

Nouveaux actifs et nouveaux ingrédients

Sabine Berteina-Raboin est Professeur à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (UMR 7311, Université d'Orléans-CNRS).

Depuis des siècles, les plantes sont utilisées pour des usages médicaux et cosmétiques ; on peut citer à titre d'exemples :

- l'acide salicylique, que l'on retrouve dans l'écorce de saule et qui a des propriétés curatives, soulage les douleurs et les fièvres (**Figure 1**). L'acide salicylique est isolé en 1829, la première synthèse du dérivé acétylé date de 1893, et c'est en 1899 que Bayer dépose le brevet de l'aspirine ;

- le Henné : arbuste épineux dont les feuilles produisent des teintures telles que le rouge et le jaune (**Figure 2**), colorant textile et corporel dont on a retrouvé des traces sur les momies égyptiennes. En tant que cosmétique, il nettoie et purifie la peau, et possède des propriétés antifongiques

et astringentes. Les fleurs sont exploitées en parfumerie.

1 Les cosmétiques et la chimie

Les progrès de la chimie permettent une évolution des



Figure 1

L'acide salicylique peut être extrait de l'écorce de saule.

Si on se focalise sur les produits de soin « anti-âge » qui inondent le marché aujourd'hui, leur apparition remonte à la fin des années 1980. Ils sont le résultat d'une connaissance de la biologie cutanée combinée à l'utilisation de technologies sophistiquées dans le domaine des actifs et de la formulation. Hydrater sa peau est le premier geste de soin anti-âge.

Longtemps traditionnelle, la cosmétologie se caractérise aujourd'hui par une approche très technologique. Le domaine des cosmétiques est particulièrement actif en recherche et innovation d'autant que désormais, les femmes, ainsi que les hommes, recherchent dans les cosmétiques de soin ou de maquillage des performances avec, de préférence, un retour à la nature. Le devoir des industries cosmétiques, reconnues pour leur dynamisme économique, est de répondre à toutes ces attentes dans des contextes règlementaires et environnementaux de plus en plus exigeants. Il est donc impératif d'intégrer les notions de « chimie verte », de « développement durable » et de « REACH »¹.

1. Voir *Chimie et expertise, santé et environnement*, coordonné par M.-T. Dinh-Audouin, D. Olivier et P. Rigny, EDP Sciences, 2016.

Comme beaucoup d'autres équipes de recherche, nous nous efforçons de respecter le plus grand nombre des « principes de la chimie verte », qui sont au nombre de douze, et nous faisons appel à la richesse des constituants naturels issus de plantes terrestres ou aquatiques pour découvrir de nouveaux composés et isoler les nombreuses structures complexes que la nature met à notre disposition (voir aussi le **Chapitre de P. André** dans *Chimie, dermo-cosmétique et beauté*).

Les douze principes de la chimie verte, selon P.T. Anastas et J.C. Warner, sont les suivants :

- 1) Réduction des déchets
- 2) Conception de produits chimiques efficaces avec peu ou pas de toxicité
- 3) Conception de synthèses moins nocives
- 4) Utilisation de ressources renouvelables
- 5) Utilisation de catalyseurs recyclables (et non de réactifs stœchiométriques)
- 6) Limitation de groupements protecteurs
- 7) Favoriser les approches à économie d'atomes
- 8) Utilisation des solvants et de réactions peu ou pas toxiques
- 9) Amélioration du rendement énergétique



Figure 4

La nature recèle une richesse de molécules complexes que l'on peut isoler ou dont on peut s'inspirer pour concevoir de nouveaux cosmétiques.

- 10) Conception de produits chimiques dégradables
- 11) Analyser en temps réel pour éviter la pollution
- 12) Minimiser les risques d'accidents.

Ce type de travail requiert généralement la combinaison de techniques de séparation pour isoler une substance à l'état pur (chromatographie, distillation, cristallisation...), avec des méthodes d'analyse spectroscopique pour en déterminer la structure (RMN, spectrométries de masse, infrarouge...).

2 Apporter une meilleure connaissance scientifique des plantes endémiques ou typiques marocaines comme source de nouveaux actifs

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'un partenariat entre la région Centre et la région de Meknes Tafilalet au Maroc (*Figure 5*).

2.1. Étude phytochimique de plantes du Maroc

L'engouement actuel pour les plantes à usage médicinal et cosmétique entraîne une diminution des ressources, d'où

la nécessité d'une approche éco-responsable pour pallier la diminution accélérée des espèces végétales au sein d'un environnement fragilisé.

Il est nécessaire d'avoir une approche éco-responsable globale qui implique une préservation et une gestion durable de la biodiversité. En conséquence, la priorité sera donnée à l'utilisation de plantes cultivées et, s'il y a nécessité d'un prélèvement en milieu naturel, des *règles très strictes garantissant que les collectes ne mettent pas en danger la plante dans son environnement* seront appliquées.

Il y a aussi de nombreuses contraintes réglementaires pour l'utilisation d'extraits : l'efficacité et l'innocuité des produits doivent être garanties et encadrées par une législation car, ne l'oublions pas : *« Tout ce qui est naturel n'est pas forcément bon »*. Il est donc indispensable d'avoir une bonne connaissance de la composition de l'extrait, et il y a nécessité du *« scientifiquement prouvé »* : activité démontrée de l'extrait ou de la molécule impliquée dans l'activité visée et *développement des actifs ou ingrédients avec des procédés verts*.



Figure 5

On trouve au Maroc une grande biodiversité de plantes à usage médicinal et cosmétique, dont il est nécessaire d'assurer une gestion éco-responsable.

Pour ce type d'étude, la démarche mise en œuvre est la suivante :

- sélection d'une dizaine de plantes typiques du Maroc sur la base de leurs usages traditionnels ;
- récolte, identification botanique et essais de domestication végétale ;
- criblage de l'activité biologique des extraits ;
- meilleure connaissance analytique de la composition phytochimique de ces plantes ;
- développement de procédés d'extraction, d'analyse, de purification et d'identification « verts » et performants ;
- hémisynthèse et pharmacomodulation des molécules extraites pour obtenir des analogues à haute valeur ajoutée. Les synthons chiraux modulables peuvent ainsi conduire à des molécules plus complexes, limitant de fait l'impact environnemental du chimiste organicien puisque limitant considérablement le nombre d'étapes de synthèse et donc l'utilisation de solvants et autre réactifs plus ou moins toxiques.

Anvillea radiata *coss. & dur.* est un petit arbrisseau endémique saharien, reconnaissable à ses feuilles vert bleuté en forme de triangle allongé et à bords dentés (**Figure 6A**).

Il a une très forte odeur aromatique et se rencontre généralement dans les dépressions sablo-argileuses. C'est un excellent pâturage pour les chameaux et les chèvres.

De premières études phytochimiques menées par des procédés conventionnels – extraction par macération au chloroforme, purification des composés sur colonne ouverte de silice – ont permis de détecter la présence de composés dérivés de parthénolides (**Figure 6B**). Ces molécules sont particulièrement intéressantes puisque décrites comme étant les premières petites molécules sélectives contre les cellules souches cancéreuses². Leur synthèse est ardue et l'extraction est un bon moyen d'obtenir ces précurseurs pharmacomodulables. Il convient de noter qu'une des études sur cette plante a montré la présence de composés phénoliques.

2.2. Méthodes d'analyse et de purification

2.2.1. Fractionnement-purification

La séparation des composés peut se faire de façon grossière par des extractions

2. *Drug Discovery Today* (2013), 18 : 894-904.

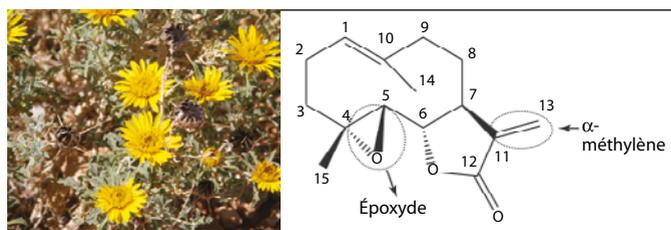


Figure 6

Des composés dérivés de parthénolides ont été identifiés dans l'arbrisseau endémique saharien *Anvillea radiata* *coss. & dur.*

liquide-liquide successives et par variation des phases liquides qui solubilisent plus ou moins efficacement certaines familles de molécules (Figure 7).

La séparation peut aussi se faire par chromatographie sur colonne mais nécessite une utilisation importante de solvants et peut engendrer des pertes de matière par adsorption de certains composés sur la phase stationnaire, constituée de gel de silice dans la majorité des cas (Figure 8).

Notre objectif est de développer des méthodes d'extraction et de purification plus écoresponsables permettant de valoriser plusieurs familles de molécules.

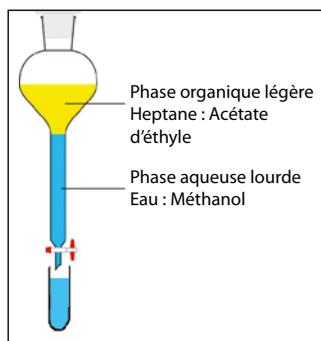


Figure 7

Fractionnement grossier par extraction liquide-liquide.

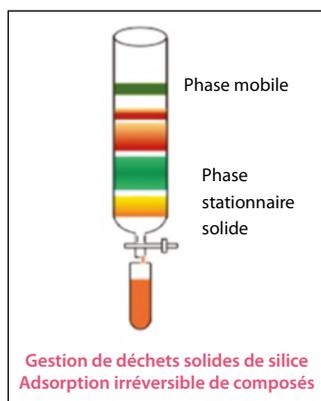


Figure 8

La séparation par chromatographie sur colonne est très consommatrice de solvants et peut engendrer des pertes de matière par adsorption irréversible de composés sur la phase stationnaire. Elle nécessite en outre une gestion de grandes quantités de déchets solides de silice.

2.2.2. Extraction sélective des composés par fluide pressurisé

L'ASE (« Accelerated Solvent Extraction », ou Extraction par Solvant Accélérée) permet une extraction par solvant à haute température (jusqu'à 200 °C) et sous forte pression (100 bar) de matrices végétales contenues dans une cellule en acier inoxydable de volume variable (Figure 9). Cette combinaison de pression et de température fournit un processus d'extraction rapide et efficace. L'augmentation de la température diminue la viscosité des solvants permettant une meilleure pénétration dans la matrice solide et des interactions solvant-matrice-molécules plus faibles. Les taux de diffusion deviennent plus rapides à température élevée, ce qui diminue le temps d'extraction (Figure 10).

2.2.3. Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

La CPC est fondée sur le principe d'équilibre hydrostatique utilisant un champ centrifuge autour d'un axe. On a deux phases liquides, l'une servant de phase mobile et l'autre servant de phase stationnaire, maintenue en place par la force centrifuge (Figure 11).

Le système est amovible et peut s'équiper d'une colonne de 50 mL, 200 mL ou 1 L. L'intérieur de la colonne est composé d'un assemblage de disques et de joints interdiscs en polytétrafluoroéthylène (PTFE). La phase mobile est pompée à travers la phase stationnaire (pompe HPLC) et va occuper un volume appelé volume mort, tandis que le reste de la phase stationnaire reste statique.

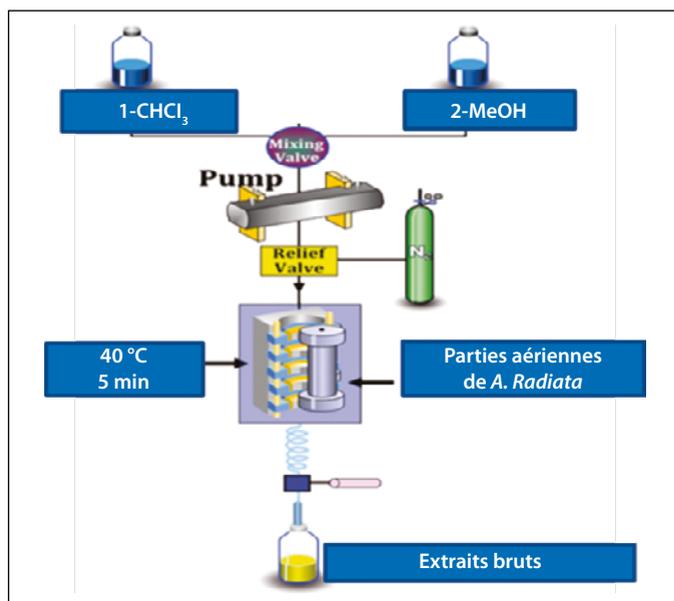


Figure 9

L'Extraction par Solvant Accélérée permet une extraction par solvant à haute température et sous forte pression de matrices végétales contenues dans une cellule en acier inoxydable de volume variable.

Source : Adapté d'Aaron Kettle (2013). LCGC, vol. 31, Issue 11.

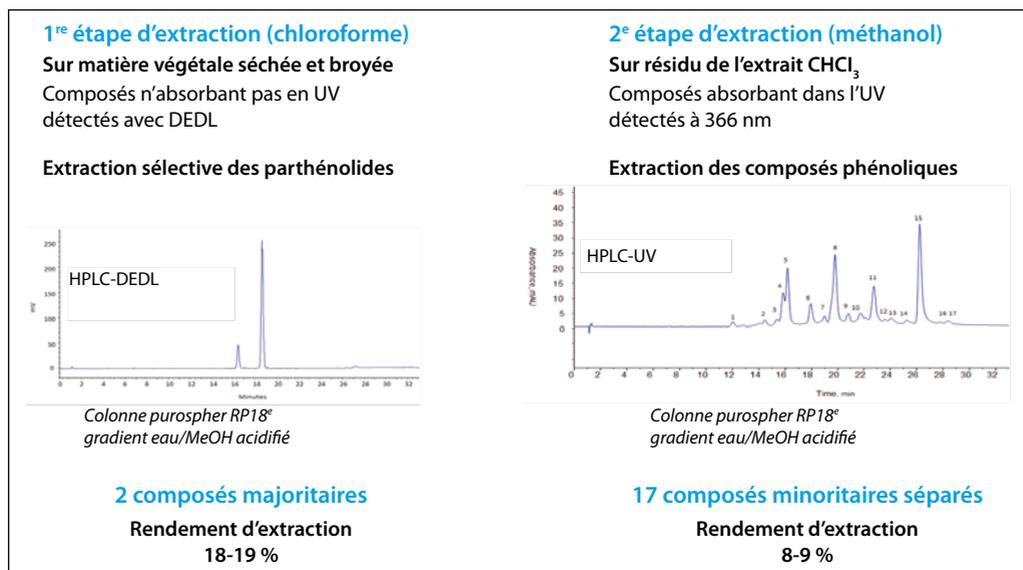


Figure 10

Exemples d'extraction par solvant accélérée par fluide pressurisé.

Une fois l'équilibre atteint, la phase mobile circule jusqu'à l'extrémité de la colonne. En complément de ces aspects analytiques pour lesquels la caractérisation rapide en

ligne et non ciblée est privilégiée, nous nous sommes également attachés à développer des méthodes de fractionnement et de purification des molécules naturelles à

l'échelle semi-préparative, en utilisant la CPC. La séparation des composés se fait grâce à l'utilisation d'un système liquide biphasique (Figure 11). L'une de deux phases est maintenue stationnaire à l'intérieur de la colonne par la force centrifuge et l'autre phase, constituant la phase mobile, est poussée au travers de la première par une pompe HPLC. Les composés sont élués en fonction de leur coefficient de partage K_d et donc de leur affinité respective pour les deux phases.

La plupart du temps, la CPC peut être utilisée pour effectuer la purification de composés d'intérêt comme, par exemple, des composés majoritaires d'un extrait. Des couplages innovants avec la spectrométrie de masse ont aussi été développés pour aller plus loin dans le criblage phytochimique, afin d'effectuer simultanément la purification et l'identification des composés.

Les avantages de la CPC sont :

(i) l'absence de support solide ; il n'y a donc pas d'adsorption irréversible, pas de perte d'échantillon et pas de dénaturation ;

(ii) la flexibilité de la technique, puisqu'on peut séparer des composés apolaires, polaires, ionisables, le tout avec une grande capacité d'injection.

Pour un mélange biphasique donné, le coefficient de partage d'une substance donnée A est défini selon la loi de Nernst par le rapport entre sa concentration dans la phase supérieure et sa concentration dans la phase inférieure. Lorsque le $K_d > 1$, le soluté a plus d'affinité pour la phase supérieure, et inversement. Différents solutés pourront être séparés si leur valeur de K_d est différente. C'est un peu comme si l'on était en présence de plusieurs ampoules à décanter en série, la phase stationnaire légère se trouvant dans l'ensemble des ampoules. L'échantillon à séparer est ajouté dans la première ampoule, suivi de la phase mobile lourde. Plus il y a d'ampoules, plus il sera possible de séparer efficacement les solutés (Figure 12).

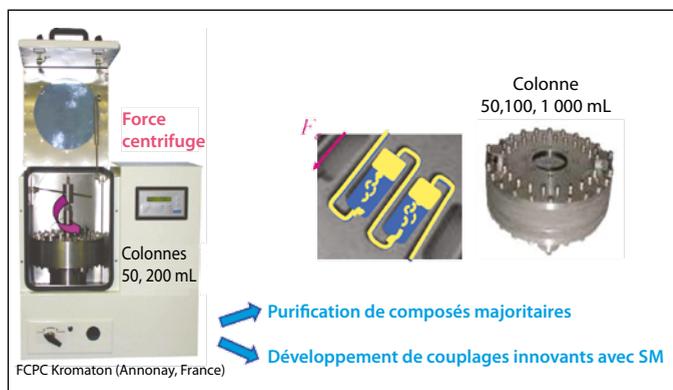
2.2.4. Fractionnement-purification de molécules

Le fractionnement-purification des molécules se fait via

Figure 11

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) permet la séparation des composés à l'échelle semi-préparative, en utilisant deux liquides biphasiques : une phase stationnaire (force centrifuge) et une phase mobile (poussée par une pompe HPLC).

HPLC : « High performance liquid chromatography », ou chromatographie en phase liquide haute performance.



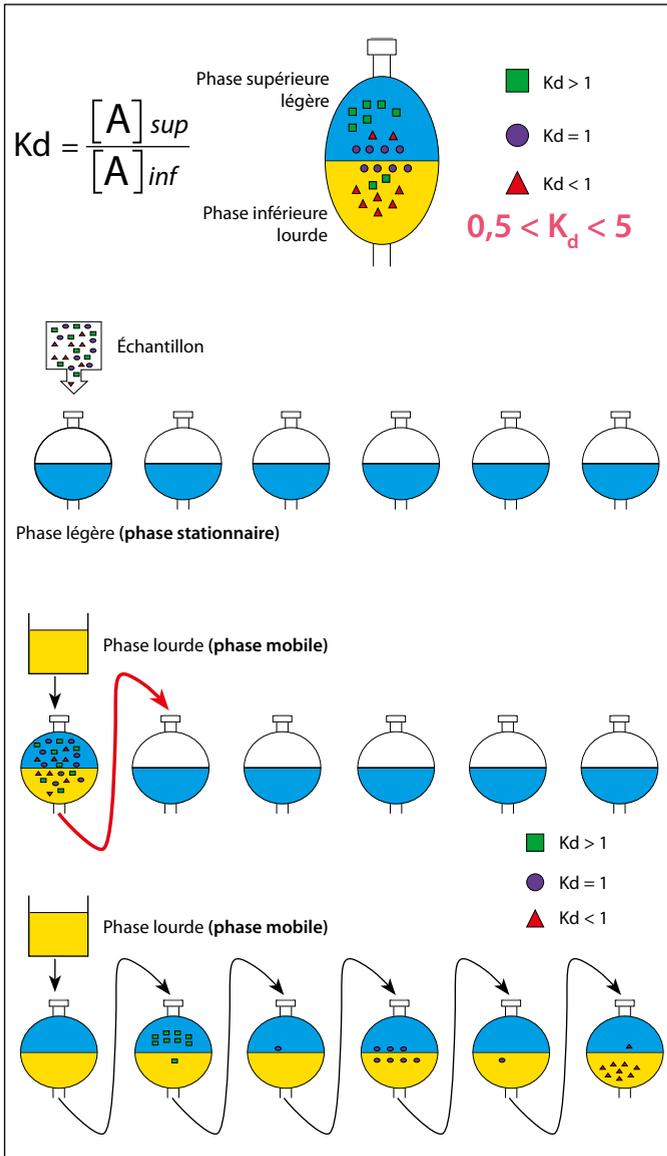


Figure 12

La chromatographie de partage centrifuge peut être équivalente à des purifications successives à l'aide de plusieurs ampoules à décanter en série.

un couplage avec une chromatographie liquide haute performance (HPLC) via une vanne qui prélève une très petite quantité de la phase en même temps que la collecte et qui permet, avec un détecteur adéquat, de réaliser un chromatogramme (Figure 13). En effet, faire l'analyse de tous les tubes serait long et coûteux.

2.2.5. Purification des dérivés de parthénolides en mode isocratique

Nous avons cherché ici un système biphasique adapté et avons réalisé avec succès la séparation de deux composés (Figure 14). Le chromatogramme obtenu avec un détecteur à diffusion de la lumière (DEDL) nous montre bien la présence de deux

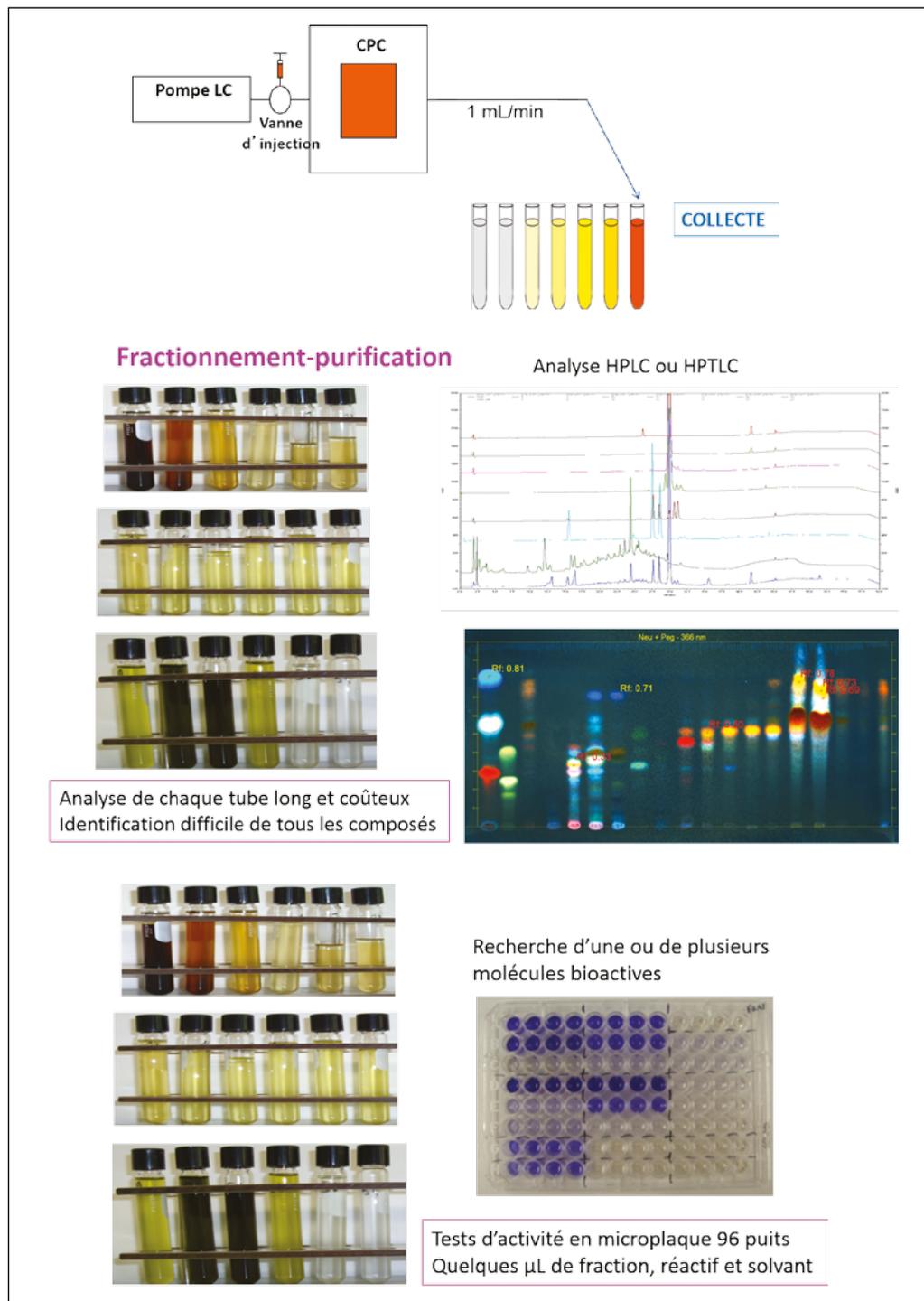


Figure 13

Le fractionnement-purification.

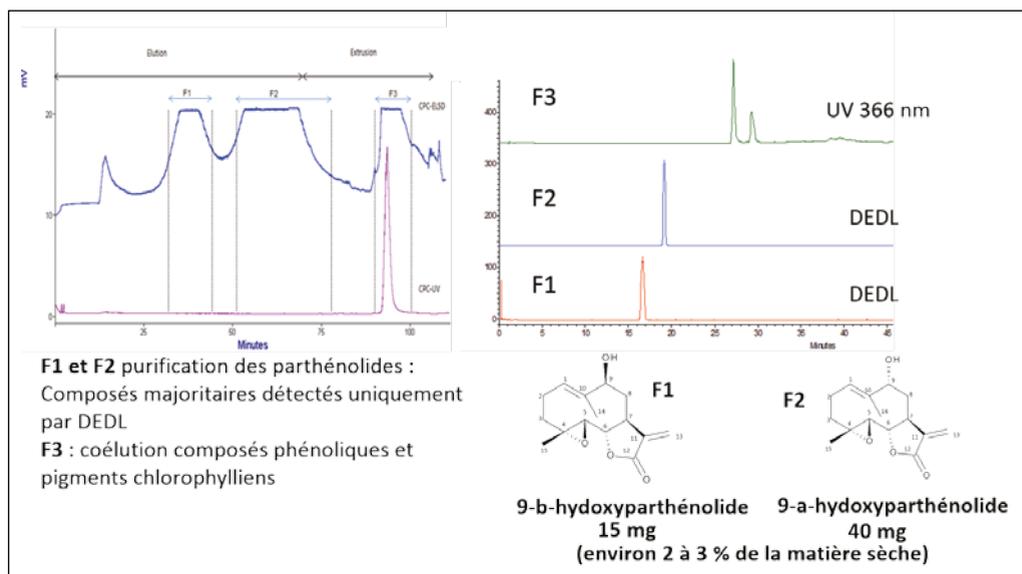


Figure 14

Séparation de trois composés parthénolides, F1, F2 et F3, détectés avec un détecteur à diffusion de la lumière (DEDL).

Colonne CPC : 50 mL ; mode descendant 2 000 rpm, 3 mL.min⁻¹ ; injection 150 mg extrait.

Système arizona F hept/AcOEt/MeOH/H₂O (1:5:1:5 v/v/v).

Source : *Journal of Chromatography B* (2015), 985: 29-37.

composés majoritaires. Ils correspondent à deux germacranolides, mais on observe aussi un troisième pic visible en DEDL et en UV. L'analyse des fractions nous a confirmé la pureté de chacune des fractions 1 et 2. L'analyse en spectrométrie de masse permet d'identifier deux hydroxy parthénolides et une analyse par RMN permet de confirmer la nature de l'isomère en présence.

2.2.6. Amélioration de la purification en mode gradient d'éluion linéaire

Dans ce cas, la CPC nous a permis dans un premier temps de purifier les composés majoritaires de l'extrait puis d'aller chercher également les composés minoritaires

de l'extrait d'*Anvillea radiata* en optimisant la méthode (Figure 15).

2.3. *Dittrichia viscosa* ou *Inule visqueuse*

Nous nous sommes intéressés à *Dittrichia viscosa* (Figure 16), particulièrement au niveau de la modification des structures moléculaires, de façon à optimiser l'activité potentielle. Ce n'est pas une plante endémique du Maroc, elle est très répandue dans tout le bassin méditerranéen, pousse très bien même sur les terrains vagues, les bords d'autoroute, etc., ce qui implique un accès aisé en termes de quantité, aux composés naturels qu'elle contient. Cette plante peut être la source de composés

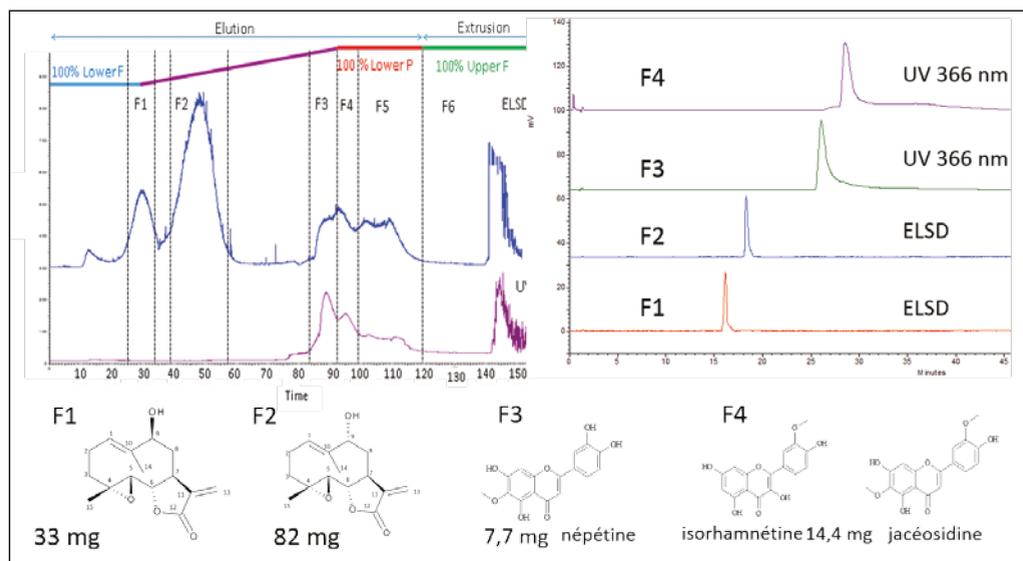


Figure 15

Purification des composés majoritaires et minoritaires d'un extrait d'*Anvillea radiata*.
Système arizona F hept/AcOEt/MeOH/H₂O (1:5:1:5 v/v/v/v)
Système arizona P hept/AcOEt/MeOH/H₂O (6:5:6:5 v/v/v/v); Injection 350 mg d'extrait.

Figure 16

Dittrichia viscosa, une plante répandue dans tout le bassin méditerranéen, source de composés biologiquement actifs aux propriétés multiples : anti-inflammatoire, antiseptique, antipyrétique et antioxydante.



biologiquement actifs, que ce soit en cosmétique ou en thérapeutique : anti-inflammatoire, antiseptique, antipyrétique et antioxydante.

La première étape consiste à obtenir les synthons chiraux via une extraction de la plante qui a été préalablement séchée et broyée (Figure 17). 240 grammes de cette plante nous ont permis, après une extraction liquide en présence de dichlorométhane, d'obtenir

divers produits. Le traitement de l'extrait dichlorométhanique en milieu basique aqueux nous a permis de séparer un premier composé obtenu en quantité intéressante, et le traitement de la phase aqueuse en présence d'acide chlorhydrique conduit aux deux acides isocostique et ilicique en quantité importante.

La synthèse totale de ces composés ne permettait d'obtenir

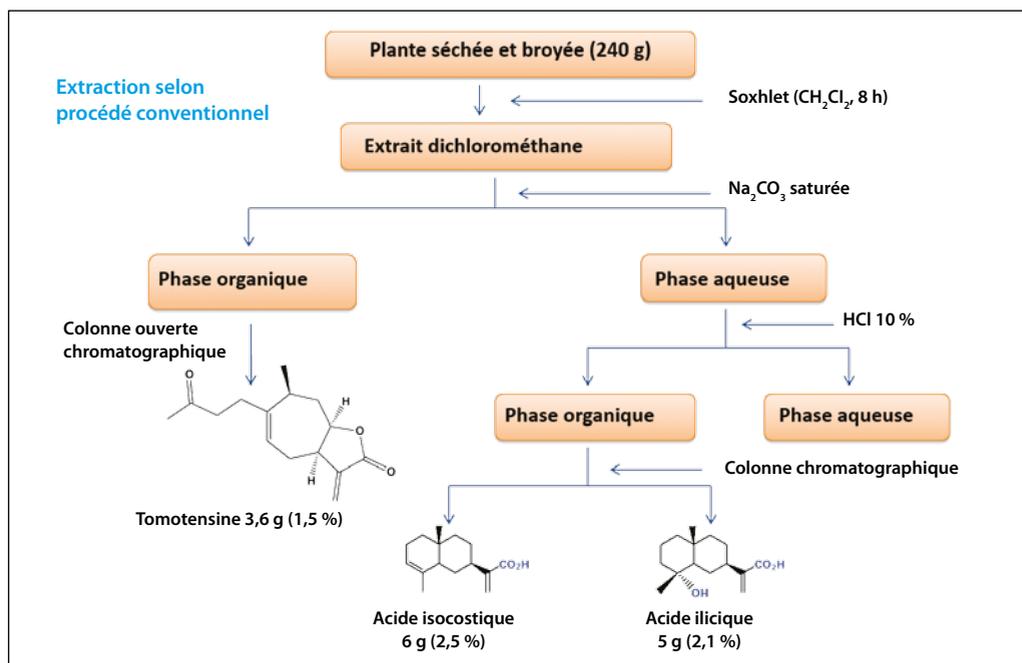


Figure 17

Extractions de synthons chiraux, acide isocostique et acide ilicique, à partir d'extraits de *Ditttrichia viscosa*.

qu'un mélange difficilement séparable des isomères avec, selon les procédures envisagées, des rendements globaux allant de 0,9 % sur 16 étapes pour l' α à 6,9 % en 12 étapes pour le β (Figure 18).

L'hémisynthèse du costal souhaité sous la forme d'un seul isomère, l' α , a été réalisée en seulement 3 étapes avec

un rendement global de 47 % (Figure 19), limitant ainsi notre impact environnemental. De nombreuses modulations de ces bicycles sont possibles.

2.4. Exemples de modifications à partir de la Tomentosine

L'utilisation des produits extraits de *Ditttrichia viscosa*

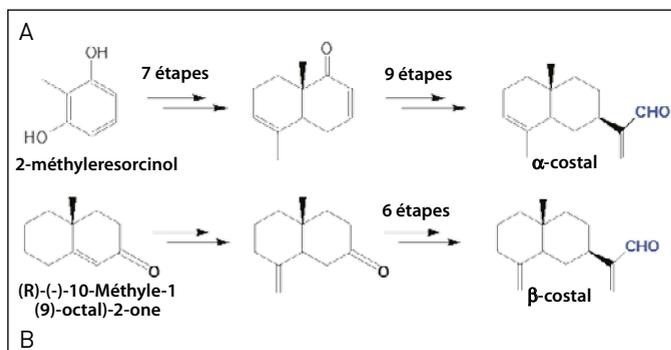
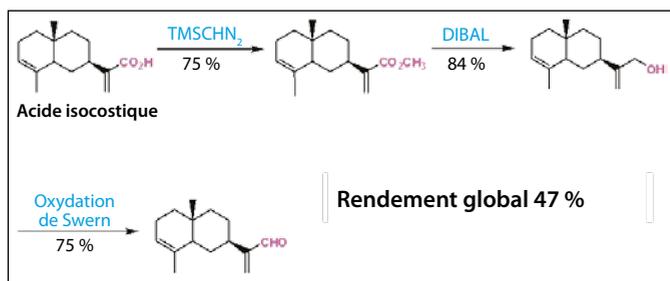


Figure 18

Synthèse totale de l' α -costale et de la β -costale. A) par l'équipe de Hsing-Jang Liu (16 étapes, rendement global 0,9 %); B) par l'équipe de J.A. Marshall (12 étapes, rendement global 6,9 %).

Figure 19

Hémisynthèse de l' α -costale en trois étapes, avec un rendement global de 47 %.



a permis la conception de bibliothèques de composés ayant aussi la tomentosine comme structure de base. Pour ce faire, plusieurs voies d'accès à ce type de dérivés ont été mises au point, menant à divers composés

potentiellement biologiquement actifs (Figure 20). Ces travaux nous ont permis de générer des composés assez complexes en un nombre réduit d'étapes, comparativement à des synthèses totales.

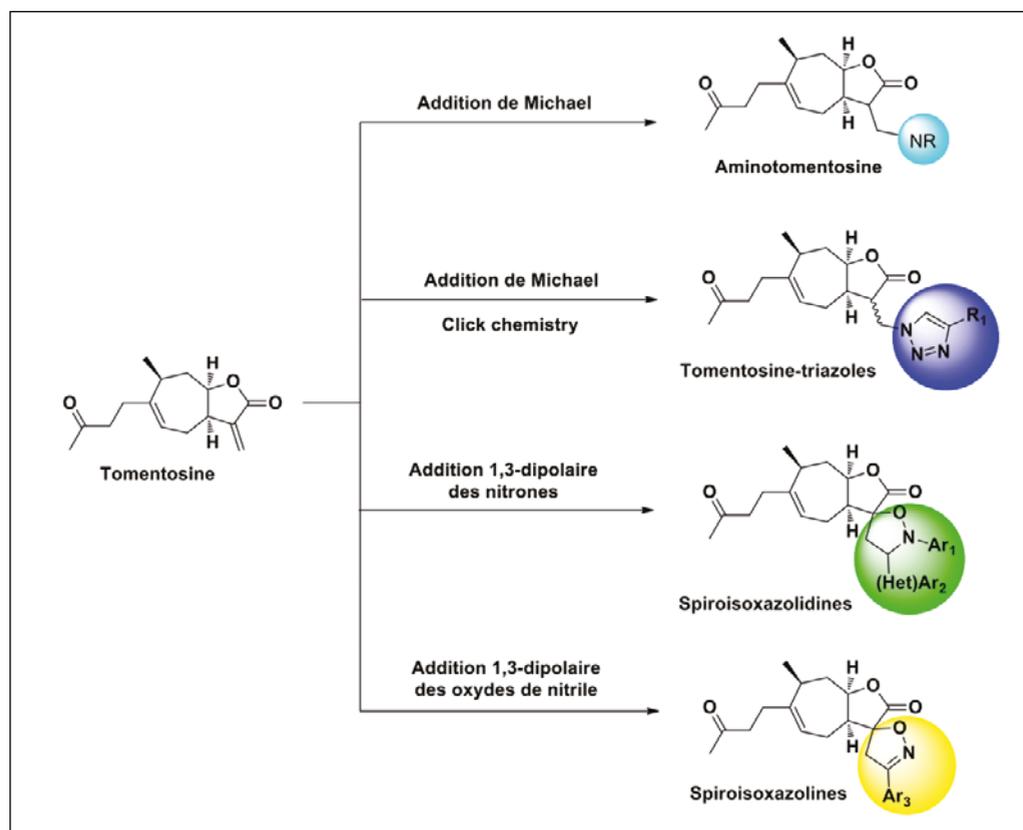


Figure 20

Synthèse d'une bibliothèque de composés ayant la tomentosine comme structure de base.

La phytochimie, une voie d'avenir pour les cosmétiques

La nature offre une très grande diversité moléculaire dont la valorisation représente un potentiel économique important. Cependant, il est nécessaire d'assurer un approvisionnement végétal suivi et contrôlé (protocole de Nagoya) et de séparer les composés bioactifs de la matrice végétale. Pour cela, de nombreuses étapes restent nécessaires : extraction, isolement par des essais bio-guidés, identification. Ces processus restent actuellement longs et coûteux, ce qui est un frein au développement industriel.

Les défis majeurs actuels de la phytochimie sont l'innovation technologique dans le développement de nouvelles méthodes d'extraction, de séparations chromatographiques rapides, de miniaturisation, et des méthodes de couplage entre les procédés de séparation et de détermination structurale des molécules.

Cette innovation technologique devra s'inscrire dans une démarche de « chimie verte » et de respect de l'environnement. Les solutions technologiques minimiseront l'utilisation de solvants, rechercheront des alternatives aux solvants polluants et aux auxiliaires de synthèse et permettront la production rentable d'extraits de grande qualité.