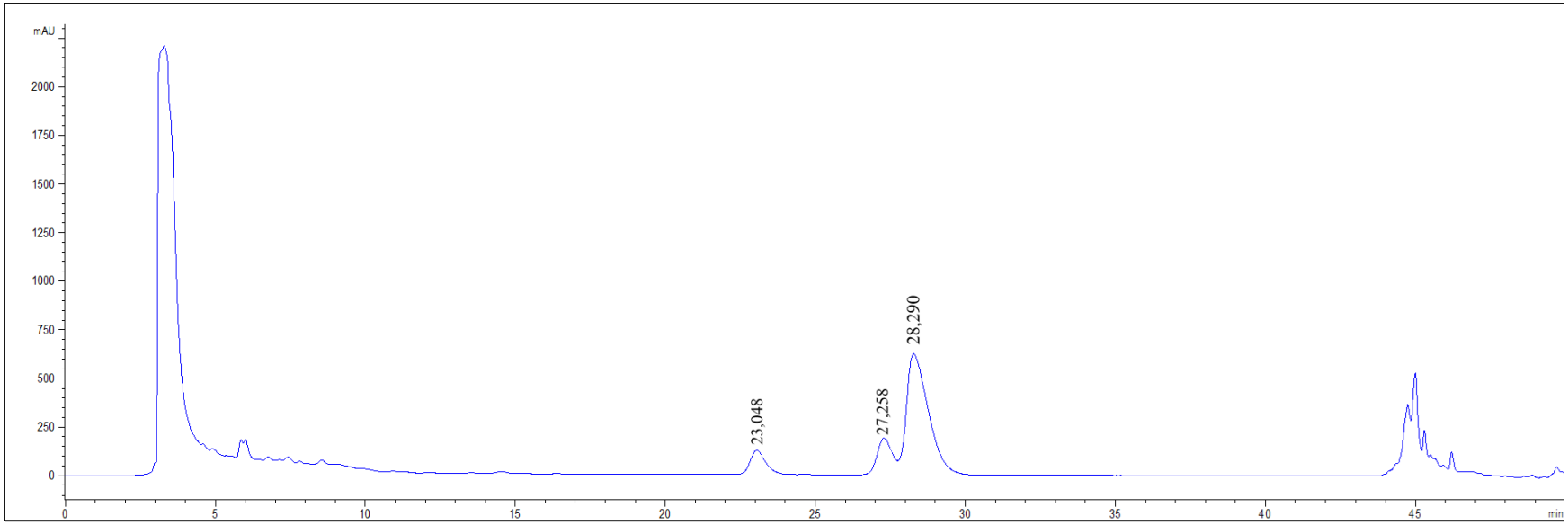
Salvioli, S., Inflammaging and anti-inflammaging : a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanism of Ageing and Development* **2007,** *128* (1), 92-105.
59. Parks, W. C., Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair and Regeneration* **1999,** *7* (6), 423-432.
60. Rang, H. P., *Rang and Dale's pharmacology*. 6th ed. ed.; Churchill Livingstone: Edinburgh, 2007; p 829
61. Murakami, S.; Takashima, H.; Sato-Watanabe, M.; Chonan, S.; Yamamoto, K.; Saitoh, M.; Saito, S.; Yoshimura, H.; Sugawara, K.; Yang, J., Ursolic acid, an antagonist for transforming growth factor (TGF)-β1. *FEBS letters* **2004,** *566* (1-3), 55-59.
62. Both, D. M.; Goodtzova, K.; Yarosh, D. B.; Brown, D. A., Liposome-encapsulated ursolic acid increases ceramides and collagen in human skin cells. *Archives of dermatological research* **2002,** *293* (11), 569-575.
63. Yarosh, D. B.; Both, D.; Brown, D., Liposomal ursolic acid (merotaine) increases ceramides and collagen in human skin. *Hormone Research in Paediatrics* **2000,** *54* (5-6), 318-321.
64. Farwick, M.; Köhler, T.; Schild, J.; Mentel, M.; Maczkiewitz, U.; Pagani, V.; Bonfigli, A.; Rigano, L.; Bureik, D.; Gauglitz, G. G., Pentacyclic triterpenes from *Terminalia arjuna* show multiple benefits on aged and dry skin. *Skin pharmacology and physiology* **2014,** *27* (2), 71-81.
65. Lee, H. K.; Nam, G. W.; Kim, S. H.; Lee, S. H., Phytocomponents of triterpenoids, oleanolic acid and ursolic acid, regulated differently the processing of epidermal keratinocytes via PPAR-α pathway. *Experimental dermatology* **2006,** *15* (1), 66-73.
66. Lim, S. W.; Hong, S. P.; Jeong, S. W.; Kim, B.; Bak, H.; Ryoo, H. C.; Lee, S. H.; Ahn, S. K., Simultaneous effect of ursolic acid and oleanolic acid on epidermal permeability barrier function and epidermal keratinocyte differentiation via peroxisome proliferator-activated receptor-α. *The Journal of dermatology* **2007,** *34* (9), 625-634.
67. Lise Watier Cosmétiques Sublimessence Sérum anti-âge haute concentration. https://www.lisewatier.com/ca_fr/sublimessence-serum-anti-age-haute-concentration-28-ml (accessed 22 mars 2020).
68. Gallon, V. Cosmétiques naturels : Dans un marché en plein essor, Cosmébio veut le maintien des allégations « sans ». https://www.premiumbeautynews.com/fr/cosmetiques-naturels-dans-un,15605 (accessed 15 avril 2020).
69. Jin, H.; Pi, J.; Yang, F.; Wu, C.; Cheng, X.; Bai, H.; Huang, D.; Jiang, J.; Cai, J.; Chen, Z. W., Ursolic acid-loaded chitosan nanoparticles induce potent anti-angiogenesis in tumor. *Applied microbiology and biotechnology* **2016,** *100* (15), 6643-6652.
70. Sun, Q.; He, M.; Zhang, M.; Zeng, S.; Chen, L.; Zhou, L.; Xu, H., Ursolic acid: A systematic review of its pharmacology, toxicity and rethink on its pharmacokinetics based on PK-PD model. *Fitoterapia* **2020,** *147*, 104735.

71. Kashyap, D.; Tuli, H. S.; Sharma, A. K., Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life sciences* **2016,** *146*, 201-213.
72. Chandramu, C.; Manohar, R. D.; Krupadanam, D. G.; Dashavantha, R. V., Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. *Phytotherapy Research* **2003,** *17* (2), 129-134.
73. Prat, D.; Wells, A.; Hayler, J.; Sneddon, H.; McElroy, C. R.; Abou-Shehada, S.; Dunn, P. J., CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. *Green Chemistry* **2016,** *18* (1), 288-296.
74. Chemat, F., *Eco-extraction du végétal : procédés innovants et solvants alternatifs*. DUNOD: Paris, 2010; p 336.
75. Kala, H. K.; Mehta, R.; Sen, K. K.; Tandey, R.; Mandal, V., Strategizing method optimization of microwave-assisted extraction of plant phenolics by developing standard working principles for universal robust optimization. *Analytical methods* **2017,** *9* (13), 2089-2103.
76. Alupului, A.; Calinescu, I.; Lavric, V., Microwave extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Science Bulletin, Series B* **2012,** *74* (2), 129-142.
77. Lucchesi, M.-E. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Université de la Réunion, La Réunion, 2005.
78. Tiwari, B. K., Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2015,** *71*, 100-109.
79. Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.-G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Abert-Vian, M., Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry* **2017,** *34*, 540-560.
80. Kerton, F. M.; Marriott, R., *Alternative solvents for green chemistry*. Royal Society of chemistry: Cambridge, 2013; p 238.
81. Ogier, J. C.; Leygye, J. P.; Ballerini, D.; Pourqui, J.; Rigal, L., Ethanol production from lignocellulosic biomass. *Oil & Gas Science and Technology* **1999,** *54* (1), 67-94.
82. Derrien, M. Bioraffinage de sous-produits de l'épinard (*Spinacia oleracea* L.) : comparaison de méthodes vertes pour l'extraction de composés phytochimiques bioactifs. Thèse de Doctorat, Université Laval, Québec, 2017.
83. Tostes, J. B. D. F.; Nakamura, M. J.; De Saboya, C. G. F.; Mazzei, J. L.; Siani, A. C., Efficient and selective method to separate triterpene acids by direct treatment of apple peels with alkaline ethanol. *Separation Science and Technology* **2016,** *51* (12), 1986-1993.
84. Système d'information sur les matières dangereuses utilisées au travail (SIMDUT) Hydroxyde de sodium, Classification selon le SIMDUT 2015. https://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/Pages/fiche-simdut.aspx?no_produit=1164 (accessed 5 octobre 2018).
85. Rizhikovs, J.; Zandersons, J.; Dobele, G.; Paze, A., Isolation of triterpene-rich extracts from outer birch bark by hot water and alkaline pre-treatment or the appropriate choice of solvents. *Industrial Crops and Products* **2015,** *76*, 209-214.

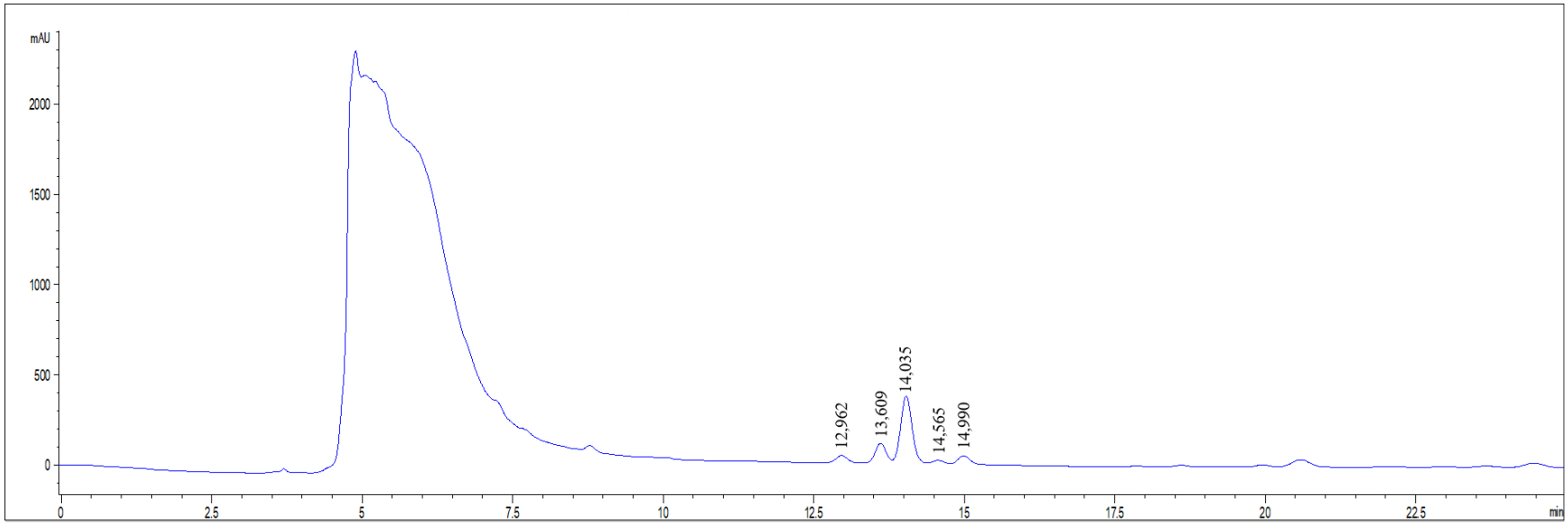
86. Xia, E.-Q.; Yu, Y.-Y.; Xu, X.-R.; Deng, G.-F.; Guo, Y.-J.; Li, H.-B., Ultrasound-assisted extraction of oleanolic acid and ursolic acid from *Ligustrum lucidum* Ait. *Ultrasonics Sonochemistry* **2012,** *19* (4), 772-776.
87. Salimon, J.; Abdullah, B. M.; Salih, N., Saponification of *Jatropha curcas* seed oil: optimization by D-optimal design. *International Journal of Chemical Engineering* **2012,** *2012*.
88. Salleh, N. H. M.; Daud, M. Z. M.; Arbain, D.; Ahmad, M. S.; Ismail, K. S. K., Optimization of alkaline hydrolysis of paddy straw for ferulic acid extraction. *Industrial Crops and Products* **2011,** *34* (3), 1635-1640.
89. Gonzales, G. B.; Smagghe, G.; Raes, K.; Van Camp, J., Combined alkaline hydrolysis and ultrasound-assisted extraction for the release of nonextractable phenolics from cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) waste. *Journal of agricultural and food chemistry* **2014,** *62* (15), 3371-3376.
90. ICH Guidelines Validation of analytical procedures : text and methodology Q2 (R1). http://www.ich.org/products/guidelines/quality/qualitysingle/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html (accessed 28 juin 2019).
91. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec *Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie*; Québec, 2015; p 29.
92. Gaetano, J., Holm-Bonferroni sequential correction: an EXCEL calculator-ver. 1.2. 2013.
93. Wu, C. J.; Hamada, M. S., *Experiments: planning, analysis, and optimization*. John Wiley & Sons: Hoboken, 2011; Vol. 552, p 760.
94. Pecha, J.; Šánek, L.; Fürst, T.; Kolomazník, K., A kinetics study of the simultaneous methanolysis and hydrolysis of triglycerides. *Chemical Engineering Journal* **2016,** *288*, 680-688.
95. Theodorou, V.; Skobridis, K.; Tzakos, A. G.; Ragoussis, V., A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Letters* **2007,** *48* (46), 8230-8233.
96. Wollenweber, E.; Kohorst, G., Novel Epicuticular Leaf Flavonoids from *Kalmia* and *Gaultheria* (*Ericaceae*). *Zeitschrift für Naturforschung C* **1984,** *39* (7-8), 710-713.
97. Jacobs, M.; Lloyd, W., A phytochemical study of *Kalmia angustifolia* L. *The Journal of the American Pharmaceutical Association* **1939,** *28* (7), 408-412.
98. Michel, P.; Owczarek, A.; Matczak, M.; Kosno, M.; Szymański, P.; Mikiciuk-Olasik, E.; Kilanowicz, A.; Wesołowski, W.; Olszewska, M. A., Metabolite profiling of eastern teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) lipophilic leaf extracts with hyaluronidase and lipoxygenase inhibitory activity. *Molecules* **2017,** *22* (3), 412.
99. Sharma, Y.; Velamuri, R.; Fagan, J.; Schaefer, J.; Streicher, C.; Stimson, J., Identification and characterization of polyphenols and volatile terpenoid compounds in different extracts of garden sage (*Salvia officinalis* L.). *Pharmacognosy Research* **2020,** *12* (2), 149.
100. Mlala, S.; Oyedeji, A. O.; Gondwe, M.; Oyedeji, O. O., Ursolic acid and its derivatives as bioactive agents. *Molecules* **2019,** *24* (15), 2751.
101. Kovač-Bešović, E. E.; Durić, K.; Kalođera, Z.; Sofić, E., Identification and isolation of pharmacologically active triterpenes in *Betualea* cortex, *Betula pendula* Roth., *Betulaceae*. *Bosnian journal of basic medical sciences* **2009,** *9* (1), 31.

ANNEXES

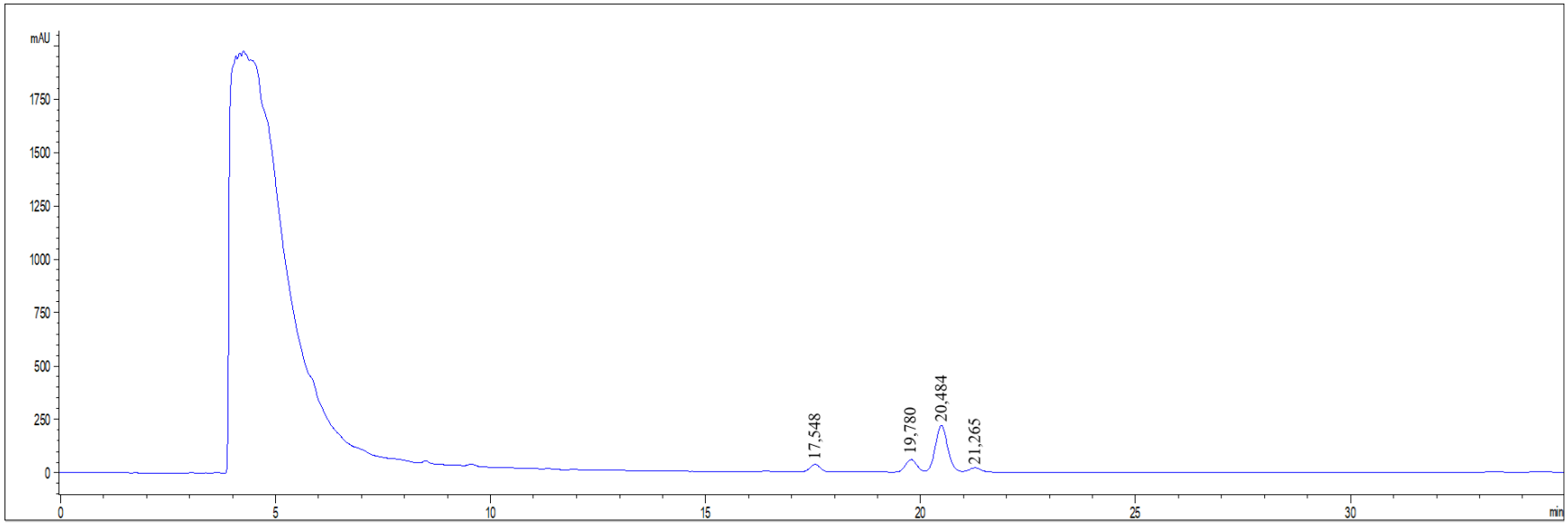
ANNEXE 1 : Chromatogramme HPLC sur la colonne Thermo Scientific™ Hypersil Gold - gradient isocratique eau - méthanol de 80 % de méthanol acidifié à 0,05 % d'acide formique (40 min) suivi d'un rinçage 100 % méthanol (5 min) - 254 nm - Extrait éthanolique



ANNEXE 2 : Chromatogramme HPLC sur la colonne Kinetex® C18 courte (C) - gradient isocratique eau - méthanol de 91,3 % de méthanol acidifié à 0,05 % d'acide formique (30 min) suivi d'un rinçage 100 % méthanol (10 min) - 254 nm - Extrait éthanolique



ANNEXE 3 : Chromatogramme d'un extrait du thé du Labrador avec la colonne Kinetex® C18 et la méthode de dosage validée - UV : 254 nm



ANNEXE 4 : Test DSH de Tukey des différences des moyennes des moindres carrés sur l'interaction triple : heure / concentration / température

Niveaux des facteurs										
2 ; 1,75 ; 20	A									
6 ; 0,5 ; 20		B								
4 ; 1,75 ; 20		B	C							
6 ; 1,75 ; 20		B	C	D						
2 ; 1 ; 20		B	C							
2 ; 0,5 ; 20		B	C	D						
4 ; 1 ; 20		B	C	D						
6 ; 1 ; 20		B	C	D	E					
4 ; 1,75 ; 45		B	C	D	E	F				
6 ; 0,5 ; 45		B	C	D	E	F	G			
2 ; 1 ; 45		B	C	D	E	F	G	H		
2 ; 1,75 ; 45			C	D	E	F	G	H		
4 ; 0,5 ; 45			C	D	E	F	G	H		
6 ; 0,5 ; 65			C	D	E	F	G	H		
4 ; 0,5 ; 20				D	E	F	G	H	I	
6 ; 1 ; 45				D	E	F	G	H	I	
2 ; 0,5 ; 45					E	F	G	H	I	
4 ; 1 ; 45						F	G	H	I	J
4 ; 1 ; 65							G	H	I	J
2 ; 0,5 ; 65							G	H	I	J
2 ; 1,75 ; 65								H	I	J
2 ; 1 ; 65								H	I	J
4 ; 1,75 ; 65								H	I	J
4 ; 0,5 ; 65								H	I	J
6 ; 1 ; 65								H	I	J
Niveaux des facteurs										
6 ; 1,75 ; 65									I	J
6 ; 1,75 ; 45										J

Les niveaux non connectés par la même lettre sont significativement différents.

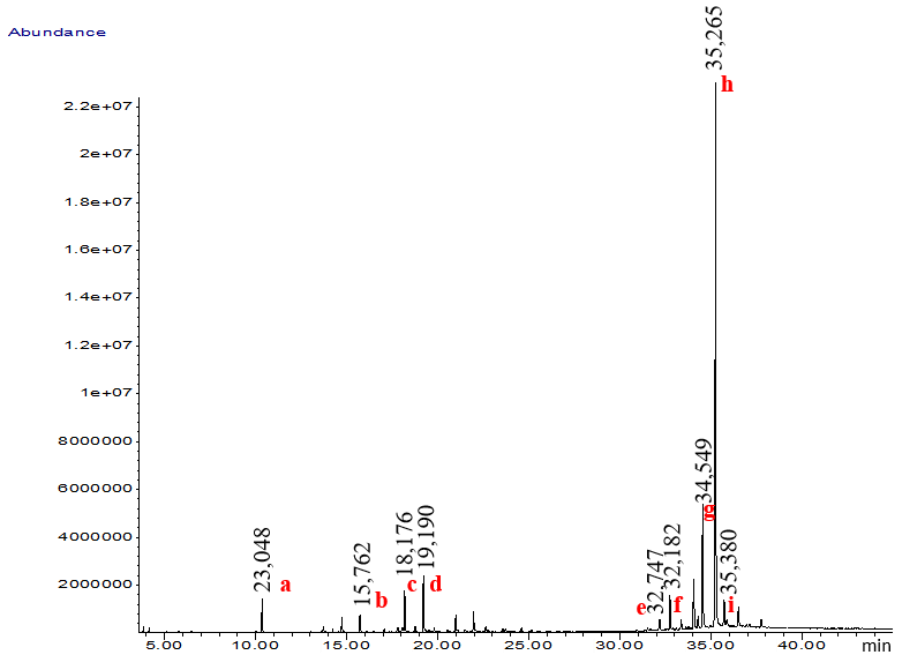
ANNEXE 5 : Test DSH de Tukey des différences des moyennes des moindres carrés sur l'interaction double température / durée

Niveaux des facteurs				
20 ; 2	A			
20 ; 6	A	B		
20 ; 4		B		
45 ; 4			C	
45 ; 2			C	
45 ; 6			C	D
65 ; 6				D
65 ; 4				D
65 ; 2				D

Les niveaux non connectés par la même lettre sont significativement différents.

ANNEXE 6 : Test DSH de Tukey des différences des moyennes des moindres carrés sur l'interaction double température / concentrations

Niveaux des facteurs					
20 ; 1,75	A				
20 ; 1		B			
20 ; 0,5		B			
45 ; 0,5			C		
45 ; 1			C	D	
45 ; 1,75			C	D	
65 ; 0,5				D	E
65 ; 1					E
65 ; 1,75					E

Les niveaux non connectés par la même lettre sont significativement différents.

ANNEXE 7 : Chromatogramme de GC-MS de l'extrait obtenu par la méthode 3 éthanolique - **a** : acide palmitique, **b**, **c**, **d** : dérivés d'acide gras non identifiés, **e** : β-amyrin, **f** : α-amyrin, **g**, **i** : triterpénoïdes, **h** : acide ursolique