



Institut régional de recherche  
Charles Viollette



École doctorale SMRE

Thèse de doctorat en **Biologie, Médecine et Santé** :  
**Biomolécules, Pharmacologie et Thérapeutique**

En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Lille

# **Les composés phénoliques du houblon, *Humulus lupulus* L. : Lutte contre la résistance microbienne et perspectives industrielles**

Présentée et soutenue publiquement le 21 septembre 2018

Par **Laetitia Bocquet**

Institut Charles Viollette, EA 7394

## **Composition du Jury :**

Pr Sylvie Baltora, Université de Picardie Jules Verne

**Rapporteur**

Pr Pierre Waffo-Téguo, Université de Bordeaux

**Rapporteur**

Pr Jean-Louis Hilbert, Université de Lille

**Examineur**

Dr Eldra Delannay, Groupe Clarins, Paris

**Examinatrice**

Pr Sevser Sahpaz, Université de Lille

**Directrice de thèse**

Dr Céline Rivière, Université de Lille

**Encadrante**

Dr Christel Neut, Université de Lille

**Membre invitée**

Dr Ali Siah, Université de Lille

**Membre invité**





École doctorale SMRE

Thèse de doctorat en **Biologie, médecine et santé** :  
**Biomolécules, Pharmacologie et Thérapeutique**

En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Lille

# **Les composés phénoliques du houblon, *Humulus lupulus* L. : Lutte contre la résistance microbienne et perspectives industrielles**

Présentée et soutenue publiquement le 21 septembre 2018

Par **Laetitia Bocquet**

Institut Charles Viollette, EA 7394

## **Composition du Jury :**

Pr Sylvie Baltora, Université de Picardie Jules Verne	<b>Rapporteur</b>
Pr Pierre Waffo-Téguo, Université de Bordeaux	<b>Rapporteur</b>
Pr Jean-Louis Hilbert, Université de Lille	<b>Examineur</b>
Dr Eldra Delannay, Groupe Clarins, Paris	<b>Examinatrice</b>
Pr Sevser Sahpaz, Université de Lille	<b>Directrice de thèse</b>
Dr Céline Rivière, Université de Lille	<b>Encadrante</b>
Dr Christel Neut, Université de Lille	<b>Membre invitée</b>
Dr Ali Siah, Université de Lille	<b>Membre invité</b>

**Mots clés :** houblon, composés phénoliques, fractionnement bioguidé, antibactérien, SARM, antifongique, bio-fongicide

**Keywords:** hops, phenolic compounds, bioguided fractionation, antibacterial, MRSA, antifungal, bio-fungicide

Cette thèse a été préparée dans le laboratoire suivant :

**EA 7394 - Institut Charles Viollette**

Laboratoire de Pharmacognosie  
Faculté de Pharmacie de l'Université de Lille  
3, rue du Professeur Laguesse  
59000 Lille  
France



Financement : Région Haut-de-France et Université de Lille



« Tout obstacle renforce la détermination,  
celui qui s'est fixé un but n'en change pas. »

Léonard de Vinci

---

# Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Céline Rivière, pour m'avoir fait confiance et m'avoir intégrée à ce projet, puis pour m'avoir guidée, conseillée et encouragée depuis plus de 3 ans. Merci pour tes nombreux conseils. J'espère avoir été à la hauteur. Pr Sevser Sahpaz, directrice de ma thèse et chef de service du laboratoire de pharmacognosie, merci pour votre présence bienveillante et votre gentillesse. Jennifer, merci de m'avoir formée sur de nombreuses techniques, de m'avoir si souvent accompagnée et aidée, autant sur le plan professionnel que personnel. Je remercie également tous les membres du laboratoire de pharmacognosie : Vincent, Thierry, Simon et Natacha pour leur expertise, leur contribution à ce travail et les nombreuses discussions scientifiques fructueuses. Merci également à Ayano et Cécile, pour leur patience envers les tâches administratives, sans oublier Malika, tellement agréable à côtoyer. Je suis consciente d'avoir eu énormément de chance d'être entourée de personnes comme vous, de pouvoir travailler dans une ambiance si positive. Je savais que je pouvais compter sur chacun d'entre vous, à tout moment. Une pensée pour les étudiants en stage ou en thèse que j'ai croisé au cours de ces trois années. Mention spéciale à Rym et Moussa, on en aura vécu tellement, jamais je ne vous oublierai ; et Camille, collègue de bureau devenue amie.

Je tiens à remercier l'équipe du laboratoire de bactériologie clinique. Dr Christel Neut, un immense merci pour votre bienveillance à mon égard, merci de m'avoir suivie pour les analyses bactériologiques et de m'avoir transmis de vos nombreuses connaissances. Un message tout particulier à Séverine, Charlotte, Fanny, Isabelle et Oumaïra sans qui cette thèse n'aurait pas été la même. Bien plus que des collègues, merci pour vos innombrables conseils pendant ces trois années. Votre bonne humeur sans faille est une réelle bouffée d'oxygène. Présentes dans les bons moments et dans les moins bons, vous m'avez aidé à relever la tête lorsque j'en avais besoin. Du fond du cœur je vous en suis reconnaissante. Je n'oublie pas Carole, Mélissa et Élodie, merci à vous toutes.

Merci à tous les membres de l'équipe du Pr Patrice Halama de l'ISA de Lille, qui ont également participé à ce travail, merci pour votre accueil et votre sympathie : Caroline Choma et Caroline Deweer, Jérôme, Ourida, Samara, Myriam et Justine. Un

merci tout particulier au Dr Ali Siah, pour son aide et ses conseils concernant les travaux sur *Z. tritici*. Merci à Charles Dermont, de m'avoir initiée à l'analyse de l'huile essentielle.

J'aimerais également remercier le Dr Sébastien Anthérieu, du laboratoire de toxicologie, de m'avoir formée à la culture cellulaire. Merci au Dr Vincent Roumy, grâce à qui j'ai pu faire ces tests et avec qui j'ai partagé quelques expérimentations. Ton sens de l'humour et ta gentillesse sont un réel plaisir au quotidien. Merci au Dr Feng Chai et au Dr Claire Beaufay pour leur disponibilité concernant les tests de cytotoxicité, et leur sympathie.

Côté ASQV, je souhaite remercier le Dr Caroline Rambaud et Audrey Etienne, pour les travaux de culture *in vitro*. Une pensée pour Pr Jean-Louis Hilbert, ainsi que tous les membres de l'équipe et plus largement les collègues de l'Institut Charles Viollette (ICV) que j'ai eu le plaisir de côtoyer.

Merci au Pr Jean Michel Mérillon, pour ses nombreux conseils au cours de mes comités de suivis de thèse. Pour cela, je remercie à nouveau Pr Jean Louis Hilbert et Dr Christel Neut. J'exprime également tous mes remerciements aux Pr Sylvie Baltora, Pr Pierre Waffo-Tégou et Dr Eldra Delannay pour l'honneur qu'ils me font de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie également l'Université de Lille et la région Hauts-de-France pour le financement de ce projet. Merci aux membres de la ferme Beck (Bailleul, 59) de nous fournir le matériel végétal chaque année, à Alexis Noé Blaise (Pôle NSL), ainsi qu'aux brasseries Page 24 (Aix-Noulette, 62) et Saint-Sylvestre (Saint-Sylvestre-Cappelle, 59).

À titre plus personnel, je remercie chaleureusement Alexis, mon compagnon, pour sa grande patience et son soutien moral. Merci à mes amis Justine, Sandy, Alex, Syrine, Angélique, Alice, Thibault, Marine, Gary ... Merci à Mikl et à toute l'équipe AWCS qui m'a accompagnée pendant ces trois années, merci de faire que chaque moment de danse soit si convivial et agréable. À ma famille, maman, Céline, Guillaume, Sabrina, Sophie, Angélique, mamie, papi et depuis plus récemment Adrien et Alice, pour leur présence et leur soutien. Maman si j'en suis là aujourd'hui, c'est avant tout grâce à toi. Grazie Mille.



# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>II</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>XV</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>1</b>
<b>PREMIÈRE PARTIE SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>3</b>
CHAPITRE 1.  CONTEXTE DE L'ÉTUDE.....	4
1.1. <i>La résistance aux antibiotiques dans le traitement des infections bactériennes.....</i>	4
1.1.1.  La résistance aux antibiotiques : un problème de santé publique.....	4
1.1.2.  Généralités sur les mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	5
1.1.3.  Cas des <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méticilline (SARM).....	6
1.2. <i>Une agriculture intensive controversée à cause des produits phytosanitaires utilisés.....</i>	12
1.2.1.  Vers une réduction des pesticides conventionnels.....	12
1.2.2.  Le biocontrôle : un marché en pleine croissance.....	14
1.2.3. <i>Zyloseptoria tritici</i> : un champignon pathogène du blé.....	17
1.3. <i>Les produits d'origine naturelle : perspectives de lutte antimicrobienne.....</i>	18
CHAPITRE 2.  LE HOUBLON : UNE SOURCE DE METABOLITES SECONDAIRES ORIGINAUX.....	21
2.1. <i>Présentation du houblon, Humulus lupulus L. ....</i>	21
2.1.1.  Description botanique.....	21
2.1.2.  Culture en France et dans le monde.....	23
2.2. <i>Le métabolisme du houblon : composition chimique et biosynthèse.....</i>	25
2.2.1.  Les métabolites primaires.....	25
2.2.2.  Les métabolites secondaires.....	25
2.2.3.  Techniques d'analyses des métabolites secondaires du houblon.....	33
2.3. <i>Utilisation du houblon dans la bière.....</i>	37
2.3.1.  La place du houblon dans le processus de fabrication de la bière.....	37
2.3.2.  Devenir des composés d'intérêt dans la bière.....	38
2.3.3.  Les sous-produits brassicoles.....	40
2.4. <i>Utilisation du houblon en santé et propriétés biologiques associées.....</i>	41
2.4.1.  Activités antimicrobiennes.....	41
2.4.2.  Activités sédatives.....	43
2.4.3.  Activités antioxydantes.....	44
2.4.4.  Activités anti-inflammatoires.....	44
2.4.5.  Activités œstrogéniques.....	45
2.4.6.  Activités anti-oncogènes et anti-mutagènes.....	45
2.4.7.  Autres activités biologiques.....	46

2.4.8.	Les métabolites secondaires : un rôle de défense <i>in planta</i> ?.....	46
2.5.	<i>Biodisponibilité et toxicité du houblon et de ses métabolites</i> .....	47
2.5.1.	Toxicologie.....	47
2.5.2.	Biotransformations et biodisponibilité.....	48
2.6.	<i>Biotechnologies végétales et culture in vitro de houblon</i> .....	50
2.6.1.	La culture <i>in vitro</i> ou micro-propagation.....	50
2.6.2.	Les cultures de « hairy roots » ou « chevelus racinaires » .....	51
2.6.3.	Les suspensions cellulaires .....	52
2.6.4.	La production hétérologue .....	52
<b>DEUXIÈME PARTIE .....</b>		<b>53</b>
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>		<b>53</b>
CHAPITRE 3.	PHYTOCHIMIE : EXTRACTION, PURIFICATION, CARACTÉRISATION ET QUANTIFICATION DES COMPOSÉS ANTIMICROBIENS DU HOUBLON .....	54
3.1.	<i>Composition des diverses parties de houblon</i> .....	54
3.1.1.	Caractérisation par CLHP-UV des extraits et sous-extraits .....	54
3.1.2.	Profil chromatographique des extraits de cônes en CLUHP-UV .....	61
3.1.3.	Dosage des produits d'intérêt dans les diverses parties de houblon par CLUHP-UV .....	62
3.1.4.	Huile essentielle de cônes .....	66
3.2.	<i>Purification des composés antimicrobiens</i> .....	67
3.2.1.	Purification du xanthohumol par CPC .....	68
3.2.2.	Purification du desméthylxanthohumol .....	71
3.2.3.	Purification des dérivés prénylés d'acylphloroglucinols.....	72
3.2.4.	Rendements en composés d'intérêt.....	73
3.3.	<i>Axes d'amélioration du processus de purification</i> .....	74
3.3.1.	Cas du desméthylxanthohumol .....	74
3.3.2.	Cas de la lupulone .....	78
3.3.3.	Résumé des essais d'amélioration du processus de purification .....	81
3.4.	<i>Élucidation structurale des produits purifiés</i> .....	83
3.4.1.	Les chalcones.....	83
3.4.2.	Les dérivés d'acylphloroglucinols .....	83
3.5.	<i>Autres voies d'obtention des métabolites d'intérêt</i> .....	87
3.5.1.	Les sous-produits d'origine brassicole, une ressource rentable ? .....	87
3.5.2.	Production des métabolites par les biotechnologies végétales .....	89
3.6.	<i>Conclusion et perspectives</i> .....	92
CHAPITRE 4.	ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DU HOUBLON ENVERS DES PATHOGÈNES HUMAINS .....	94
4.1.	<i>De l'activité des extraits à l'identification des produits actifs</i> .....	94
4.1.1.	Activité des extraits et des sous-extraits de houblon .....	94
4.1.2.	Identification des composés phénoliques antibactériens .....	97
4.2.	<i>Analyse du potentiel du xanthohumol, du desméthylxanthohumol et de la lupulone envers un isolat clinique de S. aureus résistant à la méticilline</i> .....	101
4.2.1.	Recherche de synergies d'association .....	101
4.2.2.	Analyse des courbes de croissance.....	105
4.2.3.	Quantification de l'effet post-antibiotique.....	106
4.2.4.	Mise en évidence de l'effet anti-biofilm.....	107
4.3.	<i>Cytotoxicité des extraits, sous-extraits et produits actifs</i> .....	111
4.4.	<i>Conclusion et perspectives</i> .....	113
CHAPITRE 5.	ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DU HOUBLON VIS-À-VIS DE <i>Z. TRITICI</i> .....	117
5.1.	<i>Criblage des extraits des différentes parties de la plante</i> .....	117
5.2.	<i>Identification des produits actifs</i> .....	119

5.3.	<i>Conclusion et perspectives</i> .....	121
<b>TROISIÈME PARTIE</b> .....		<b>123</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....		<b>123</b>
CHAPITRE 6.	PHYTOCHIMIE : EXTRACTION, PURIFICATION ET CARACTÉRISATION.....	124
6.1.	<i>Préparation des extraits, sous-extraits et huiles essentielles des parties de houblon</i> .....	124
6.1.1.	Matériel végétal .....	124
6.1.2.	Réalisation des extraits et sous-extraits .....	124
6.1.3.	Préparation des huiles essentielles .....	125
6.2.	<i>Caractérisation des extraits, sous-extraits et huiles essentielles</i> .....	126
6.2.1.	Caractérisation par CCM.....	126
6.2.2.	Caractérisation par CLHP-UV .....	126
6.2.3.	Dosage des produits par CLUHP-UV .....	127
6.2.4.	Caractérisation de l'huile essentielle par CPG-SM.....	130
6.3.	<i>Purification des composés phénoliques prénylés majoritaires des cônes femelles à partir du sous-extrait DCM</i> .....	130
6.3.1.	Purification du xanthohumol par CPC .....	130
6.3.2.	Purification du desméthylxanthohumol et des acylphloroglucinols par CLHP préparative .....	133
6.4.	<i>Axes d'amélioration du processus de purification</i> .....	134
6.4.1.	Cas du desméthylxanthohumol .....	134
6.4.2.	Cas de la lupulone .....	136
6.5.	<i>Élucidation structurale des produits par CL-SM et RMN</i> .....	136
6.6.	<i>Méthodologie de purification des composés phénoliques prénylés</i> .....	137
6.7.	<i>Autres voies d'obtention des métabolites d'intérêt</i> .....	138
6.7.1.	Recherche des composés d'intérêt dans des sous-produits d'origine brassicole contenant du houblon, analyses par CLHP-UV .....	138
6.7.2.	Production des métabolites d'intérêt par le biais des biotechnologies végétales .....	138
CHAPITRE 7.	ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DU HOUBLON ENVERS DES PATHOGÈNES HUMAINS.....	140
7.1.	<i>Conditions de culture et préparation des souches</i> .....	140
7.2.	<i>De l'analyse de l'activité antibactérienne des extraits et sous-extraits de houblon, à l'identification des composés actifs</i> .....	141
7.2.1.	Activité des divers extraits et sous-extraits .....	141
7.2.2.	Identification des composés phénoliques actifs.....	142
7.2.3.	Activité antibactérienne des produits purifiés .....	143
7.3.	<i>Analyses approfondies avec le xanthohumol, le desméthylxanthohumol et la lupulone sur l'isolat clinique S. aureus T28.1 résistant à la méticilline</i> .....	144
7.3.1.	Potentialisation de l'activité par recherche de synergies d'association .....	145
7.3.2.	Analyse des courbes de croissance.....	147
7.3.3.	Quantification de l'effet post-antibiotique.....	148
7.3.4.	Mise en évidence de l'effet anti-biofilm.....	149
7.4.	<i>Évaluation de la cytotoxicité des extraits et produits actifs</i> .....	153
CHAPITRE 8.	ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DU HOUBLON VIS-À-VIS DE <i>Z. TRITICI</i> .....	155
8.1.	<i>Criblage de l'activité antifongique des extraits et sous-extraits</i> .....	155
8.2.	<i>Identification des produits actifs en microplaques</i> .....	156
CHAPITRE 9.	ANALYSES STATISTIQUES.....	158
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</b> .....		<b>159</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....		<b>162</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Place du houblon dans la classification APG IV (The Angiosperm Phylogeny Group 2016).....	21
<b>Tableau 2.</b> Posologie et méthode d'administration du houblon, <i>Humulus lupulus</i> en fonction du type d'effet souhaité, données pour des personnes de plus de 12 ans (HMPC) .....	43
<b>Tableau 3.</b> Perméabilité d'une monocouche cellulaire de Caco-2 au XN à 3,5 µg.mL <sup>-1</sup> in vitro, d'après les résultats de Pang et al. (2007) ; AP : apical, BL : basal.....	49
<b>Tableau 4.</b> Rendements moyens obtenus pour les extraits bruts et sous-extraits aqueux et DCM en pourcentages de matière sèche ; les rendements des sous-extraits sont calculés à partir de la masse récupérée des extraits bruts. ....	54
<b>Tableau 5.</b> Composés majoritaires identifiés dans un extrait brut de cônes de houblon après analyses par CLUHP-UV-SM, les codes correspondent aux composés mis en avant sur les chromatogrammes de la <b>figure 27</b> .....	61
<b>Tableau 6.</b> Paramètres de validation des gammes étalon du xanthohumol (XN), de l'humulone et de la lupulone par CLUHP-UV pour le dosage des métabolites d'intérêt dans les extraits de houblon, la première concentration de chaque gamme est considérée comme la limite de quantification (LOQ) de chaque produit. ....	62
<b>Tableau 7.</b> Précision de la méthode de dosage pour chacun des composés dans l'extrait brut de cônes ; les coefficients de variation (CV en %) traduisent la répétabilité intra- et inter- jour.....	63
<b>Tableau 8.</b> Concentrations (en µg/mg d'extrait brut ± écart-type) en xanthohumol (XN), desméthylxanthohumol (DMX), co-, ad- et n-humulone ainsi qu'en co-, ad- et n-lupulone dans les différentes parties de pieds femelles de houblon ; ND : composé non détecté, < LOQ : valeur inférieure à la première concentration de la gamme étalon correspondante.....	64
<b>Tableau 9.</b> Caractérisation des composés de l'huile essentielle de cônes femelles de houblon ≥ 1% par CPG-SM.....	67
<b>Tableau 10.</b> Liste des systèmes de solvants évalués pour purifier le xanthohumol (XN) par CPC et Kd attribués par le biais d'analyses en CLHP-UV ; AcOEt : acétate d'éthyle, DCM : dichlorométhane, MeOH : méthanol, CHCl <sub>3</sub> : chloroforme ; ND : Non déterminé .....	68
<b>Tableau 11.</b> Liste des systèmes de solvants évalués pour purifier le desméthylxanthohumol (DMX) par CPC et Kd attribués par le biais d'analyses en CLHP-UV ; ND : Non déterminé .....	76
<b>Tableau 12.</b> Exemples d'essais de systèmes pour la mise au point d'une méthode de purification de la lupulone par CPC avec les coefficients de partage correspondants (Kd) déterminés par CLHP-UV ; le premier objectif étant de séparer les acides α des acides β, les Kd ont été déterminés pour les acides amers majoritaires en incluant les acides α (humulone et co-humulone) et les acides β (lupulone et co-lupulone) ; AcOEt : acétate d'éthyle, MeOH : méthanol, MTBe : éther de méthyl-tert-tiobutyle, ACN : acétonitrile...	80
<b>Tableau 13.</b> Attributions des signaux <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C des chalcones à partir des spectres RMN 1D et 2D dans le MeOH deutéré (MeOD) ; s : singulet, d : doublet, t : triplet, J : constante de couplage en Hz .....	84

<b>Tableau 14.</b> Attributions des signaux $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ des acides $\alpha$ à partir des spectres RMN 1D et 2D Dans le chloroforme deutéré ( $\text{CDCl}_3$ ) ; s : singulet, d : doublet, t : triplet, q : quadruplet, m : multiplet, qd : quadruplet dédoublé, J : constante de couplage en Hz.....	85
<b>Tableau 15.</b> Attributions des signaux $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ des acides $\beta$ à partir des spectres RMN 1D et 2D dans le chloroforme deutéré ( $\text{CDCl}_3$ ) ; s : singulet, d : doublet, t : triplet, q : quadruplet, m : multiplet, dd : doublet dédoublé, J : constante de couplage en Hz.....	86
<b>Tableau 16.</b> Rendements obtenus pour les extraits bruts et sous-extraits aqueux et DCM des sous-produits de brasseries en pourcentages de matière sèche ; les rendements des sous-extraits sont calculés à partir de la masse récupérée des extraits bruts ; - : extraction non effectuée .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Tableau 17.</b> CMI (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) des extraits bruts hydro-alcooliques des parties de pieds femelles de houblon sur le premier panel de souches bactériennes pathogènes de l'Homme ; C : cônes, F : feuilles, T : tiges, R : rhizomes ; antibiotiques de référence : S : sensible, I : sensibilité intermédiaire, R : résistante ; GEN (gentamicine), S : $\leq 4$ , R : $> 8$ ; VAN (vancomycine), S : $\leq 4$ , R : $> 16$ ; AMX (amoxicilline), S : $\leq 4$ , R : $> 16$ ; amphotéricine B (AMB) S $\leq 1$ , R $> 1$ ; fluconazole (FLC) S $\leq 2$ , R $> 4$ ; voriconazole (VRC) S $\leq 0,12$ , R $> 0,12$ (Cavallo et al., 2006) ; Non actif (NA) : CMI $\geq 1,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ .....	95
<b>Tableau 18.</b> CMI (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) des extraits et sous-extraits actifs de cônes femelles, sur un panel de souches exclusivement à Gram positif ; EB : extrait brut hydro-alcoolique, SS-DCM : sous-extrait DCM, SS-A : sous-extrait aqueux ; antibiotiques de référence : S : sensible, I : sensibilité intermédiaire, R : résistante, GEN (gentamicine), S : $\leq 4$ , R : $> 8$ ; VAN (vancomycine), S : $\leq 4$ , R : $> 16$ ; AMX (amoxicilline), S : $\leq 4$ , R : $> 16$ (Cavallo et al., 2006) ; Non actif (NA) : CMI $\geq 1,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ .....	96
<b>Tableau 19.</b> CMI (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) des produits majoritaires purifiés à partir du sous-extrait DCM de cônes femelles de houblon, sur les quatre <i>S. aureus</i> sélectionnées (*SARM) ; XN : xanthohumol, DMX : desméthylxanthohumol.....	98
<b>Tableau 20.</b> CMB (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) des produits majoritaires purifiés à partir du sous-extrait DCM de cônes femelles de houblon, sur les quatre <i>S. aureus</i> sélectionnées (*SARM) ; XN : xanthohumol, DMX : desméthylxanthohumol.....	99
<b>Tableau 21.</b> CMI (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) des chalcones purifiées vis-à-vis des 12 souches sélectionnées ; XN : xanthohumol, DMX : desméthylxanthohumol, OXA (oxacilline), S $\leq 2$ , R $> 2$ (Cavallo et al., 2006) ; ND : non déterminé .....	100
<b>Tableau 22.</b> Effets de l'association des produits du houblon les plus actifs entre eux ; les indices FIC permettent de déterminer le type d'effet de l'association comme suit : synergique si FIC $< 0,5$ , additif si $0,5 \leq \text{FIC} \leq 1$ , indifférent si $1 < \text{FIC} \leq 4$ , antagoniste si $> 4$ ; XN : xanthohumol, DMX : desméthylxanthohumol, LUP : lupulone.....	102
<b>Tableau 23.</b> Effets de l'association des produits du houblon avec des antibiotiques sélectionnés ; les indices FIC permettent de déterminer le type d'effet de l'association comme suit : synergique si FIC $< 0,5$ ; additif si $0,5 \leq \text{FIC} \leq 1$ ; indifférent si $1 < \text{FIC} \leq 4$ ; antagoniste si $> 4$ ; XN : xanthohumol, DMX : desméthylxanthohumol, LUP : lupulone, CIP : ciprofloxacine, GEN : gentamicine, OXA : oxacilline, RIF : rifampicine.....	103
<b>Tableau 24.</b> Temps de latence maximums observés sur une population de <i>S. aureus</i> T28.1 après 2 heures de traitement avec le xanthohumol (XN), le desméthylxanthohumol (DMX) ou la lupulone, en comparaison avec le témoin DMSO .....	107
<b>Tableau 25.</b> Résultats des tests de cytotoxicité montrant les $\text{Cl}_{50}$ (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) des extraits, sous-extraits et des produits purifiés actifs du houblon sur fibroblastes humains (WI-38), hépatocytes (Hep-G2) et ostéoblastes humains (MG-63) après 72h d'exposition pour WI-38 et 48h pour Hep-G2 et MG-63 ; la camptothécine est utilisée comme témoin positif ; $\text{Cl}_{50}$ = concentration inhibant 50% de la viabilité cellulaire, EC : écart-type standard.....	111

<b>Tableau 26.</b> CMI et $CI_{50}$ des extraits, sous-extraits et de l'huile essentielle de cônes femelles envers <i>Z. tritici</i> T02596.....	118
<b>Tableau 27.</b> CMI et $CI_{50}$ des produits purifiés des cônes femelles de houblon envers <i>Z. tritici</i> T02596.....	120
<b>Tableau 28.</b> Gradient de la méthode CLHP-UV optimisé pour l'extrait hydro-alcoolique de cônes femelles de houblon.....	127
<b>Tableau 29.</b> Méthode CLHP-UV adaptée au sous-extrait DCM de cônes femelles de houblon.....	127
<b>Tableau 30.</b> Méthode adaptée en CLUHP-UV pour l'analyse des extraits et sous-extraits du houblon...	128
<b>Tableau 31.</b> Gradients de CLHP préparative adaptés à la purification du DMX (A) et des acylphloroglucinols (B).....	134
<b>Tableau 32.</b> Gradient de la colonne de silice effectué pour la purification du DMX à partir de la fraction enrichie en DMX obtenue en sortie de CPC.....	135
<b>Tableau 33.</b> Tableau comparatif des protocoles permettant d'évaluer la cytotoxicité des extraits et produits actifs, DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium, MEM : Minimum Essential Media, SVF : Sérum de veau fœtal, Alamar blue (Gibco™, ThermoFisher Scientific™, USA), MTT : sel de tétrazolium (Sigma Aldrich®, USA).....	154

# Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Mécanismes permettant à une bactérie de devenir résistante à un antibiotique, traduit schéma du Dr. E. Gullberg sur <a href="http://www.reactgroup.org">www.reactgroup.org</a> .....	6
<b>Figure 2.</b> Pourcentages d'isolats cliniques de <i>S. aureus</i> résistants à la méticilline par pays, en Europe, d'après le rapport annuel du Centre Européen de Prévention et de Contrôle des Maladies (CEPCM, 2016)	7
<b>Figure 3.</b> Structure de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif, d'après <a href="http://www.pharmacomedicale.org">www.pharmacomedicale.org</a> .....	8
<b>Figure 4.</b> Induction du gène <i>mecA</i> permettant la résistance à la méticilline chez <i>S. aureus</i> par le système « <i>mecR1-mecI-mecR2</i> » conduisant à la synthèse de PBP2A (Arede et al., 2012).....	9
<b>Figure 5.</b> Évolution des quantités de produits phytosanitaires (fongicides, herbicides et insecticides) vendus en France métropolitaine entre 1996 et 2013, source : Union des industries pour la Protection des Plantes, UIPP traitements, 2016 .....	13
<b>Figure 6.</b> Évolution du marché mondial du biocontrôle (en milliards d'euros) depuis 2012 et perspectives pour 2020, à partir des données de <a href="http://www.invivo-group.com">www.invivo-group.com</a> .....	15
<b>Figure 7.</b> Feuille de blé infectée par <i>Z. tritici</i> montrant les pycnides, source : <a href="http://www.bretagne.synagri.com">www.bretagne.synagri.com</a> .....	18
<b>Figure 8.</b> Planche botanique montrant les différentes parties du houblon, <i>Humulus lupulus</i> L., par Franz Eugen Köhler, Köhler's Medizinal-Pflanzen-List of Koehler Images.....	22
<b>Figure 9.</b> Dessin d'un cône de houblon en coupe longitudinale montrant notamment les bractées imbriquées et les glandes à lupuline qu'elles contiennent, d'après <a href="http://www.oocho.com">www.oocho.com</a> .....	22
<b>Figure 10.</b> Surfaces de houblon cultivées (ha) dans l'hémisphère Nord par pays entre 1985 et 2015 (Stassi, 2017).....	23
<b>Figure 11.</b> Photos de houblon montrant les symptômes causés par l'agent pathogène du mildiou (A, <a href="http://www.osu.edu">www.osu.edu</a> ) et de la verticilliose (B, Maltonne, 2016) ; photos des insectes ravageurs montrant le puceron (C, <a href="http://www.influentialpoints.com">www.influentialpoints.com</a> ) et l'arpeuteuse (D, <a href="http://www.bugguide.net">www.bugguide.net</a> ) du houblon .....	24
<b>Figure 12.</b> Distribution des glandes à lupuline jaunâtres sur les phases inférieure (A) et supérieure (B) des bractées des cônes de houblon (Patzak et al., 2015).....	26
<b>Figure 13.</b> Structures chimiques des terpènes majoritaires de l'huile essentielle de houblon.....	27
<b>Figure 14.</b> Structures chimiques des flavonoïdes prénylés majoritaires des cônes femelles de houblon, les abréviations utilisées dans le texte correspondent au xanthohumol (XN), desméthylxanthohumol (DMX), 8-prénylnaringénine (8-PN), 6-prénylnaringénine (6-PN) et isoxanthohumol (IXN) ; l'étoile montre le carbone asymétrique.....	29
<b>Figure 15.</b> Structures chimiques des acylphloroglucinols majoritaires des cônes femelles de houblon ; l'étoile montre le carbone asymétrique.....	30
<b>Figure 16.</b> Biosynthèse des principales classes de composés présents dans le houblon ; PAL : Phénylalanine ammonia-lyase ; TAL : Tyrosine ammonia-lyase ; C4H : Cinnamate 4-hydroxylase ; 4CL : 4-Coumarate-CoA ligase ; STS : Stilbène synthase ; 3OGT : 3-O-Glycosyl-O-transférase ; CS : Chalcone synthase ; HIPT1 : <i>Humulus lupulus</i> Prényltransférase-1 ; OMT : O-Méthyltransférase ; CHI : Chalcone isomérase ; F3H : Flavanone 3-hydroxylase ; DFR : Dihydroflavonol 4-réductase ; FLS : Flavonol synthase ; FMO : Flavonoïde 3-monoxygénase ; CPR : Cytochrome P450 réductase ; F3'5'H : Flavonoïde 3'5'-hydroxylase ; LAR:	

Leucoanthocyanidine réductase ; ANS : Anthocyanidine synthase ; ANR : Anthocyanidine réductase ; VPS : Valérophénone synthase ; PT : Prényltransférase ; MO : Monooxygénase ; DMAPP : Diméthylallyl-pyrophosphate ; DMAPPI : Diméthylallyl-pyrophosphate isomérase ; IPP : Isopentényl-pyrophosphate ; IPPI : Isopentényl-pyrophosphate isoérase ; GPPS : Géranyl-pyrophosphate synthase ; GPP : Géranyl-pyrophosphate ; FPPS : Farnésyl-pyrophosphate synthase ; FPP : Farnésyl-pyrophosphate ; MoST : Monoterpène synthase ; SeST : Sesquiterpène synthase ; C3H : p-Coumarate 3-hydroxylase ; COMT : Acide caféique O-méthyltransférase ; CCR : Cinnamoyl-CoA réductase ; CAD : Cinnamoyl-CoA déhydrogénase

**Figure 17.** Schéma de fonctionnement d'un spectromètre de masse avec quelques exemples de sources d'ionisation et d'analyseurs d'après Menet (2011) .....34

**Figure 18.** Processus général de fabrication de la bière, schéma inspiré de [www.brasseurs-de-france.com](http://www.brasseurs-de-france.com) .....37

**Figure 19.** Transformation des acides  $\alpha$  et des acides  $\beta$  au cours du processus de fabrication de la bière ; les étoiles montrent les carbones asymétriques .....39

**Figure 20.** Vitro-plant de houblon de deux mois (A) et cals obtenus par micro-propagation (B) (Bocquet et al., 2018b).....51

**Figure 21.** Exemples de « chevelus racinaires » obtenus à partir de *Solanum procumbens* (Shilpha et al., 2015).....52

**Figure 22.** Procédé d'obtention des extraits bruts hydro-alcooliques et des sous-extraits DCM enrichis avec les rendements associés pour les cônes ; EB : extrait brut.....55

**Figure 23.** Chromatogrammes CLHP-UV de l'extrait hydro-alcoolique (A) et du sous-extrait DCM (B) de cônes femelles à  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ , avec les méthodes adaptées respectives présentées dans la partie 6.2.2. ; le choix des longueurs d'ondes s'est fait à 254 nm (rose), proche de l'un des maximums d'absorption des acylphloroglucinolins permettant également de détecter plusieurs autres composés, et 370 nm (noir) qui est l'un des maximums d'absorption des chalcones ; les composés d'intérêt pour la suite de l'étude sont mis en évidence, les chalcones (DMX : desméthylxanthohumol et XN : xanthohumol) et les acylphloroglucinolins (1.1. co-humulone, 1.2. humulone, 2.1. co-lupulone, 2.2. lupulone).....56

**Figure 24.** Spectres UV du xanthohumol (A), de l'humulone (B) et de la lupulone (C) .....57

**Figure 25.** Chromatogramme CLHP-UV de l'extrait hydro-alcoolique d'inflorescences mâles à  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ , avec la méthode adaptée aux extraits bruts présentées dans la partie 6.2.2., à 254 nm (rose) et 370 nm (noir).....58

**Figure 26.** Comparaison des chromatogrammes CLHP-UV des extraits hydro-alcooliques de différentes parties d'un pied femelle de houblon à  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ , avec la méthode adaptée aux extraits bruts présentée dans la partie 6.2.2., à 254 nm (rose) et 370 nm (noir) ; les encadrés des chromatogrammes B, C et D mettent en évidence le xanthohumol (XN) et les dérivés d'acylphloroglucinolins (1.1 co-humulone, 1.2 humulone, 2.1 co-lupulone, 2.2 lupulone) ; A. cônes femelles, B. feuilles, C. tiges, D. rhizomes.....60

**Figure 27.** Chromatogramme CLUHP-UV de l'extrait brut de cônes à  $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ , à 330 nm (A) et 370 nm (B), avec la méthode présentée dans la partie 6.2.3. ; 1.1 co-humulone, 1.2 humulone, 1.3 ad-humulone ; 2.1 co-lupulone, 2.2 lupulone, 2.3 ad-lupulone, DMX : desméthylxanthohumol, XN : xanthohumol .....61

**Figure 28.** Pourcentages des composés phénoliques prénylés majoritaires du houblon, dans les extraits bruts hydro-alcooliques de cônes, de feuilles, de tiges et de rhizomes ; XN : xanthohumol, DMX : desméthylxanthohumol.....63

**Figure 29.** Comparaison du pourcentage de chaque produit dans l'extrait brut et le sous-extrait DCM de cônes ; les conditions marquées par une étoile montrent une différence significative entre les teneurs dans l'extrait brut et le sous-extrait DCM, après des tests de t-student avec  $p = 0,05$  ; XN : xanthohumol, co-Hum : co-humulone, Hum : humulone, ad-Hum : ad-humulone, co-Lup : co-lupulone, Lup : lupulone, ad-Lup : ad-lupulone .....65



- Figure 30.** Profil chromatographique de la purification du XN par CPC avec le système Arizona P à 254 (rose) et 370 nm (noir) ; la zone A correspond à l'élution des acylphloroglucinols majoritairement, la zone B montre le XN ; l'extrusion (récupération de la phase stationnaire) n'ayant pas été enregistrée, elle ne figure pas sur ce chromatogramme. .... 69
- Figure 31.** CCM des fractions récupérées en CPC lors de la purification du xanthohumol (XN) avec le système Arizona P à 365 nm (A) et 254 nm (B) ; les zones encadrées montrent les fractions où le XN est élué, ainsi que le témoin ; la phase mobile utilisée est Toluène/AcOEt/Acide formique (73:18:9, v/v). .... 70
- Figure 32.** Chromatogramme du xanthohumol (XN) purifié par CPC avec la méthode CLHP-UV adaptée au sous-extrait DCM, les lectures sont faites à 370 nm (noir) et 254 nm (rose) ; la pureté est déterminée par CLHP-UV entre 250 et 800 nm. .... 70
- Figure 33.** Chromatogramme CLHP-UV de la fraction enrichie en desméthylxanthohumol (DMX) récupérée en extrusion, ou passage en mode descendant, avec le système Arizona P à 370 nm (noir) et 254 nm (rose) ; le degré de purification est estimé par CLHP-UV entre 250 et 800 nm. .... 71
- Figure 34.** Chromatogramme CLHP-UV du desméthylxanthohumol (DMX) purifié après CLHP préparative à 370 nm (noir) et 254 nm (rose) ; la pureté est estimée par CLHP-UV entre 250 et 800 nm. .... 72
- Figure 35.** Chromatogramme CLHP-UV de la fraction enrichie en acylphloroglucinols, récupérée après CPC avec le système Arizona P à 370 nm (noir) et 254 nm (rose) avec les composés purifiés (représentés de différentes couleurs) à 254 nm ; la pureté est estimée par CLHP-UV entre 250 et 800 nm. .... 73
- Figure 36.** Schéma de purification des composés phénoliques prénylés du houblon, avec les quantités approximatives obtenues pour chaque fraction et chaque produit purifié, à partir de 100 g de poudre de cônes secs. XN : xanthohumol, DMX : desméthylxanthohumol..... 74
- Figure 37.** Chromatogramme CLHP-UV de la fraction la plus pure en desméthylxanthohumol (DMX), obtenue par colonne ouverte de silice fine ; la pureté est estimée par CLHP-UV entre 250 et 800 nm..... 75
- Figure 38.** CCM des fractions récupérées en CPC lors de la purification du desméthylxanthohumol (DMX) avec le système Arizona K $\beta$  à 365 nm à partir de la fraction enrichie en DMX (FDMX) ; les zones encadrées montrent les fractions où le DMX est élué, ainsi que le témoin ; la phase mobile utilisée est Toluène/AcOEt/Acide formique (73:18:9, v/v). .... 76
- Figure 39.** Chromatogramme du desméthylxanthohumol (DMX) purifié par CPC à partir de la fraction enrichie en DMX, avec le système Arizona K $\beta$ . Les lectures sont faites à 370 nm (noir) et 254 nm (rose) ; la pureté est estimée par CLHP-UV entre 250 et 800 nm. .... 77
- Figure 40.** Chromatogramme du desméthylxanthohumol (DMX) purifié par CPC à partir du sous-extrait DCM, avec le système Arizona K $\beta$ . Les lectures sont faites à 370 nm (noir) et 254 nm (rose) ; la pureté est estimée par CLHP-UV entre 250 et 800 nm. .... 77
- Figure 41.** Exemples de trois systèmes de solvants testés pour la mise au point d'une méthode CPC permettant de purifier la lupulone à 365 (A) et 254 nm (B) ; les compositions des systèmes sont présentées dans le **tableau 12** (b : phase la plus dense, h : phase la moins dense) ; pour ces essais, la phase mobile en CCM a été adaptée de manière à ce que la lupulone montre un R<sub>f</sub> proche de 0,5 : Heptane/n-Propanol/Acide formique (90:15:0,5, v/v) ; le témoin lupulone (L) montre la position du composé dans la fraction enrichie en acylphloroglucinols (F) et dans les diverses phases ; les acides  $\alpha$  sont représentés par la tâche jaune présente en dessous de la lupulone. .... 78
- Figure 42.** Exemple d'un système de solvants pour la mise au point d'une méthode CPC permettant de purifier la lupulone avec régulation du pH à 9,5. La composition du système est présentée dans le **tableau 11** (b = phase la plus dense, h = phase la moins dense) ; pour ces essais, la phase mobile en CCM a été adaptée de manière à ce que la lupulone possède un R<sub>f</sub> de 0,5 : Heptane/n-Propanol/Acide formique (90:15:0,5, v/v) ; lecture à 365 (A) et 254 nm (B) ; le témoin lupulone (L) montre la position de ce composé dans la fraction enrichie en acylphloroglucinols (F) et dans les diverses phases ; les acides  $\alpha$  sont représentés par la tâche jaune présente en dessous de la lupulone. .... 79

<b>Figure 43.</b> Schéma récapitulatif des divers essais de méthodes de purification des composés phénoliques prénylés du houblon avec les taux de purification correspondant, évalués en CLHP-UV entre 250 et 800 nm, ceux écrits en gras représentent les méthodes les plus efficaces ; le processus initial est représenté par les flèches en trait plein ; les essais d'amélioration pour la purification du desméthylxanthohumol (DMX) et de la lupulone sont représentés par les flèches en pointillés ; XN : xanthohumol.....	82
<b>Figure 44.</b> Structures et numérotations des chalcones prénylés purifiées .....	84
<b>Figure 45.</b> Structures et numérotations des acides $\alpha$ purifiés .....	85
<b>Figure 46.</b> Structures et numérotations des acides $\beta$ purifiés .....	86
<b>Figure 47.</b> Chromatogrammes CLHP-UV des extraits bruts hydro-alcooliques de sous-produits obtenus auprès des brasseries Page 24 (A) et Saint Sylvestre (B) à 10 mg.mL <sup>-1</sup> à 254 nm (rose) et 370 nm (noir) ; XN : xanthohumol, 2.1 co-lupulone, 2.2 lupulone. ....	88
<b>Figure 48.</b> Comparaison des chromatogrammes des extraits hydro-alcooliques de vitro-plants de houblon à 10 mg.mL <sup>-1</sup> , avec la méthode adaptée aux extraits bruts, à 254 nm (rose) et 370 nm (noir) ; les encadrés mettent en évidence la zone d'éluion du xanthohumol (XN) ; A. feuilles, B. rhizomes, C. tiges .....	90
<b>Figure 49.</b> « Chevelus racinaires » de houblon obtenus à partir de jeune germination après 2 mois et demi de culture.....	91
<b>Figure 50.</b> Bioautographie d'immersion des extraits de cônes femelles de houblon avec <i>S. aureus</i> T28.1, mettant en évidence l'activité de l'extrait brut hydro-alcoolique ; le système de migration de la CCM est Toluène/AcOEt/Acide formique (73:18:9, v/v). ....	98
<b>Figure 51.</b> Isoblogramme montrant les interactions possibles entre deux produits en mélange (Wagner et Ulrich-Merzenich, 2009) .....	104
<b>Figure 52.</b> Exemples d'isoblogrammes montrant (A) un effet synergique entre le xanthohumol (XN) et l'oxacilline (OXA) correspondant à un indice FIC de 0,28 et (B) un effet antagoniste entre la lupulone (LUP) et la gentamycine (GEN) pour un indice FIC de 9 ; la droite en pointillés montre le cas où la relation serait indifférente. ....	104
<b>Figure 53.</b> Courbes de croissance du xanthohumol (A), du desméthylxanthohumol (B) et de la lupulone (C) sur <i>S. aureus</i> T28.1 ; le témoin utilisé ici est le témoin DMSO (diméthylsulfoxyde). ....	105
<b>Figure 54.</b> Effet inhibiteur de production de biofilm sur surface inerte du xanthohumol (A), du desméthylxanthohumol (B) et de la lupulone (C) sur <i>S. aureus</i> T28.1 ; les conditions marquées par une étoile montrent une différence significative par rapport au témoin avec un risque $\alpha$ de 5% après les tests de Kruskal-Wallis et de Dunn.....	108
<b>Figure 55.</b> Effet inhibiteur de la formation du biofilm de <i>S. aureus</i> T28.1 sur disques de substituts osseux du xanthohumol (A), du desméthylxanthohumol (B) et de la lupulone (C) ; les conditions marquées avec une étoile montrent une différence significative par rapport au témoin avec un risque $\alpha$ de 5% après les tests de Kruskal-Wallis et de Dunn (A) ou ANOVA et test de Tukey (B, C) ; le seuil de détection de cette méthode est de 1 log UFC/mL. ....	109
<b>Figure 56.</b> Effet destructeur de biofilm sur surface inerte du xanthohumol (A), du desméthylxanthohumol (B) et de la lupulone (C) sur <i>S. aureus</i> T28.1 ; les conditions marquées par une étoile montrent une différence significative par rapport au témoin avec un risque $\alpha$ de 5% après ANOVA et le test de Tukey. ....	110
<b>Figure 57.</b> Courbes de viabilité cellulaire d'ostéoblastes (MG-63) montrant l'effet de différentes concentrations en xanthohumol (A), desméthylxanthohumol (B) et lupulone (C) ; les trois courbes représentent les trois réplicats biologiques. ....	113
<b>Figure 58.</b> Moyennes des diamètres de colonies (en mm) de <i>Z. tritici</i> T01193 en présence d'extraits des différentes parties de houblon à 1,25 mg.mL <sup>-1</sup> après 10 jours de culture à 21°C ; les conditions marquées par une étoile montrent une différence significative par rapport au témoin MeOH avec un risque $\alpha$ de 5% après les tests ANOVA et de Tukey ; HE : huile essentielle .....	118

<b>Figure 59.</b> Échiquier montrant l'effet positif de l'association huile essentielle – bixafène (A) sur le diamètre des colonies de <i>Z. tritici</i> T02596, en comparaison avec les produits seuls (B) ; la zone à gauche du trait noir montre les boîtes sur lesquelles il y a présence du champignon (ce qui n'est pas toujours évident sur les photos) ; la zone à droite du trait noir montre les associations actives donc l'inhibition de la croissance fongique ; les deux photos avec les indices FIC constituent les combinaisons de concentrations les plus efficaces ; si l'indice FIC < 0,5 alors l'association est synergique, elle est additive si $0,5 \leq FIC \leq 1$ . ....	119
<b>Figure 60.</b> Effet de plusieurs concentrations en desméthylxanthohumol (A) et en co-humulone (A) sur une population de <i>Z. tritici</i> T02596.....	121
<b>Figure 61.</b> Appareil de Clevenger (A) utilisé pour distiller l'huile essentielle de cônes de houblon (B).....	125
<b>Figure 62.</b> Schématisation d'un rotor de CPC montrant les cellules reliées les unes aux autres et contenant les deux phases du système (Péchat, 2011) .....	131
<b>Figure 63.</b> Protocole permettant la sélection du système de solvant optimal en CPC .....	132
<b>Figure 64.</b> Organisation de la chaîne CPC du laboratoire de pharmacognosie (EA 7394, ICV) .....	133
<b>Figure 65.</b> Synthèse du processus de purification des composés phénoliques prénylés du houblon, rassemblant les diverses techniques et paramètres utilisés. Pour avoir un ordre d'idée des rendements à chaque étape, consulter la <b>figure 36</b> . Les pourcentages de pureté obtenus sont présentés dans la <b>figure 43</b> . XN : xanthohumol, DMX : desméthylxanthohumol .....	137
<b>Figure 66.</b> Préparation d'un inoculum bactérien à $10^5$ UFC/mL ; RC : Ringer cystéiné.....	141
<b>Figure 67.</b> (A) Inoculateur à têtes multiples ou appareil de Steers, utilisé pour les criblages antibactériens (B) Boîte de Pétriensemencée avec 36 souches après 24 heures de culture à 37°C .....	141
<b>Figure 68.</b> Bioautographie d'immersion avant incubation ; les zones entourées en rouge montrent les témoins positifs, ou extraits actifs déposés sur la CCM après migration. ....	142
<b>Figure 69.</b> Protocole du test en microplaque permettant d'évaluer l'activité antibactérienne des produits purifiés des cônes femelles de houblon .....	144
<b>Figure 70.</b> Grande boîte de Pétri montrant les E-tests et une culture bactérienne.....	145
<b>Figure 71.</b> Schéma de la plaque pour le test de l'échiquier ou checkerboard ; les témoins incluent le témoin de culture (vert), le témoin DMSO (violet) et le témoin de stérilité (bleu).....	146
<b>Figure 72.</b> Protocole de la courbe de croissance, six dénombrements sont effectués au cours des 24 heures d'incubation.....	148
<b>Figure 73.</b> Protocole de l'effet post-antibiotique montrant le prétraitement et l'inactivation du produit .....	149
<b>Figure 74.</b> Détermination graphique des paramètres C et T pour le calcul de l'effet post-antibiotique ..	149
<b>Figure 75.</b> Schéma de la plaque des tests anti-biofilm sur surface inerte .....	150
<b>Figure 76.</b> Schéma de la plaque des tests anti-biofilm sur disques de substitut osseux ; les témoins incluent le témoin de culture (vert), le témoin DMSO (violet) et le témoin de stérilité (bleu). ....	151
<b>Figure 77.</b> Protocole de dénombrement des bactéries en suspension (A) et ayant adhéré aux disques (B) après le test anti-biofilm sur disques de substituts osseux.....	152
<b>Figure 78.</b> Schéma de plaque pour le test des produits purifiés contre <i>Z. tritici</i> . Les témoins de culture sont symbolisés par des pastilles vertes ; les témoins DMSO sont symbolisés par des pastilles violettes.....	156

# Liste des abréviations

3OGT	3- <i>O</i> -Glycosyl- <i>O</i> -transférase
4CL	4-Coumarate-CoA ligase
AcOET	Acétate d'éthyle
ACN	Acétonitrile
ANR	Anthocyanidine réductase
ANS	Anthocyanidine synthase
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
ANSMS	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique
BAP	Benzyl adénine
BH	Brain Heart
C3H	<i>p</i> -Coumarate 3-hydroxylase
C4H	Cinnamate 4-hydroxylase
CAD	Cinnamoyl-CoA déhydrogénase
CCC	Chromatographie à contre-courant
CCM	Chromatographie sur couche mince
CCR	Cinnamoyl-CoA réductase
CDCl <sub>3</sub>	Chloroforme deutéré
CEPCM	Centre Européen de Prévention et de Contrôle des Maladies
CHI	Chalcone isomérase
CI <sub>50</sub>	Concentration inhibant 50% de la viabilité
CL	Chromatographie en phase liquide
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CLUHP	Chromatographie liquide ultra-haute performance
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CMR	Cancérogène, mutagène et reprotoxique
COMT	Acide Caféique <i>O</i> -méthyltransférase
COX	Cyclooxygénase
CPC	Chromatographie de partage centrifuge
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CPR	Cytochrome P450 réductase
CS	Chalcone synthase
CUMA	Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses
CV	Coefficient de variation
DCM	Dichlorométhane
DFR	Dihydroflavonol 4-réductase
DMAPP	Diméthylallyl-pyrophosphate
DMAPPI	Diméthylallyl-pyrophosphate isomérase
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMX	Desméthylxanthohumol
DO	Densité optique
EtOH	Éthanol

ESI	Ionisation par électrospray
F3H	Flavanone 3-hydroxylase
F3'5'H	Flavonoïde 3'5'-hydroxylase
FIC	Concentration inhibitrice fractionnaire (ou Fractional inhibitory concentration)
FLS	Flavonol synthase
FMO	Flavonoïde 3-monooxgénase
FPP	Farnésyl-pyrophosphate
FPPS	Farnésyl-pyrophosphate synthase
GPP	Géranyl-pyrophosphate
GPPS	Géranyl-pyrophosphate synthase
HIPT1	<i>Humulus lupulus</i> Prényltansférase-1
HMPC	Herbal Medicinal Products Committed
HR	Haute resolution
INSP	Agence Nationale de Santé Publique
IPP	Isopentényl-pyrophosphate
IPPI	Isopentényl-pyrophosphate isomérase
Kd	Coefficient de partage
LAR	Leucoanthocyanidine réductase
LARMN	Laboratoire d'Application de Résonance Magnétique Nucléaire
MeJa	Jasmonate de méthyle
MeOD	Méthanol deutéré
MeOH	Méthanol
MH	Mueller Hinton
MHA	Mueller Hinton Agar
MO	Monooxgénase
MoST	Monoterpène synthase
MS	Murashige et Skoog
MTBe	Éther de méthyl- <i>tert</i> -tiobutyle
MTT	Sel de tétrazolium
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OMT	<i>O</i> -Méthyltransférase
PAL	Phénylalanine ammonia-lyase
PLP	Protéines liant les pénicillines
PT	Prényltransférase
Q	Quadripôle
RC	Ringer cystéiné
RMN	Résonance magnétique nucléaire
Rpm	Rotations par minute
SARM	<i>S. aureus</i> résistant à la méticilline
SASM	<i>S. aureus</i> sensible à la méticilline
SeST	Sesquiterpène synthase
SM	Spectrométrie de masse
STS	Stilbène synthase
TAL	Tyrosine ammonia-lyase
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TOF	Temps de vol
TRAP	Orbitrap
UFC	Unité formant colonie
VPS	Valérophénone synthase
XN	Xanthohumol

# Introduction générale

L'utilisation répétée d'antimicrobiens, en préventif et thérapeutique humaine et animale, ainsi qu'en agriculture, a entraîné l'apparition de résistances qui compliquent le traitement des infections. En constante augmentation, ce phénomène est devenu un enjeu majeur pour les autorités sanitaires. La recherche de nouveaux antimicrobiens est donc un challenge de taille dans plusieurs domaines. En antibiothérapie, la prévalence de souches multi-résistantes rend de plus en plus d'antibiotiques inefficaces. Une des menaces les plus sérieuses concerne les souches de *Staphylococcus aureus*, qui causent diverses infections systémiques, cutanées et osseuses. Les complications associées peuvent être légères ou mettre en jeu le pronostic vital. Les *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) font partie des pathogènes les plus inquiétants. Ils ont été classés de « priorité élevée » par l'Organisation Mondiale de la Santé pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques (OMS, 2017). Malgré l'avancée des connaissances sur les mécanismes de résistance, il est difficile de trouver de nouveaux antibactériens efficaces (Peacock et Paterson, 2015). Il en est de même de l'utilisation des produits phytosanitaires en agriculture. En plus de l'apparition de résistances chez certains pathogènes, les traitements conventionnels sont controversés, notamment pour leur impact sur l'environnement (Hernández et al., 2017). Dans ce contexte, les produits d'origine naturelle constituent une source importante de composés d'origines biosynthétiques et de structures chimiques variées. Ce potentiel gagne à être reconnu, les scientifiques se tournent désormais vers les plantes pour trouver des composés actifs qui agiraient différemment des antimicrobiens connus. De nombreux produits d'origine naturelle ont déjà montré des propriétés antimicrobiennes intéressantes (Gibbons, 2008).

Le houblon, *Humulus lupulus* L., est une plante grimpante de la famille des Cannabaceae, principalement cultivée pour son utilisation dans l'industrie brassicole. Les cônes femelles renferment des composés phénoliques particuliers qui apportent l'amertume et un pouvoir antiseptique à la bière (Stevens et Page, 2004). En parallèle de cette utilisation, les scientifiques s'intéressent à son potentiel thérapeutique. Il est utilisé en phytothérapie depuis le X<sup>ème</sup> siècle pour aider à lutter contre l'anxiété, favorisant ainsi le sommeil (Faivre et al., 2007). Il est aujourd'hui également préconisé pour lutter contre l'inappétence, les maux d'estomac et intestinaux (Zanoli et Zavatti, 2008). De nombreuses autres propriétés sont décrites dans la littérature, notamment

œstrogéniques (Chadwick et al., 2006), antiprolifératives (Allsopp et al., 2013), antimicrobiennes (Bocquet et al., 2018a). Le houblon renferme donc des composés d'intérêt thérapeutique pour les industries cosmétiques, pharmaceutiques et agro-alimentaires.

Au cours de ce projet, l'activité antimicrobienne de différentes parties de houblon (cônes femelles, feuilles, tiges et rhizomes) a été évaluée vis-à-vis de divers pathogènes humains, ainsi que de phytopathogènes. Pour chaque activité mise en évidence, un fractionnement bioguidé a permis de purifier les produits responsables de l'activité par chromatographie de partage centrifuge (CPC) et par chromatographie liquide haute performance (CLHP), avec une attention particulière pour les composés phénoliques prénylés. En santé humaine, l'étude a notamment porté sur le potentiel antibactérien du houblon envers un isolat clinique de SARM issu d'une ostéite chez un patient diabétique. Des analyses approfondies sur plusieurs paramètres clés comme la bactéricidie et l'activité anti-biofilm, ont été effectuées avec les produits les plus efficaces. Deux chalcones : le xanthohumol (XN) et le desméthylxanthohumol (DMX) ; ainsi qu'un dérivé d'acylphloroglucinol (la lupulone), purifiés à partir des cônes femelles, ont révélé un important potentiel de lutte contre cet isolat clinique. En santé du végétal, le DMX, la *co*-humulone et l'huile essentielle de cônes ont montré une activité antifongique contre *Zymoseptoria tritici*.

# **Première partie**

## **Synthèse bibliographique**



# Chapitre 1.

## Contexte de l'étude

---

### **1.1. La résistance aux antibiotiques dans le traitement des infections bactériennes**

#### *1.1.1. La résistance aux antibiotiques : un problème de santé publique*

Les premières bactéries résistantes aux antibiotiques sont apparues en 1940, soit quelques années après la découverte de la pénicilline (1928). Depuis, d'autres classes et de nouvelles générations d'antibiotiques ont été mises sur le marché. Cependant, chaque nouvelle classe a vu apparaître des mécanismes de résistance associés. Ce phénomène est lié à l'utilisation massive et parfois non contrôlée d'antibiotiques en thérapeutique humaine et animale, à la fois en préventif et en curatif. Leur utilisation comme stimulateurs de croissance, à des doses sub-inhibitrices, dans les élevages a également participé au développement de résistances (Nemati et al., 2008). La propagation des souches résistantes est aujourd'hui favorisée par les changements démographiques, le surpeuplement et les voyages. Ces facteurs rendent complexe le contrôle de la résistance microbienne. Une surveillance et une prévention accrue a donc été mise en place dans plusieurs pays (Laxminarayan et al., 2016).

L'épidémiologie de la résistance aux antibiotiques est un phénomène complexe car elle est retrouvée à plusieurs échelles. Elle est d'abord locale, au sein d'un hôpital par exemple, ou toute autre structure regroupant des personnes vulnérables. L'utilisation d'antimicrobiens est par conséquent plus lourde dans ces zones, où la prévalence de souches résistantes est considérable (McGowan, 1983). Au niveau national, tous les pays ne sont pas égaux dans la prévention et dans la prise en charge des maladies infectieuses. Les résistances sont liées directement à la quantité d'antibiotiques consommée (Meyer et al., 2013). La France se situe parmi les plus gros consommateurs d'antibiotiques en Europe. Depuis plusieurs années, des actions de lutte sont néanmoins entreprises. Trois agences nationales sont chargées de communiquer à ce sujet : l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES), l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM) et l'Agence Nationale de Santé Publique (INSP). Deux plans Ecoantibio (2012-2017 et 2017-2021) ont été mis en place en France, visant à réduire l'utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, 2016 et 2018). Enfin, l'épidémiologie de l'antibiorésistance est internationale, dans la mesure où l'utilisation des antibiotiques est mondiale et les souches résistantes se propagent d'un pays à l'autre. Dans les pays en développement, l'émergence des

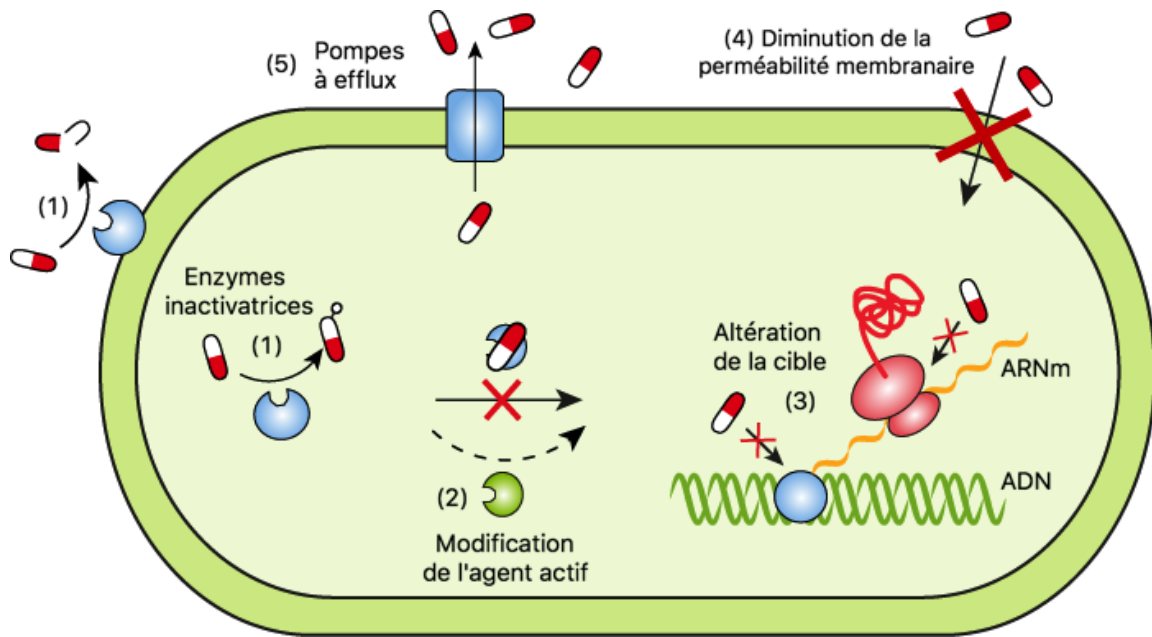
médicaments contrefaits est une problématique supplémentaire qui, en plus d'augmenter la mortalité associée aux infections, favorise la montée en puissance des bactéries résistantes. Les antimicrobiens sont les médicaments les plus contrefaits et les classes d'antibiotiques les plus touchées par ce phénomène sont les  $\beta$ -lactames (Kelesidis et Falagas, 2015).

On estime que 700 000 décès dans le monde chaque année sont liés à la résistance acquise des bactéries aux antibiotiques. Les chefs de gouvernement et les responsables de la santé de nombreux pays se sont d'ailleurs réunis en septembre 2017, afin de définir les grands axes de lutte contre les bactéries résistantes. Le représentant du directeur de l'OMS a déclaré : « Nous sommes en train de perdre notre capacité à soigner les infections » (OMS, 2017). Les autorités sanitaires estiment que sans action efficace, les maladies infectieuses pourraient devenir une des premières causes de mortalité d'ici 2050, contre 2% aujourd'hui (ANSES, ANSMS, et INSP, 2016). Ce phénomène est donc devenu une menace sociétale.

### 1.1.2. Généralités sur les mécanismes de résistance aux antibiotiques

Toutes les espèces bactériennes sont capables d'acquérir des résistances aux antimicrobiens. Ce phénomène est lié à la pression de sélection induite par ces derniers. Certaines bactéries sont naturellement insensibles à une ou plusieurs familles d'antimicrobiens, on parle de résistance naturelle ou innée. Le phénomène le plus préoccupant est celui de la résistance acquise : c'est l'apparition d'une résistance chez une bactérie à un antibiotique auquel elle était sensible auparavant. La bactérie devient alors capable de se protéger contre le mode d'action de l'antibiotique, ou de le détourner. Ce principe est comparable au Darwinisme : la population bactérienne s'adapte à son nouvel environnement pour survivre.

La **figure 1** montre les mécanismes pouvant être mis en place pour contourner l'effet d'un antibiotique. Les bactéries peuvent (1) induire la destruction de l'agent antibactérien par l'intermédiaire d'enzymes inactivatrices nouvellement synthétisées ; empêcher l'antibiotique d'atteindre sa cible soit (2) en le modifiant chimiquement ou (3) en modifiant sa cible, rendant ainsi l'interaction impossible. (4) Des modifications de la perméabilité membranaire peuvent rendre difficile la pénétration de l'antibiotique dans la cellule. Enfin, (5) des pompes à efflux présentes au niveau de la paroi ou de la membrane plasmique bactérienne peuvent exporter le produit actif hors de la cellule (Tenover, 2006).



**Figure 1.** Mécanismes permettant à une bactérie de devenir résistante à un antibiotique, traduit du schéma du Dr. E. Gullberg sur [www.reactgroup.org](http://www.reactgroup.org)

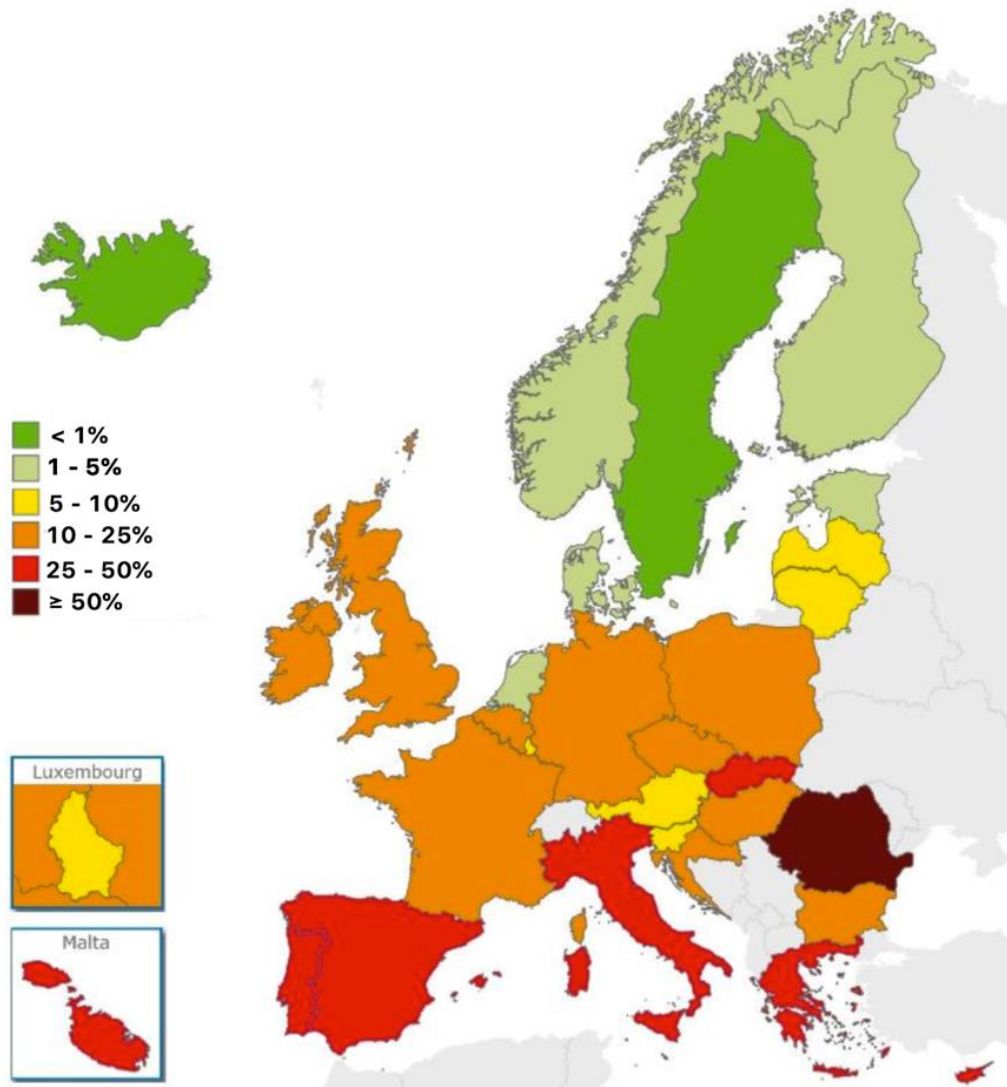
Ces mécanismes peuvent être acquis de différentes manières : modification du patrimoine génétique de la bactérie par mutation d'un ou de plusieurs gènes, ou par l'acquisition d'un nouveau matériel génétique contenant un gène de résistance. Dans ce dernier cas, la transmission de la résistance peut se faire :

- Par transformation : certaines bactéries sont capables « d'absorber » l'ADN libre dans l'environnement et de l'incorporer à leur patrimoine génétique,
- Par transduction : l'ADN d'une bactérie donneuse peut être empaqueté dans une particule de virus appelée bactériophage, qui transfère ensuite le gène de résistance à une bactérie receveuse,
- Par conjugaison : le vecteur est un plasmide pouvant être transféré d'une bactérie à l'autre. Ce mécanisme de transfert de gènes est le plus courant et le plus préoccupant dans l'acquisition des résistances microbiennes (Holmes et al., 2016).

### 1.1.3. Cas des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM)

*Staphylococcus aureus* est une bactérie très répandue. Certaines souches, à faible potentiel pathogène, sont retrouvées dans le microbiote humain (peau, intestin, fosses nasales). Les souches à fort potentiel pathogène sont responsables de nombreuses infections, notamment du sang, de la peau et autres tissus mous, ainsi que de l'os. Certaines de ces infections peuvent être sévères. Comme toutes les bactéries, *S. aureus* peut développer des résistances aux antibiotiques. Les souches les plus inquiétantes sont celles qui sont résistants à la méticilline (SARM). Le premier SARM a été mis en évidence dans les années 1960 (Jevons, 1961), depuis, la prévalence ne cesse

d'augmenter. Étant associées aux maladies nosocomiales, elles étaient initialement concentrées dans les hôpitaux. Aujourd'hui, elles émergent également de manière non contrôlée dans les collectivités et les exploitations animales (Nemati et al., 2008). On estime que 150 000 patients sont, chaque année, touchés par des SARM en Europe, entraînant des surcoûts de 380 millions d'euros pour les systèmes de santé (Köck et al., 2010). La **figure 2** donne un exemple concret de la répartition des SARM en Europe. Les pays du Nord comme la Suède et la Norvège recensent moins de 5% d'isolats cliniques de SARM. Les pays d'Europe centrale comme la France et l'Allemagne comptent quant à eux 10 à 25% d'isolats résistants à la méticilline, soit un quart des *S. aureus* isolés. Les pays localisés au sud de l'Europe, comme le Portugal, l'Espagne, l'Italie et la Grèce, peuvent dénombrer entre 25 et 50% d'isolats résistants, contre plus d'une souche sur deux en Roumanie. La situation est donc très inquiétante dans certains pays.



**Figure 2.** Pourcentages d'isolats cliniques de *S. aureus* résistants à la méticilline par pays, en Europe, d'après le rapport annuel du Centre Européen de Prévention et de Contrôle des Maladies (CEPCM, 2016)

## La méticilline, un antibiotique de la famille des $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines, dont font partie la méticilline et l'oxacilline, sont une vaste famille d'antibiotiques possédant comme structure commune le cycle  $\beta$ -lactame. Elles ont pour cible des protéines insérées sur la face externe de la membrane plasmique : « protéines liant les pénicillines (PLP) ». Le peptidoglycane est le constituant majeur de la paroi bactérienne. Les enzymes impliquées dans sa synthèse vont reconnaître le cycle  $\beta$ -lactame qui entrera en compétition avec leur substrat naturel : les PLP. Il en résulte une inhibition de la synthèse du peptidoglycane et par conséquent de la paroi bactérienne, entraînant ainsi la mort cellulaire (Giesbrecht et al., 1998). Parmi les  $\beta$ -lactamines se trouvent notamment les pénicillines et les céphalosporines. Elles possèdent un mécanisme d'action identique mais un spectre d'activité différent. En effet, les PLP varient en fonction des bactéries, et l'affinité des antibiotiques pour ces dernières diffère en fonction du type de PLP. De par la structure de leur paroi, certaines bactéries à Gram négatif sont naturellement insensibles à ces antibiotiques (**Fig. 3**). La présence de la membrane externe hydrophobe empêche la diffusion des molécules hydrophiles telles que les  $\beta$ -lactamines, le transport de ces dernières se fait alors uniquement par le biais des porines. La membrane externe est donc une barrière pouvant rendre difficile l'accès de certains antibiotiques aux PLP, en comparaison avec les bactéries à Gram positif.

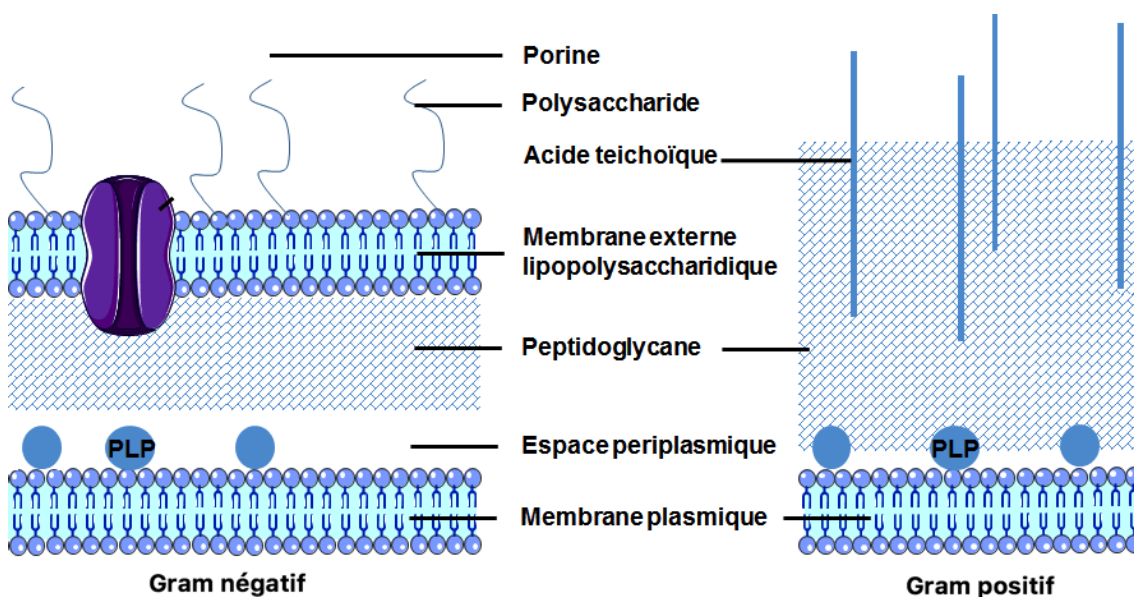


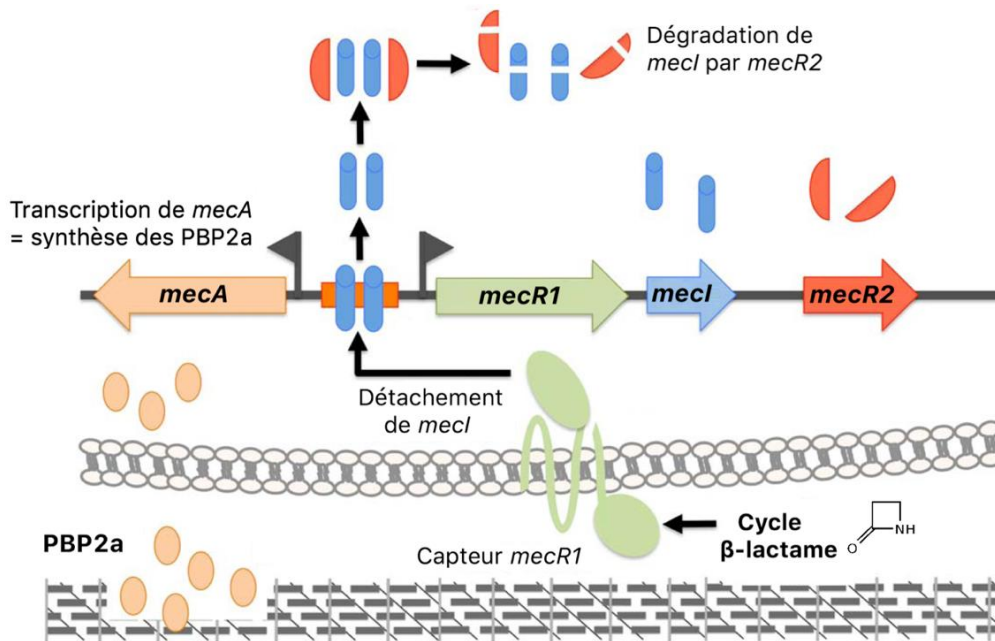
Figure 3. Structure de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif, d'après [www.pharmacomedicale.org](http://www.pharmacomedicale.org)

### *S. aureus*, les mécanismes de résistance à la méticilline

Contrairement aux souches résistantes à la pénicilline, la résistance à la méticilline n'est pas nécessairement corrélée à la production de  $\beta$ -lactamases (Dyke et al., 1966 ; Peacock et Paterson, 2015). La résistance peut aussi être liée à l'altération de l'affinité antibiotique-substrat par la modification ou la synthèse d'une nouvelle cible (Peacock

et Paterson, 2015). Dans la plupart des cas, c'est la cassette mobile *SCCmec* pour « Staphylococcal Chromosome Cassette for methicillin resistance » (Lim et Strynadka, 2002 ; Ito et al., 2012) qui est responsable de la résistance à la méticilline chez *S. aureus*. Son fonctionnement est décrit dans la **figure 4**. En présence d'antibiotique dans l'environnement, le cycle  $\beta$ -lactame est reconnu par un capteur *mecR1* qui va permettre le détachement des protéines inhibitrices *mecl*, du promoteur du gène *mecA* et ainsi permettre son expression. L'expression de *mecA* est donc contrôlée pour n'être activée qu'en présence de l'antibiotique. Le gène *mecA* code pour une PLP un peu différente : PBP2A, découverte par Hartman et Tomasz (1984). Cette dernière s'ancre à la membrane plasmique de la bactérie et joue le rôle de cible pour les  $\beta$ -lactamines, à la différence qu'elle présente une affinité faible pour ces molécules en comparaison avec les PLP classiques. *MecR2* induit quant à lui la dégradation des protéines *mecl* libérées (Arede et al., 2012).

En considérant une population bactérienne de *S. aureus*, plusieurs niveaux de résistance existent. La sensibilité à l'antibiotique peut être plus ou moins diminuée, induisant des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de quelques  $\mu\text{g/mL}$  supplémentaires par rapport aux souches sensibles, à des centaines de  $\mu\text{g/mL}$ . Ces différents niveaux de résistance sont régulés par de nombreux gènes annexes à *SCCmec*, pouvant être exprimés/mutés ou non. Chez *S. aureus*, c'est par exemple le cas des facteurs essentiels à la résistance à la méticilline (*fem*) (Berger-Bächli et al., 1989) et des gènes auxiliaires (*aux*) (de Lencastre et Tomasz, 1994). Même si aujourd'hui ces mécanismes sont connus, il est difficile de trouver de nouvelles molécules efficaces.



**Figure 4.** Induction du gène *mecA* permettant la résistance à la méticilline chez *S. aureus* par le système « *mecR1-mecI-mecR2* » conduisant à la synthèse de PBP2A (Arede et al., 2012)

Certains isolats cliniques de *S. aureus* sont multi-résistants. En effet, par le biais de divers mécanismes, ils peuvent développer des résistances à d'autres antibiotiques. Le gène *norA*, par exemple, code pour une protéine ayant une affinité particulière avec les fluoroquinolones. Elle a un rôle de pompe à efflux. Ainsi, l'antibiotique est rejeté hors de la cellule avant d'avoir pu atteindre sa cible (Kaatz et Seo, 1995). Ce mécanisme chez *S. aureus* a également été décrit pour la résistance aux macrolides via la protéine *MrsaA*, ainsi qu'aux tétracyclines par le biais de la protéine *TetK* codée par les gènes du même nom (Ross et al., 1990 ; Guay et al., 1993 ; Gibbons et Udo, 2000).

### **Perspectives de lutte**

Pour traiter les infections à *S. aureus*, les antibiotiques de première intention sont variables en fonction du site d'infection, lié à la capacité d'absorption des molécules, ainsi qu'aux mécanismes de résistance développés par les souches présentes (Dorosz, 2018). Suite à la découverte des SARM, l'une des premières solutions était de remplacer la méticilline par un autre antibiotique. Les glycopeptides, également inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne, sont devenus le traitement de référence en milieu hospitalier pour les infections à cocci Gram positif résistants. Le premier choix pour les infections à SARM a été la vancomycine. La teicoplanine, dont le spectre d'activité rejoint celui de la vancomycine, a également été utilisée. Concernant les pénicillines, des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, tels la cloxacilline (groupe M) ou encore l'association amoxicilline/acide clavulanique, sont également utilisés pour les infections cutanées et sous-cutanées impliquant des souches de *S. aureus*. Ces dernières années, leur intérêt a diminué à cause du développement de résistances. Les SARM ont également développé des résistances aux uréidopénicillines, utilisées pour traiter les infections nécrosantes. Les souches résistantes à la vancomycine sont également répandues. De ce fait, ces molécules sont généralement associées à d'autres antibiotiques.

- Par exemple avec des aminosides, inhibiteurs de la traduction bactérienne par fixation à la sous-unité 30S des ribosomes, comme la gentamicine, mais leur activité envers les SARM est inconstante ;
- Ou avec des lincosamides comme la clindamycine, qui agit sur la synthèse protéique en se liant à la sous-unité 50S des ribosomes. Cette dernière présente l'avantage d'avoir une bonne diffusion tissulaire, y compris osseuse.

Le traitement des infections ostéo-articulaires dépend de l'examen bactériologique, il implique généralement des fluoroquinolones, inhibiteurs de l'ADN-gyrase empêchant la réplication du chromosome circulaire bactérien. Pour augmenter leur efficacité, particulièrement vis-à-vis des souches résistantes, elles sont utilisées en association avec la rifampicine, qui inhibe également la transcription, par un mécanisme différent, elle forme un complexe stable avec l'ARN polymérase (Chambers, 1997).

Dans le cas où les antibiotiques précédemment cités s'avèrent inefficaces, ou si le patient déclare des contre-indications à leur utilisation, des antibiotiques de seconde intention sont prescrits. Pour les infections à SARM, on retrouve :

- Les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, pouvant agir comme agents modifiant la résistance car certains sont inhibiteurs de PBP2a, c'est le cas de la cefotaxime qui possède une grande affinité pour les PBP2a et qui est active à faibles doses (Kosowska-Shick et al., 2010 ; Tattevin, 2011).
- La fosfomycine, un antibiotique phosphonique inhibiteur de la synthèse de la paroi, est efficace contre environ 80% des SARM. Son principal inconvénient est sa faible absorption digestive qui impose une administration intraveineuse (Dorosz, 2018).
- Les synergistines, antibiotiques de la famille des streptogramines, sont composées de 2 molécules synergiques inhibitrices de la traduction par fixation à la sous-unité 50S du ribosome bactérien. L'absorption digestive est moyenne mais la diffusion tissulaire est excellente dans la plupart des tissus, y compris l'os. Le principal avantage est que 95% des SARM décrits à ce jour y sont sensibles (Dorosz, 2018).
- Certains macrolides, inhibant également la traduction bactérienne, peuvent être utilisés en seconde intention pour les infections non nécrosantes. Leur activité est cependant inconstante envers les SARM.
- Le linézolide, premier représentant de la classe des oxazolidinones, est également un inhibiteur de la synthèse protéique. Son mécanisme d'action est unique, il se fixe sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien à un stade très précoce, avant la formation du complexe d'initiation. Il a la particularité d'être très bien absorbé par l'os (Bourgeois-Nicolaos et al., 2006 ; Tattevin, 2016).
- La tigécycline, une glycylicycline (tétracycline de synthèse), bloque la synthèse protéique par fixation à la sous-unité 30S des ribosomes. Il possède un spectre d'activité très large incluant les souches à Gram positif et à Gram négatif, même résistantes à plusieurs antibiotiques (Tattevin, 2016). Ses nombreux effets secondaires ont amené à restreindre son utilisation aux situations de dernier recours (Haute Autorité de Santé, 2011).

Dans le but de contourner la résistance des souches à ces antibiotiques, ou d'augmenter leur efficacité à des doses faibles, la plupart d'entre eux ne sont pas utilisés en monothérapie (Chambers, 1997 ; Gibert et Trouillet, 2001). La recherche d'association de produits, naturels ou non, serait donc une solution efficace à moyen terme, jusqu'à ce que de nouvelles classes d'antibiotiques soient découvertes (Abreu et al., 2012).

Un autre paramètre à ne pas négliger dans le traitement des infections à souches résistantes est le développement de biofilms. Ce sont des communautés de microorganismes adhérents à une surface solide grâce à une matrice composée



notamment de polysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques. Ils constituent une véritable coque de protection, empêchant les antimicrobiens d'agir (Stoodley et al., 2002 ; Tremblay et al., 2014). Étant donné les faibles concentrations en certains nutriments et en oxygène au sein de ces communautés, les bactéries peuvent s'y retrouver en dormance, leur métabolisme est alors ralenti. Les antibiotiques agissant principalement sur les fonctions métaboliques, n'ont alors plus d'effet. Ce phénomène constitue probablement la plus grande part de résistance associée aux biofilms (Lewis, 2008). La recherche de nouveaux antimicrobiens possédant en plus, un potentiel anti-biofilm serait un atout supplémentaire dans le traitement des infections.

La résistance bactérienne étant multifactorielle, plusieurs axes de lutte sont possibles. La stratégie de traitement des infections à souches résistantes, comme les SARM, doit prendre en compte chacun des points évoqués précédemment : utilisation raisonnée d'antibiotiques, associations d'antimicrobiens et activité anti-biofilm.

## **1.2. Une agriculture intensive controversée à cause des produits phytosanitaires utilisés**

### *1.2.1. Vers une réduction des pesticides conventionnels*

L'agriculture conventionnelle est aujourd'hui très controversée. Les pesticides de synthèse intensivement utilisés pour protéger les cultures sont accusés de détruire la biodiversité des sols, polluer les cours d'eau, les nappes phréatiques, et d'avoir des effets néfastes sur la santé humaine. Cette prise de conscience, associée à l'apparition de résistances aux produits utilisés, ainsi qu'à leur toxicité éventuelle, a entraîné un regain d'intérêt pour une agriculture différente et plus respectueuse de la santé et de l'environnement (Dayan et al., 2009).

L'Union Européenne s'est engagée pour une réduction des pesticides conventionnels, en parallèle du développement de l'agriculture biologique. À la suite du Grenelle de l'environnement en 2008, le plan Ecophyto 2018 a été lancé. Il s'inscrit dans la directive européenne 2009/128 d'utilisation des produits phytosanitaires compatibles avec le développement durable. Il avait pour objectif de réduire de moitié l'utilisation des produits phytosanitaires en 10 ans, sans impacter sur la rentabilité des exploitations. Force est de constater que ce projet était trop ambitieux. En effet, l'objectif principal n'a pas été atteint, une augmentation de 5% de l'utilisation de ces derniers a même été constatée dans certains pays. Un point positif à soulever est tout de même que 80% des produits les plus dangereux ont été interdits à la vente, comme l'explique le rapport « Le plan Ecophyto : un bilan en demi-teinte » (2016). En France, une diminution de la quantité de produits phytosanitaires vendus a tout de même été constatée ces dernières années (**Fig. 5**).

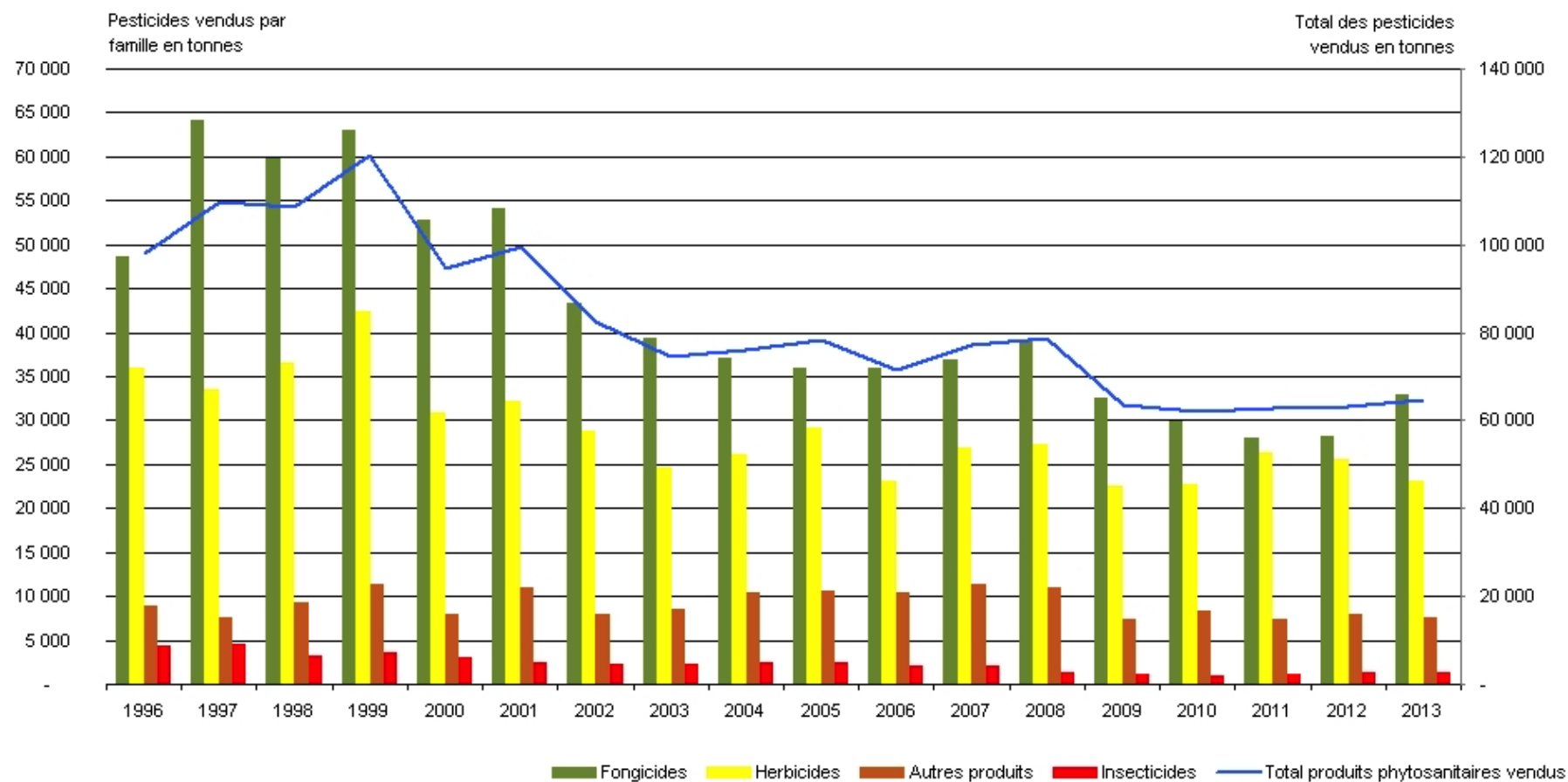


Figure 5. Évolution des quantités de produits phytosanitaires (fongicides, herbicides et insecticides) vendus en France métropolitaine entre 1996 et 2013, source : Union des industries pour la Protection des Plantes, UIPP traitements, 2016

Suite à cet échec, le gouvernement a réagi en instaurant un second plan : Ecophyto 2025, avec le même objectif de réduction de 50% des pesticides en Europe, à l'horizon 2025. D'importants changements sont nécessaires ; les pratiques culturales doivent être revues. Pour cela, plusieurs mesures déjà en place pour le plan Ecophyto 2018 sont maintenues jusqu'en 2025. Six axes et actions sont mises en avant (Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt et Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, 2015) :

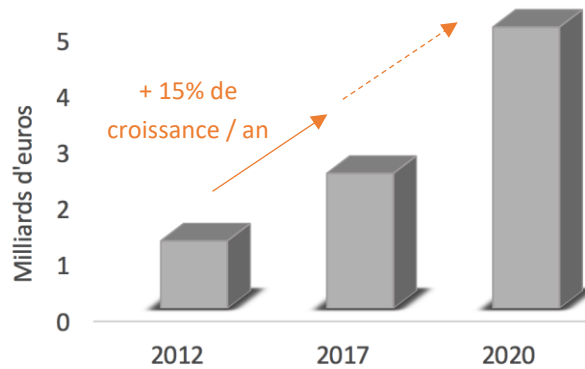
1. Faire évoluer les pratiques et les systèmes de culture, par exemple en incitant les exploitants agricoles à changer leurs pratiques culturales, investir dans des agroéquipements répondant aux enjeux environnementaux et de protection des opérateurs ;
2. Renforcer les moyens alloués à la recherche et à l'innovation, dans le but de trouver de nouvelles solutions efficaces contre les pathogènes, qui auraient moins d'impact sur l'environnement et la santé ;
3. Réduire les risques et les effets des produits phytosanitaires sur la santé et l'environnement par l'instauration d'un dispositif de pharmacovigilance ;
4. Supprimer l'utilisation de pesticides là où cela n'est pas indispensable, comme dans les jardins, les espaces végétalisés et les infrastructures ;
5. Encourager les dynamiques collectives locales autour de la réduction et de la sécurisation des pesticides, veiller à la cohérence des politiques publiques et élaborer un référentiel commun de protection intégrée, décliné à plusieurs niveaux (local, régional et national) ;
6. Communiquer, de manière dynamique et par une approche participative, les outils et les actions mises en place, dans le but d'instaurer un débat citoyen constructif.

De par son importante surface agricole, la France est au premier rang européen avec 29 millions d'hectares cultivés ; l'utilisation de produits phytosanitaires associée est donc importante. La volonté d'agir est indéniable. En revanche, du chemin reste à parcourir pour atteindre les objectifs fixés par les divers plans mis en place.

### 1.2.2. *Le biocontrôle : un marché en pleine croissance*

Le contrôle biologique des pathogènes en agriculture est une méthode alternative à l'utilisation des produits de synthèse et fait partie des axes mis en place dans les plans Ecophyto. Dans un but de réduction des produits phytosanitaires conventionnels, le biocontrôle est encouragé et connaît une croissance importante depuis 2012. Il devrait atteindre 8,5% du marché mondial de protection des plantes d'ici 2020, contre 3% aujourd'hui (**Fig. 6**). Le biocontrôle consiste en l'utilisation d'insectes ou de microbes pour repousser de manière directe ou indirecte les nuisibles. Il se base sur l'interrelation

de nombreux facteurs environnementaux visant à désavantager les prédateurs et/ou à favoriser les défenses des plantes cultivées.



**Figure 6.** Évolution du marché mondial du biocontrôle (en milliards d'euros) depuis 2012 et perspectives pour 2020, à partir des données de [www.invivo-group.com](http://www.invivo-group.com)

- L'utilisation de microorganismes « protecteurs » activant les défenses des plantes est l'une des méthodes les plus répandues. Ils peuvent se développer dans la rhizosphère (le sol) ou dans la phyllosphère (la plante). La rhizosphère étant la première ligne d'attaque des pathogènes, les microorganismes protecteurs doivent être capables de s'y développer. Les exsudats racinaires et nutriments sécrétés par la plante constituent un habitat écologique optimal pour la croissance de certaines bactéries. Un large panel de microorganismes bénéfiques a déjà montré un pouvoir de défense vis-à-vis des pathogènes des plantes, comme c'est le cas de certains *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Enterobacter* pour les bactéries ; ainsi que d'espèces de *Trichoderma*, *Fusarium* et *Heteroconium* pour les champignons (Siah et al., 2018). Ces microorganismes peuvent être directement inhibiteurs de la croissance de pathogènes cibles, qui seraient détruits avant même d'avoir colonisé la plante. C'est par exemple le cas des souches de *Pseudomonas* qui sont naturellement présentes dans les sols et qui synthétisent de nombreux composés actifs (Shoda, 2000). Les interactions indirectes se font par les modifications des rapports de minéraux et des autres nutriments présents dans le sol, qui peuvent avoir une incidence sur la croissance des plantes, ou leur potentiel de défense. Ces microorganismes peuvent également agir directement sur la croissance des plantes, par exemple par la production d'hormones de croissance. Cela peut également inclure l'atténuation de stress abiotique (Ab Rahman et al., 2018). Dans ce contexte, la protection des plantes peut se faire par l'utilisation d'une seule espèce de microorganismes « protecteur » ou de plusieurs espèces en mélange qui peuvent agir ensemble, comme c'est le cas pour lutter contre la verticilliose de l'olivier (Varo et al., 2016).
- L'utilisation d'insectes prédateurs permet également de lutter contre certains pathogènes de plantes. L'exemple le plus connu est celui des cultures de tomate, qui peut être protégées à 70% par de la lutte biologique (Dephy maraîchage, Ecophyto,

2015). Bien que plus coûteux que l'utilisation de phytosanitaires, le biocontrôle s'est imposé en France pour lutter contre les pathogènes de la tomate suite aux nombreuses résistances de ces derniers aux pesticides. Deux auxiliaires sont par exemple nécessaires pour lutter contre les aleurodes (ou mouches blanches) qui dévorent les pieds de tomate : l'insecte nuisible sera soit mangé par un prédateur (*Macrolophus*, hémiptère), soit tué par un parasite qui va pondre des œufs et se développer dans sa victime comme le font certaines guêpes (Herth, 2011). Des nématodes peuvent également être utilisés pour lutter contre le scarabée japonais, polyphage qui se nourrit de feuilles de plus de 300 plantes hôtes, utilisées en horticulture et en agriculture (Marianelli et al., 2018).

- Les plantes présentes sur un même terrain communiquent et interfèrent entre elles. Cette influence est induite grâce aux molécules chimiques sécrétées par ces dernières, ce sont des composés allélo-chimiques, on parle d'allélopathie. Par ce principe, certains végétaux sont capables d'inhiber la germination ou la croissance des plantes voisines. L'allélopathie peut donc être utilisée pour inhiber la croissance des mauvaises herbes ou d'autres plantes non désirées sur une parcelle, mais également pour stimuler la croissance de certaines plantes cultivées, en fonction de la nature des composés relargués. Par exemple, le sorgho et certaines Brassicacées sont connues pour libérer des composés allélo-chimiques efficaces contre les mauvaises herbes (Malkomes, 2006 ; Jabran et al., 2015). Les composés allélo-chimiques sont considérés comme des herbicides « biologiques » et peuvent être directement appliqués sur les cultures. C'est le cas de phéromones sur les cultures de pêches qui perturbent la sexualité de certains insectes comme la tordeuse orientale *Cydia molesta* (lépidoptère) (Herth, 2011).
- Une autre solution de biocontrôle est de remplacer les pesticides conventionnels par des extraits de plantes ou des produits d'origine naturelle non toxiques (Dayan et al., 2009). L'exemple le plus étudié et commercialisé depuis les années 1990, dérive d'un extrait éthanolique de la Renouée de Sakhaline (*Reynoutria sachalinensis* F. Schmidt Nakai, Polygonacées). Diverses formulations ont été développées. Elles sont utilisées à la fois en préventif et en curatif, pour protéger diverses plantes, comme le concombre, la rose ou encore la tomate et le blé ; de l'oïdium, une infection fongique très répandue (Konstantinidou-Doltsinis et al., 2006 ; Siah et al., 2018). D'autres exemples existent. C'est le cas de la farine de gluten de maïs qui est un sous-produit de la mouture de maïs, vendu comme herbicide, notamment pour la culture d'oignon ou de betterave (McDade et Christians, 2000). L'acide acétique dilué à hauteur de 20% dans de l'eau est également un herbicide naturel non sélectif utilisé pour lutter contre les mauvaises herbes (Young, 2004). Des huiles essentielles sont connues pour repousser spécifiquement certains insectes prédateurs. C'est par exemple le cas de l'huile essentielle de clou de girofle, riche en eugénol, qui est

efficace contre le charançon du blé *Sitophilus granarius* (néoptère) (Isman, 2000). Leur action doit être rapide, leur efficacité est limitée au champ du fait qu'elles se volatilisent très vite. Des formulations alternatives telles que la micro-encapsulation peuvent permettre de faciliter leur application, d'augmenter la durée de leur efficacité en réduisant leur volatilisation (Isman, 2000 ; Dayan et al., 2009).

- Les composés stimulateurs de défense des plantes constituent également une alternative de lutte. Ils sont appliqués en prévention d'une infection, de manière à induire des mécanismes de défense chez la plante qui sera alors capable de combattre le pathogène. Par exemple, des formulations contenant des laminarines, polysaccharides extraits de la laminaire digitée (*Laminaria digitata* (Hudson) J.V. Lamouroux, Laminariacée), sont connues pour leur pouvoir biostimulant. Elles augmenteraient la quantité de peroxyde d'hydrogène au niveau du site de pénétration du pathogène dans le cas de l'interaction blé/oïdium (Renard-Merlier et al., 2007). L'étude des stimulateurs de défense des plantes est relativement récente, de nombreuses recherches portent actuellement sur cette alternative (Regnault-Roger, 2006).
- Des méthodes physiques, comme le paillage et le sarclage, sont autant d'autres méthodes manuelles pour contrôler les phytopathogènes.

### 1.2.3. *Zymoseptoria tritici* : un champignon pathogène du blé

*Zymoseptoria tritici* est la forme asexuée de *Mycosphaerella graminicola*. La septoriose se manifeste par l'apparition de nécroses foliaires au sein desquelles sont visibles des points noirs appelés pycnides. Elles sont formées par le champignon (**Fig. 7**). Par temps de pluie, elles se gorgent d'eau et libèrent des pycnidiospores qui vont permettre la dissémination de la maladie sur les plantes voisines. Le blé est l'une des trois grandes cultures mondiales avec le riz et le maïs. Les ravages causés par cette maladie entraînent des pertes pouvant atteindre 30 à 50% dans certains pays. Les pertes économiques causées par la septoriose sont non seulement liées à la diminution des rendements, mais également au coût engendré par l'utilisation de fongicides (Fones et Gurr, 2015). En effet, les strobilurines sont utilisées pour contrôler la maladie. Ce sont des fongicides qui inhibent la chaîne respiratoire des mitochondries du champignon (Bartlett et al., 2002). L'utilisation à répétition de ces fongicides a entraîné l'apparition de souches de *Z. tritici* résistantes, compliquant ainsi le traitement de la maladie (Torriani et al., 2009).



Figure 7. Feuille de blé infectée par *Z. tritici* montrant les pycnides, source : [www.bretagne.synagri.com](http://www.bretagne.synagri.com)

### 1.3. Les produits d'origine naturelle : perspectives de lutte antimicrobienne

L'utilisation de produits d'origine naturelle dans la lutte antimicrobienne semble être une piste prometteuse. En effet, il existe une grande diversité chimique de produits synthétisés par les végétaux, donnant ainsi la possibilité de trouver des antimicrobiens qui agissent différemment des antibiotiques connus. Ils peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres composés actifs, comme moyen de contourner la résistance acquise, dans le cas d'une utilisation raisonnée (Gibbons, 2008). Certains végétaux sont utilisés depuis des centaines d'années en médecine traditionnelle pour traiter toutes sortes d'infections. En se basant sur leur intérêt ethnopharmacologique, de nombreuses plantes ont déjà fait l'objet d'études antimicrobiennes. Plusieurs classes chimiques biosynthétisées par les végétaux, incluant des terpènes, des flavonoïdes, des tanins ou encore des alcaloïdes, sont connus pour leur potentiel antibactérien et antifongique. Dans de nombreux cas, ces composés sont impliqués dans des mécanismes de défense de la plante contre les pathogènes. La présente thèse s'intéresse plus particulièrement au potentiel antimicrobien de composés phénoliques.

Concernant le potentiel antimicrobien d'une plante, il est reconnu qu'une activité antibactérienne est intéressante lorsque la CMI est inférieure à  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  pour un extrait brut et à  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  pour un produit purifié (Ríos et Recio, 2005). Cushnie et Lamb (2011) ont réalisé un inventaire des flavonoïdes connus pour leur activité antibactérienne ; les dix plus puissants présentent une CMI allant de  $0,06$  à  $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  à l'égard de souches de *S. aureus*. Parmi ces composés, on retrouve la panduratine A, une chalcone biosynthétisée par le gingembre Chinois (*Boesenbergia pandurata* Roxb. Schltr., Zingibéracées). Concernant l'activité antifongique, certains flavonoïdes isolés de différentes espèces de Pipéracées présentant une CMI de  $2$  à  $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , sont considérés comme de bons antifongiques (Arif et al., 2009). Ces données montrent le potentiel des produits d'origine naturelle. Certaines molécules intéressantes peuvent ensuite être

modifiées chimiquement pour accroître leur activité, leur biodisponibilité et/ou diminuer leur toxicité.

Les composés phénoliques étant connus depuis de nombreuses années pour leurs propriétés antimicrobiennes, plusieurs mécanismes d'action vis-à-vis des bactéries ont été découverts. Ils sont très variables selon la classe de composés étudiée. Voici quelques exemples de pistes concernant leur mode d'action (Cushnie et Lamb, 2011).

- **Inhibition du « quorum sensing » bactérien.** Le « quorum sensing » est un mécanisme lié à la densité de bactéries dans un environnement. Lorsque celle-ci est importante, les cellules reçoivent un message chimique par l'intermédiaire d'auto-inducteurs et de récepteurs membranaires, leur permettant d'activer leurs gènes de virulence. Les auto-inducteurs les plus connus sont les N-acylhomosérine lactones. Certains flavonoïdes perturberaient l'interaction de ces molécules avec la membrane (Raina et al., 2009).
- **Inhibition des sortases.** Les sortases sont des enzymes indispensables au développement d'une infection, elles sont présentes dans le cytoplasme des bactéries à Gram positif. Elles permettent d'ancrer des molécules à la paroi cellulaire, comme des glycoprotéines de surface permettant l'adhésion. Des flavonoïdes comme la morine (flavonol), inhiberaient ces enzymes (Kang et al., 2006).
- **Neutralisation des toxines bactériennes.** Des flavonoïdes peuvent également agir au niveau des facteurs de virulence des bactéries. Certaines catéchines agissent par exemple en inhibant les toxines  $\alpha$  chez *S. aureus*. Ces dernières sont indispensables à la pathogénicité de *S. aureus*, elles permettent la formation de pores au niveau de la membrane plasmique de l'hôte et peuvent entraîner la mort cellulaire (Choi et al., 2007). Les catéchines peuvent aussi se lier aux lipopolysaccharides, ce sont des composants essentiels de la membrane externe des bactéries à Gram négatif jouant notamment un rôle d'endotoxines (Delehanty et al., 2007).
- **Inhibition des pompes à efflux.** Certains composés extraits de plantes ont déjà montré une activité inhibitrice spécifique des pompes à efflux responsables de la résistance chez les bactéries. L'une des stratégies de lutte contre l'antibiorésistance est l'association de produits antimicrobiens avec des composés inhibiteurs des pompes à efflux, ces derniers n'étant pas forcément antimicrobiens. Par exemple, la berbérine qui est un alcaloïde antimicrobien très connu, est sujette à des phénomènes de résistance car certains *S. aureus* sont capables de l'exporter par l'intermédiaire des pompes *norA*. La 5'-méthoxyhydnocarpine, synthétisée par certaines plantes du genre *Berberis*, peut être utilisée en association avec la berbérine. Cet flavonolignane inhibe les pompes *norA* et permet de contourner la résistance des *S. aureus* à la berbérine (Stermitz et al., 2000).



En plus de conférer une certaine amertume et des arômes à la bière, le houblon est aussi utilisé pour ses propriétés antimicrobiennes. Les molécules responsables de son potentiel antibactérien sont des chalcones prénylées et des dérivés prénylés d'acylphloroglucinols (Zanoli et Zavatti, 2008). Ces derniers ne sont néanmoins pas exploités pour lutter contre les souches bactériennes résistantes aux antibiotiques. La partie antibactérienne de ce projet vise à étudier, de manière plus spécifique, le potentiel de certains produits du houblon vis-à-vis de souches de SARM.

## Chapitre 2. Le houblon : une source de métabolites secondaires originaux

---

### 2.1. Présentation du houblon, *Humulus lupulus* L.

#### 2.1.1. Description botanique

Le houblon aurait été décrit pour la première fois en 77-79 apr. J.-C. par le botaniste Pline l’Ancien dans un livre intitulé *Naturalis Historia*. Il parlait du houblon comme de la plante qui poussait spontanément dans la nature et s’enroulait autour des arbres (Martorana, 2010). En effet, le houblon est une plante grimpante, dioïque et vivace. Il appartient à la famille des Cannabacées. Le genre *Humulus* est classé en 3 espèces : *H. lupulus*, *H. japonicus* et *H. yunnanensis* (**Tableau 1**). L’espèce qui nous intéresse ici est *H. lupulus*. Elle est originaire des régions tempérées d’Europe, d’Asie et d’Amérique du Nord. Son nom provient du latin *lupus* qui signifie « loup ». Les Romains l’ont appelé *lupulus*, qui signifie « petit loup » car ils croyaient que la plante suçait la sève des arbres pour croître et grimper en s’enroulant autour d’eux (Edwardson, 1952). Cinq variétés sont distinguées chez *H. lupulus* : *lupulus* en Europe, *cordifolius* au Japon, *neomexicanus*, *pubescens* et *lupuloides* en Amérique du Nord. Pour chaque variété botanique, de nombreux cultivars existent (Murakami et al., 2003).

**Tableau 1.** Place du houblon dans la classification APG IV (The Angiosperm Phylogeny Group 2016)

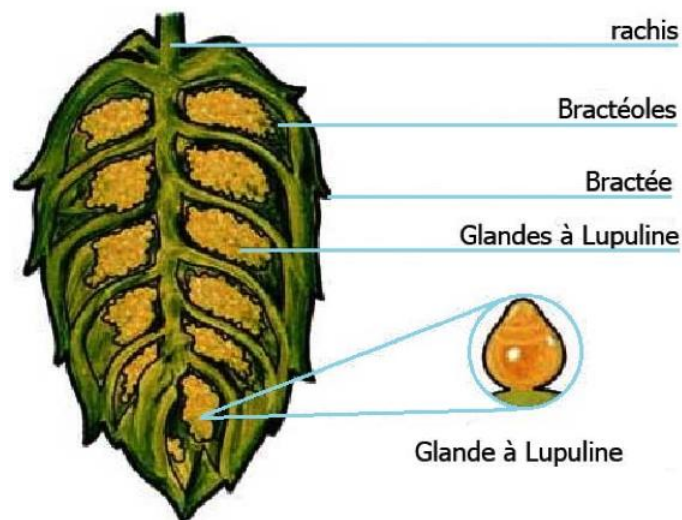
Clade	Plantae
Clade	Trachéophytes
Clade	Spermatophytes
Clade	Angiospermes
Clade	Dicotylédones vraies supérieures
Clade	Rosidées
Ordre	Rosales
Famille	Cannabaceae
Genre	<i>Humulus</i>
Espèce	<i>lupulus</i> , <i>japonicus</i> ou <i>yunnanensis</i>

Sa tige herbacée et volubile s’enroule autour d’un support et peut atteindre 6 à 10 mètres de hauteur. Ses feuilles sont opposées et présentent 3 à 5 lobes dentés. Les inflorescences mâles sont composées de petites fleurs organisées en grappes rameuses (**Fig. 8**). Les inflorescences femelles sont également appelées strobiles ou cônes. La forme conique est donnée par l’imbrication des bractées entre elles, le tout étant pédonculé. Les bractées sont de couleur vert-jaunâtre, elles sont ovales, membraneuses

et sessiles. Au niveau de leur base se trouvent des glandes à oléorésines ou trichomes glandulaires (**Fig. 9**), qui sécrètent une résine jaunâtre, appelée lupuline, riche en métabolites originaux et d'intérêt thérapeutique (Bruneton, 2016).



**Figure 8.** Planche botanique montrant les différentes parties du houblon, *Humulus lupulus* L., par Franz Eugen Köhler, Köhler's Medizinal-Pflanzen-List of Koehler Images



**Figure 9.** Dessin d'un cône de houblon en coupe longitudinale montrant notamment les bractées imbriquées et les glandes à lupuline qu'elles contiennent, d'après [www.oocbo.com](http://www.oocbo.com)

### 2.1.2. Culture en France et dans le monde

Le houblon sauvage apparaît spontanément dans les haies et les lisières des bois des climats tempérés, principalement dans l'hémisphère Nord.

Aujourd'hui, le houblon est cultivé dans de nombreux pays pour son usage dans l'industrie brassicole. Les pieds femelles sont utilisés, par l'industrie brassicole, pour leurs inflorescences. Le houblon est principalement retrouvé dans les régions tempérées entre les latitudes 35° et 55°. Les principales zones de culture mondiale se situent en Allemagne, aux États-Unis, au Royaume Uni, en République Tchèque et en France pour l'hémisphère Nord, ainsi qu'en Australie et en Nouvelle-Zélande pour l'hémisphère Sud (Favre et al., 2007). La production mondiale de houblon varie de 80 000 à 100 000 tonnes par an. Les surfaces de culture sont en augmentation dans certains pays comme les États-Unis et l'Allemagne depuis quelques années, en raison notamment d'une mode pour les bières artisanales et très houblonnées (**Fig. 10**). Au sein de l'Union Européenne, 2600 exploitations ont été recensées dans les 14 états membres producteurs, représentant 60% de la superficie mondiale. L'Allemagne étant le premier producteur Européen.

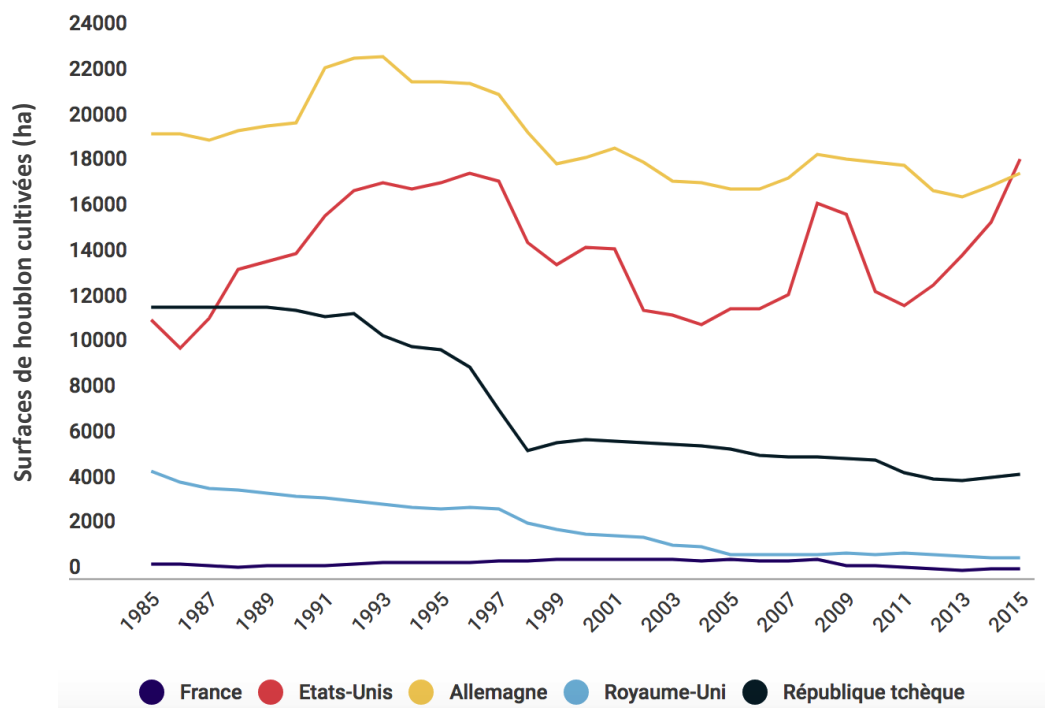
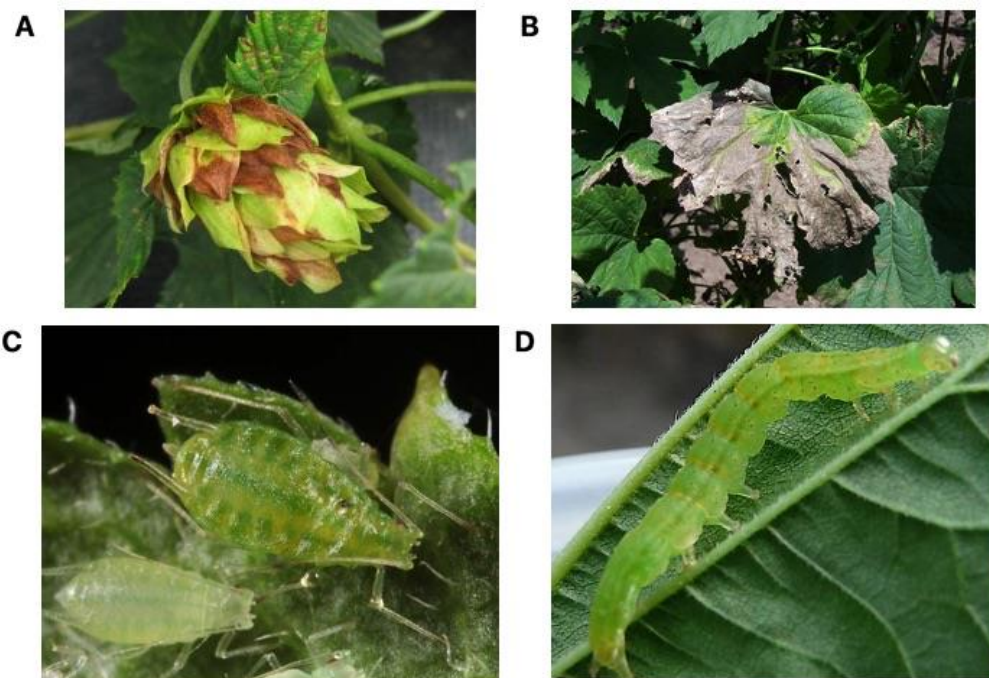


Figure 10. Surfaces de houblon cultivées (ha) dans l'hémisphère Nord par pays entre 1985 et 2015 (Stassi, 2017)

En France, le houblon est cultivé majoritairement en Alsace ainsi que dans les Hauts-de-France. La production française est minoritaire en comparaison avec les autres pays européens, elle se chiffrait par exemple à 555 tonnes en 2015 (**Fig. 10**). L'ensemble de la filière française de la production du houblon est regroupé au sein de l'Association des Producteurs de Houblon de France. Deux implantations régionales de cette association

existent : l'une à Boeschepe (59) et l'autre à Hochfelden (67). La coopérative Houblonnière de la région Hauts-de-France créée en 1978 se nomme COOPHOUNORD. Un total de 31 hectares (contre 250 en 1985) sont cultivés par sept producteurs qui proposent dix cultivars. En raison du développement des micro-brasseries, la production reprend un nouvel élan ces quelques dernières années, avec des projets d'implantation de nouvelles houblonnières (Caenen, 2016 ; Deraedt, 2017).

Comme tous les végétaux, le houblon est victime de divers ravageurs pouvant entraîner des pertes de rendement. On retrouve notamment des pathogènes fongiques tels que l'oomycète *Pseudoperonospora humuli* qui est responsable du mildiou, l'une des pathologies les plus dévastatrices des houblonnières (Gent et al., 2017) ; ou encore la verticilliose causée par des champignons du genre *Verticillium* (Habrylo, 2011). Les symptômes associés sont présentés en **figure 11**. Ces pathologies se propagent rapidement, particulièrement dans les zones humides. Des insectes ravageurs comme le puceron du houblon (*Phorodon humuli*, hémiptère) qui est l'un des plus destructeurs de l'hémisphère Nord (Lorenzana et al., 2017) ; ou encore l'arpenteuse du houblon, causée par *Hypena humuli* (lépidoptère) particulièrement répandue aux États-Unis (Grasswitz et James, 2008) ont également été décrits (**Fig. 11**). Des infections virales peuvent aussi infecter le houblon, elles sont causées par un pathogène nommé *Hop Stunt Viroid*. Il se manifeste principalement au Japon, et plus récemment, aux États-Unis. Aujourd'hui, son impact sur les cultures est relativement mineur car de nombreux cultivars le tolèrent (Eastwell et al., 2007).



**Figure 11.** Photos de houblon montrant les symptômes causés par l'agent pathogène du mildiou (A, [www.osu.edu](http://www.osu.edu)) et de la verticilliose (B, Maltonne, 2016) ; photos des insectes ravageurs montrant le puceron (C, [www.influentialpoints.com](http://www.influentialpoints.com)) et l'arpenteuse (D, [www.bugguide.net](http://www.bugguide.net)) du houblon

## 2.2. Le métabolisme du houblon : composition chimique et biosynthèse

En raison de leur intérêt économique, les cônes femelles de houblon sont les parties de la plante les plus étudiées. Vlaanderen a été le premier à tenter de caractériser la résine jaunâtre du houblon (lupuline) en 1858. En 1986, Verzele rassemblait les connaissances avec plus d'une centaine de molécules identifiées. Aujourd'hui, la composition des cônes femelles est bien connue et sera développée dans cette partie. En revanche, les feuilles, les tiges et les rhizomes ayant peu d'intérêt économique, n'ont été que très peu étudiés.

### 2.2.1. *Les métabolites primaires*

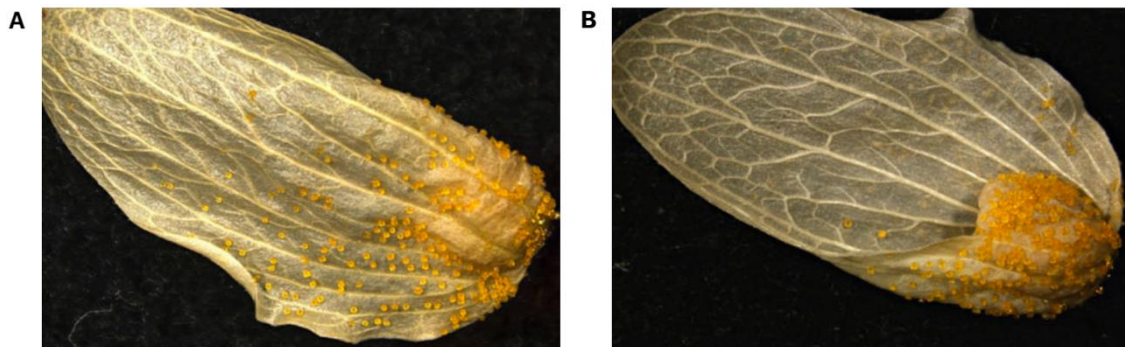
Le métabolisme primaire englobe l'ensemble des composés impliqués dans la nutrition, la croissance, le développement et la reproduction de l'organisme. Il inclut les sucres, les lipides, les acides aminés, les peptides et les protéines (Bruneton, 2016). Même si ce sont plutôt les métabolites secondaires qui sont étudiés pour leurs propriétés biologiques, quelques métabolites primaires ont été identifiés dans le houblon. Ils ne seront pas détaillés ici. La présence de sucres comme le glucose, le fructose, le raffinose ou encore le maltose ont déjà été recensés (Faivre et al., 2007 ; Farag et al., 2011). Concernant les lipides, des dérivés du sitostérol ont été identifiés par Chadwick et al. (2006). Certains acides aminés comme le tryptophane ont également été purifiés à partir de bractées des inflorescences femelles (Tanaka et al., 2014).

### 2.2.2. *Les métabolites secondaires*

Par définition, le métabolisme secondaire n'est pas directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction de la plante. Ces composés ont plutôt un rôle dans l'interaction avec l'environnement. Ils contribuent notamment aux mécanismes de défense et à l'adaptation aux stress. Ces métabolites spécialisés sont étudiés par les scientifiques depuis de nombreuses années car ils démontrent souvent des propriétés biologiques, qui pourraient être exploitées par les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Trois grandes familles de métabolites secondaires sont décrites dans le règne végétal : les terpènes, les composés phénoliques et les alcaloïdes. Ils peuvent être présents sous forme d'aglycones ou d'hétérosides (Bruneton, 2016 ; Heinrich et al., 2018).

Le houblon est particulièrement intéressant d'un point de vue phytochimique. Il biosynthétise des métabolites spécialisés originaux et dont beaucoup lui sont propres. Verzele soulignait en 1986, l'importance des composés phénoliques dans la lupuline, incluant les flavonoïdes prénylés et les dérivés prénylés d'acylphloroglucinols ou acides amers. Ces composés sont biosynthétisés et stockés dans les trichomes glandulaires. Deux types de trichomes glandulaires ont été décrits chez le houblon : les glandes

bulbeuses contenant huit cellules à maturité ; les glandes peltées, beaucoup plus grosses, contenant 100 à 200 cellules (Sugiyama et al., 2006). Toutes se retrouvent principalement à la base des bractées des cônes (**Fig. 12**), mais également de plus petite taille et en plus petit nombre sous les feuilles (Stevens et al., 1999 ; Chadwick et al., 2006 ; Nagel et al., 2008). Le développement des glandes à lupuline s'effectuerait en deux étapes : d'abord un stade de croissance pendant les premières étapes de développement des cônes au début de l'été, puis un stade de sécrétion avec expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de ces composés (Patzak et al., 2015). Parallèlement, l'accumulation des métabolites synthétisés dans ces glandes augmente progressivement au cours de la maturation des cônes (De Keukeleire et al., 2003 ; Sugiyama et al., 2006 ; De Keukeleire et al., 2007). La composition du houblon est variable, selon le cultivar (Rossini et al., 2016) et les facteurs environnementaux comme les conditions climatiques (De Keukeleire et al., 2007), les zones de culture et le sol (Green, 1997 ; Kishimoto et al., 2008).



**Figure 12.** Distribution des glandes à lupuline jaunâtres sur les phases inférieure (A) et supérieure (B) des bractées des cônes de houblon (Patzak et al., 2015)

### Les terpènes de l'huile essentielle

Parmi les principales familles identifiées dans le houblon, on retrouve les terpènes qui composent l'huile essentielle. Cette dernière a pour la première fois été étudiée par Chapman en 1903, il comparait son odeur avec d'autres huiles essentielles connues, pour déterminer ses constituants majeurs. De par son odeur caractéristique, il émit l'hypothèse de la présence de  $\beta$ -myrcène, qui a été confirmée par la suite. L'huile essentielle de houblon représente 0,1 à 2% du poids sec des cônes (Bruneton, 2016 ; Aberl et Coelhan, 2012). Les terpènes sont composés d'unités isoprènes dont la biosynthèse passe par la voie de l'acétate-mévalonate. Elle a lieu au moins en partie, dans les glandes à lupuline. Le point de départ est l'isomérisation du diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) en isopentényl-pyrophosphate (IPP) par l'intermédiaire d'une diméthylallyl-pyrophosphate isomérase (DMAPPI, **Fig. 16**) (Nagel et al., 2008).

Les constituants majeurs de l'huile essentielle de houblon varient en fonction de plusieurs paramètres, notamment en fonction du cultivar, on parle de chémotype génétique. La zone géographique de culture a également un impact sur la composition

de l'huile essentielle. Par exemple, les houblons américains et européens montrent des compositions en monoterpènes bien différentes (Sharp, 2016). Les houblons européens sont d'ailleurs particulièrement appréciés des brasseurs, pour les arômes boisés et floraux qu'ils confèrent à la bière, liés à leur teneur en terpènes (Stassi, 2017). En général, les composés majoritaires sont le  $\beta$ -myrcène pour les monoterpènes avec des teneurs allant jusqu'à 57,9% de la composition totale de l'huile. Les sesquiterpènes sont majoritairement représentés par : l' $\alpha$ -humulène (jusqu'à 51,2%), le  $\beta$ -caryophyllène (jusqu'à 14,7%), le  $\gamma$ -élémentène (jusqu'à 14%) et le  $\beta$ -sélinène (jusqu'à 10,5%) (**Fig. 13**). D'autres composés de type hémiterpènes, composés sulfurés ou encore hydrocarbures aliphatiques ont été identifiés dans le houblon mais ne seront pas détaillés ici (Bocquet et al., 2018b).

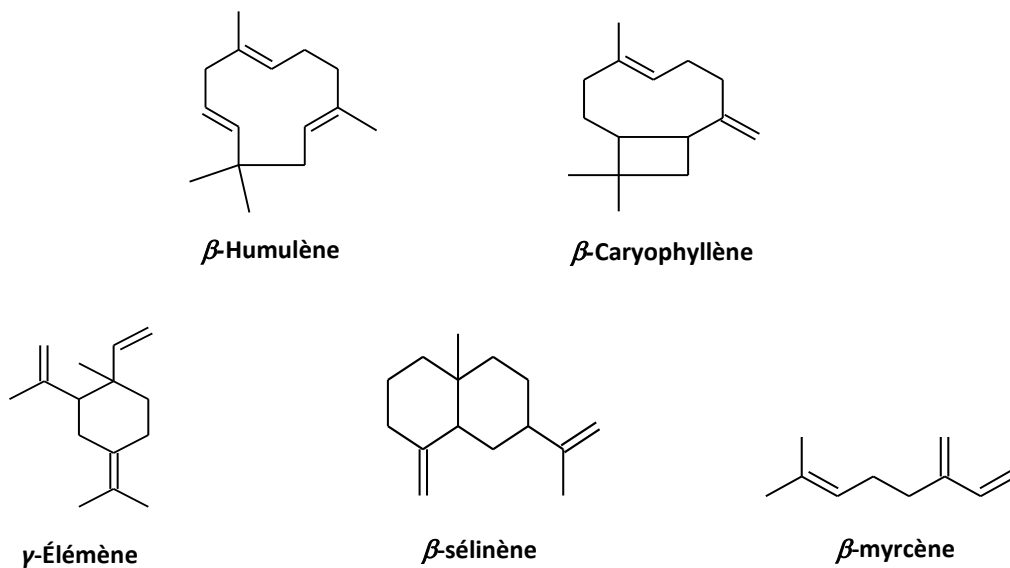


Figure 13. Structures chimiques des terpènes majoritaires de l'huile essentielle de houblon

### Autres terpènes

Des triterpènes, comme l' $\alpha$ -, le  $\beta$ - et le  $\delta$ -amyrine, ainsi que le lupéol ont également été identifiés dans les cônes de houblon (Akazawa et al., 2012).

### Les composés phénoliques

Les cônes femelles de houblon sont riches en composés phénoliques issus de la voie des shikimates et de la voie des polycétides. Par définition, les composés phénoliques comportent au moins une fonction hydroxyle -OH sur leur cycle aromatique, appelée fonction phénol. Ils comprennent plusieurs classes. Chez le houblon, on retrouve principalement :

#### Les flavonoïdes

Ils représentent la sous-classe la plus variée et la plus répandue de composés phénoliques. Structurellement, ils possèdent une base en C6-C3-C6. Les deux cycles



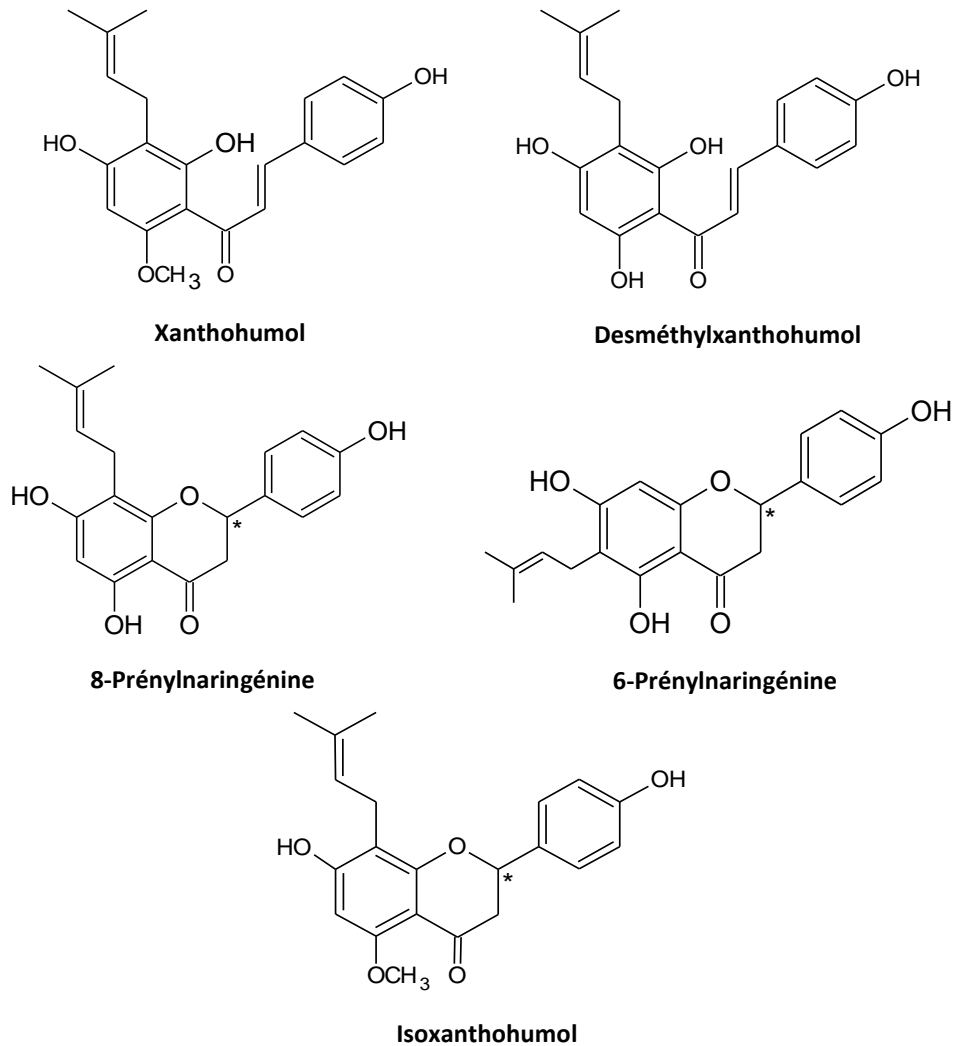
benzéniques A et B sont reliés par une chaîne en C3 pouvant être complétée par une fonction ester, formant ainsi un cycle central C. La variabilité structurale de ce dernier est à l'origine des sous-classes de flavonoïdes : flavones, flavonols, flavanols, flavanones, chalcones.

Le flavonoïde majoritaire du houblon est une chalcone prénylée : le XN (**Fig. 14**). Il est propre au houblon et représente 0,1 à 1% du poids sec des cônes (Stevens et al., 1999 ; Krofta et al., 2005 ; Chadwick et al., 2006). Les chalcones constituent le point de départ de la voie des phénylpropanoïdes, par condensation d'une molécule de *p*-coumaroyl-CoA issue de la phénylalanine, et de trois malonyl-CoA issus de la voie des polycétides, par une enzyme clé qui est la chalcone synthase (**Fig. 16**). La chalconaringénine ainsi formée est prénylée une première fois par HIPT-1 (*Humulus lupulus* prényltransférase-1) pour obtenir le DMX (**Fig. 14**). Il représente entre 0,2 et 0,5% du poids sec des cônes (Krofta et al., 2005). Le DMX est ensuite transformé en XN par une *O*-méthyltransférase.

Les flavanones du houblon sont représentées par l'isoxanthohumol (IXN) qui constitue 0,008% du poids sec des cônes (**Fig. 14**). Cette flavanone, présente en faible quantité dans le houblon, a également été retrouvée chez *Sophora flavescens* (Fabaceae) (Żołnierczyk et al., 2015). Dans le houblon, l'isomérisation du XN en IXN n'a pas été démontrée. De plus, la prénylation suivie de la méthylation du cycle A de la chalcone tendrait plutôt à inhiber l'isomérisation en flavanone (Stevens et Page, 2004 ; Gerhäuser, 2005b). Le XN se cycliserait pour devenir l'IXN en milieu aqueux lorsque le pH est supérieur à 9 (Kamiński et al., 2017). Quant à la stabilité du DMX, une partie s'isomériserait spontanément en deux autres flavanones, la 6-prénylnaringénine (6-PN) et la 8-prénylnaringénine (8-PN) lorsqu'il est en solution dans le MeOH à pH neutre. L'oxygène dissous dans le milieu stabiliserait la molécule (Chen et al., 2009).

Des dérivés minoritaires de ces composés sont également présents chez le houblon (Tabata et al., 1997 ; Stevens et al., 2000 ; Chadwick et al., 2004 ; Stevens et Page, 2004 ; Zhao et al., 2005 ; Tanaka et al., 2012). La 6-PN et la 8-PN sont retrouvées dans les cônes femelles, en quantités plus faibles (**Fig. 14**, Dhooghe et al., 2010). La 8-PN représente en moyenne 0,002% du poids sec des cônes (Stevens et Page, 2004). D'après Prencipe et al. (2014), la 6-PN serait présente en quantités légèrement supérieures à la 8-PN, mais cela varie en fonction des cultivars.

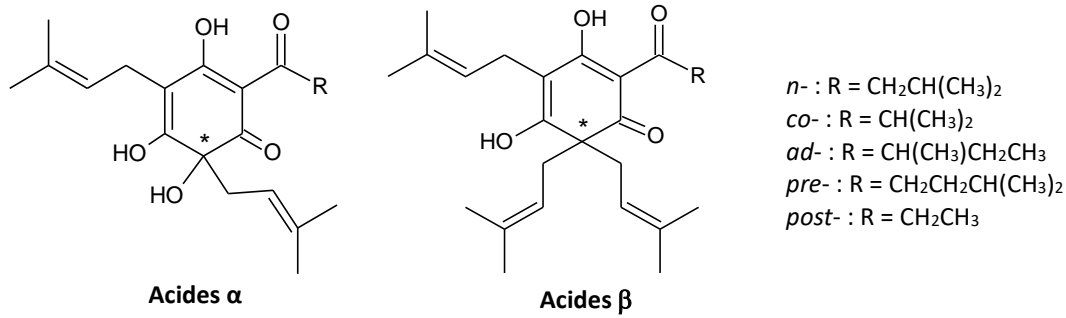
Le houblon biosynthétise également des flavonoïdes plus classiques comme des aglycones de flavonols (quercétine, kaempférol, myricétine), des hétérosides de ces flavonols ou encore des tanins (Zanoli et Zavatti, 2008).



**Figure 14.** Structures chimiques des flavonoïdes prénylés majoritaires des cônes femelles de houblon, les abréviations utilisées dans le texte correspondent au xanthohumol (XN), desméthylxanthohumol (DMX), 8-prénylnaringénine (8-PN), 6-prénylnaringénine (6-PN) et isoxanthohumol (IXN) ; l'étoile montre le carbone asymétrique.

### Les dérivés de phloroglucinol

Le squelette de base est un cycle aromatique hydroxylé en positions C1, C3 et C5. Les acylphloroglucinolés majoritaires du houblon sont des dérivés prénylés aussi appelés acides amers. Ils constituent une part importante des composés phénoliques avec 5 à 20% du poids sec des cônes. Ils peuvent être classés en 2 catégories : les acides  $\alpha$  (humulone et dérivés) et les acides  $\beta$  (lupulone et dérivés). Les acides  $\alpha$  sont les composés d'intérêt pour l'industrie brassicole, ils sont caractérisés par une chaîne prénylée en moins par rapport aux acides  $\beta$ , ce qui les rend légèrement moins apolaires. De nombreux dérivés existent, en addition aux stéréo-isomères *cis/trans*. Ils se différencient par une chaîne carbonée R plus ou moins longue (**Fig. 15**) en fonction de l'acide aminé à partir duquel ils sont synthétisés : valine, leucine ou isoleucine (**Fig. 16**, Clark et al., 2013). Ils sont présents dans le houblon en proportions différentes, formant ainsi un mélange complexe (Zanoli et Zavatti, 2008).



**Figure 15.** Structures chimiques des acylphloroglucinols majoritaires des cônes femelles de houblon ; l'étoile montre le carbone asymétrique.

D'un point de vue biosynthétique, les acides amers proviennent de la voie des polycétides et de la voie du shikimate. La valérophénone synthase, qui est une « chalcone synthase like », permet la formation de la phloroisovalérophénone (PIVP) à partir de trois malonyl-CoA et d'une molécule d'isovaléry-, d'isobutyryl- ou de 2-méthylbutyryl-CoA (**Fig. 16**, Clark et al., 2013). La PIVP ainsi formée est une première fois prénylée par HIPT-1 (Tsurumaru et al., 2012). Puis une seconde prényltransférase permet une nouvelle prénylation, formant la diprényl-phloroisovalérophénone (DP-PIVP), précurseur direct des dérivés de l'humulone par oxydation. Les dérivés de la lupulone proviendraient ensuite soit de la DP-PIVP, soit des dérivés de l'humulone. L'humudifucol, un dimère de phloroglucinols prénylés, a également déjà été identifié dans le houblon (Forino et al., 2016). Par oxydation, les acides  $\alpha$  peuvent être transformés en dérivés d'humulinone, présents en faibles quantités lorsque la plante est en sol, ils augmentent pendant le stockage du houblon (Taniguchi et al., 2013 et 2014).

#### Les acides phénols

Les acides phénols contiennent au moins une fonction phénol et une fonction acide carboxylique. Au sens strict, ce terme est restreint aux composés en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. Cependant, de nombreux composés dérivent de C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> à C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, donnant les acides phénols au sens large. Deux sous-classes existent et dépendent de leur origine biosynthétique. Ils peuvent provenir de la phénylalanine, formant ainsi les dérivés hydroxy-cinnamiques comme l'acide sinapique, ou encore l'acide caféique présents dans le houblon (Karabín et al., 2016). Les acides hydroxy-benzoïques peuvent quant à eux provenir de l'acide déhydro-shikimique qui est l'entrée de la voie des shikimates, ou de la transformation de l'acide cinnamique, faisant alors plutôt intervenir la voie des phénylpropanoïdes. Chez le houblon, ces derniers sont représentés par l'acide gallique, l'acide syringique et l'acide vanillique (Magalhães et al., 2010 ; Karabín et al., 2016).

### Autres composés phénoliques

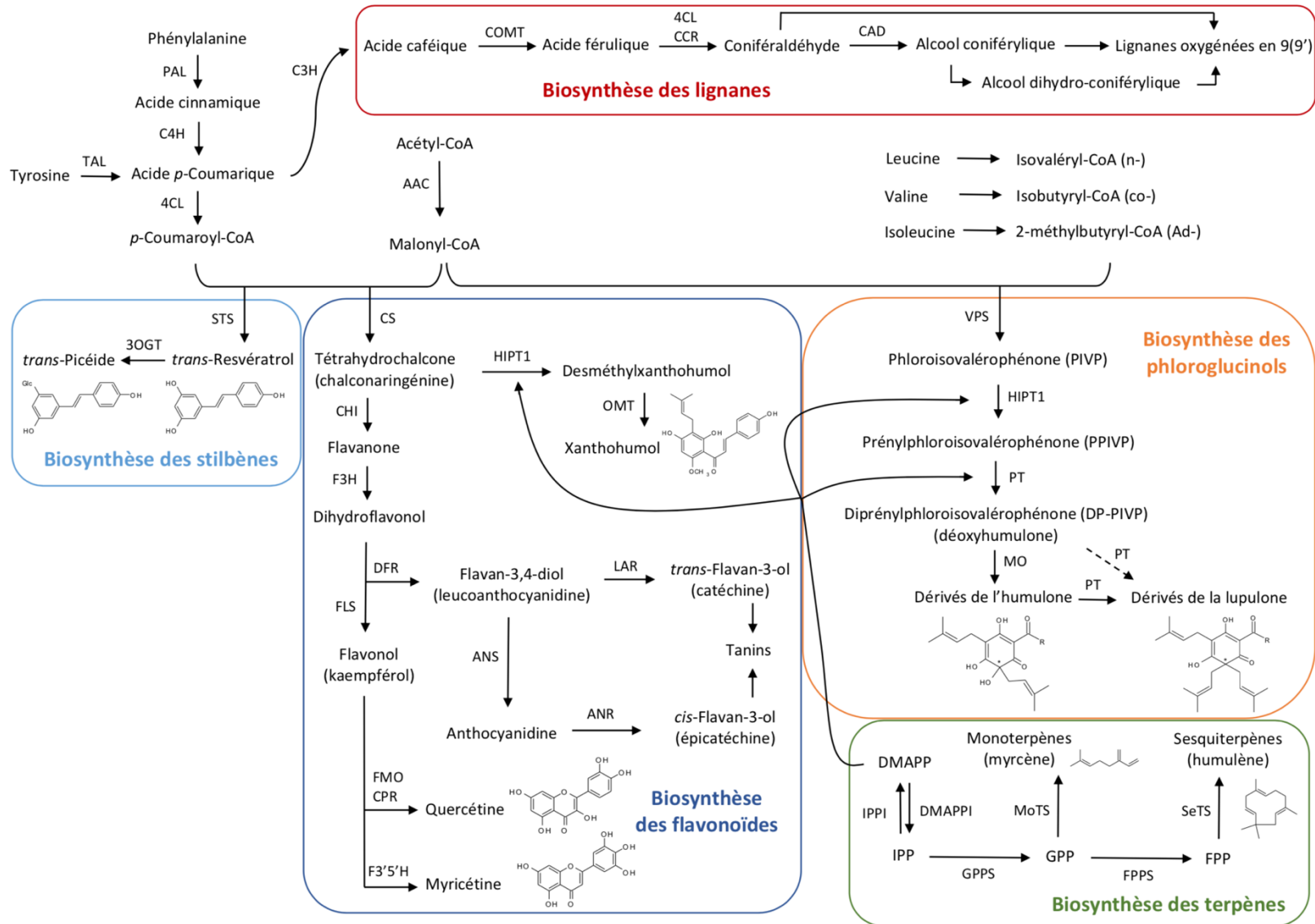
D'autres classes de composés phénoliques comme des lignanes, des tanins et des stilbènes ont également déjà été retrouvés dans le houblon (Stevens et al., 2002 ; Li et Deinzer, 2006 ; Jerkovic et Collin, 2007 ; Tanaka et al., 2014 ; Bocquet et al., 2018b).

Les autres parties du houblon (feuilles, tiges et rhizomes) n'ont été que très peu étudiées. Concernant les composés phénoliques, le XN a été détecté dans les feuilles mais à des teneurs beaucoup plus faibles que dans les cônes femelles (Čeh et al., 2007). Des composés phénoliques plus polaires tels que l'acide coumarique, l'acide caféique, et la catéchine ont été décelés dans les feuilles de houblon. Des hétérosides de flavonoïdes, comme la rutine, ont également été identifiés dans cette partie de la plante (Frag et al., 2012) ainsi que dans les jeunes pousses (Maietti et al., 2017). Des données sont disponibles concernant la composition des feuilles, des tiges et des rhizomes de houblon coréen (*Humulus japonicus*). Certains composés phénoliques tels que l'acide protocatéchique, l'acide quinique, l'acide coumaroyl-quinique, la lutéoline et l'apigénine y ont été identifiés (Choi et al., 2018).

### Les alcaloïdes et composés azotés

Les alcaloïdes au sens strict portent au moins un azote au niveau de leur hétérocycle et dérivent d'un acide aminé. Ils se comportent comme des bases (Bruneton, 2016). Stevens était, en 1967, le premier à déceler la présence de composés azotés dans le houblon. Par la suite, plusieurs composés ont été identifiés, comme des dérivés de  $\beta$ -carboline, avec des teneurs inférieures à 0,07%. Ils sont minoritaires par rapport aux composés phénoliques (Tanaka et al., 2014).

Les composés originaux du houblon pouvant avoir un intérêt en thérapeutique sont les composés phénoliques, plus spécifiquement les chalcones prénylées et les dérivés prénylés d'acylphloroglucinols. Les parties suivantes s'intéresseront donc principalement à ces deux classes chimiques.



**Figure 16.** Biosynthèse des principales classes de composés présents dans le houblon ; PAL : Phénylalanine ammonia-lyase ; TAL : Tyrosine ammonia-lyase ; C4H : Cinnamate 4-hydroxylase ; 4CL : 4-Coumarate-CoA ligase ; STS : Stilbène synthase ; 3OGT : 3-O-Glycosyl-O-transférase ; CS : Chalcone synthase ; HIPT1 : *Humulus lupulus* Prényltransférase-1 ; OMT : O-Méthyltransférase ; CHI : Chalcone isomérase ; F3H : Flavanone 3-hydroxylase ; DFR : Dihydroflavonol 4-réductase ; FLS : Flavonol synthase ; FMO : Flavonoïde 3-monooxgénase ; CPR : Cytochrome P450 réductase ; F3'5'H : Flavonoïde 3'5'-hydroxylase ; LAR : Leucoanthocyanidine réductase ; ANS : Anthocyanidine synthase ; ANR : Anthocyanidine réductase ; VPS : Valérophénone synthase ; PT : Prényltransférase ; MO : Monooxgénase ; DMAPP : Diméthylallyl-pyrophosphate ; DMAPP : Diméthylallyl-pyrophosphate isomérase ; IPP : Isopentényl-pyrophosphate ; IPPI : Isopentényl-pyrophosphate isoérase ; GPPS : Géranyl-pyrophosphate synthase ; GPP : Géranyl-pyrophosphate ; FPPS : Farnésyl-pyrophosphate synthase ; FPP : Farnésyl-pyrophosphate ; MoST : Monoterpène synthase ; SeST : Sesquiterpène synthase ; C3H : p-Coumarate 3-hydroxylase ; COMT : Acide caféique O-méthyltransférase ; CCR : Cinnamoyl-CoA réductase ; CAD : Cinnamoyl-CoA déhydrogénase

### 2.2.3. Techniques d'analyses des métabolites secondaires du houblon

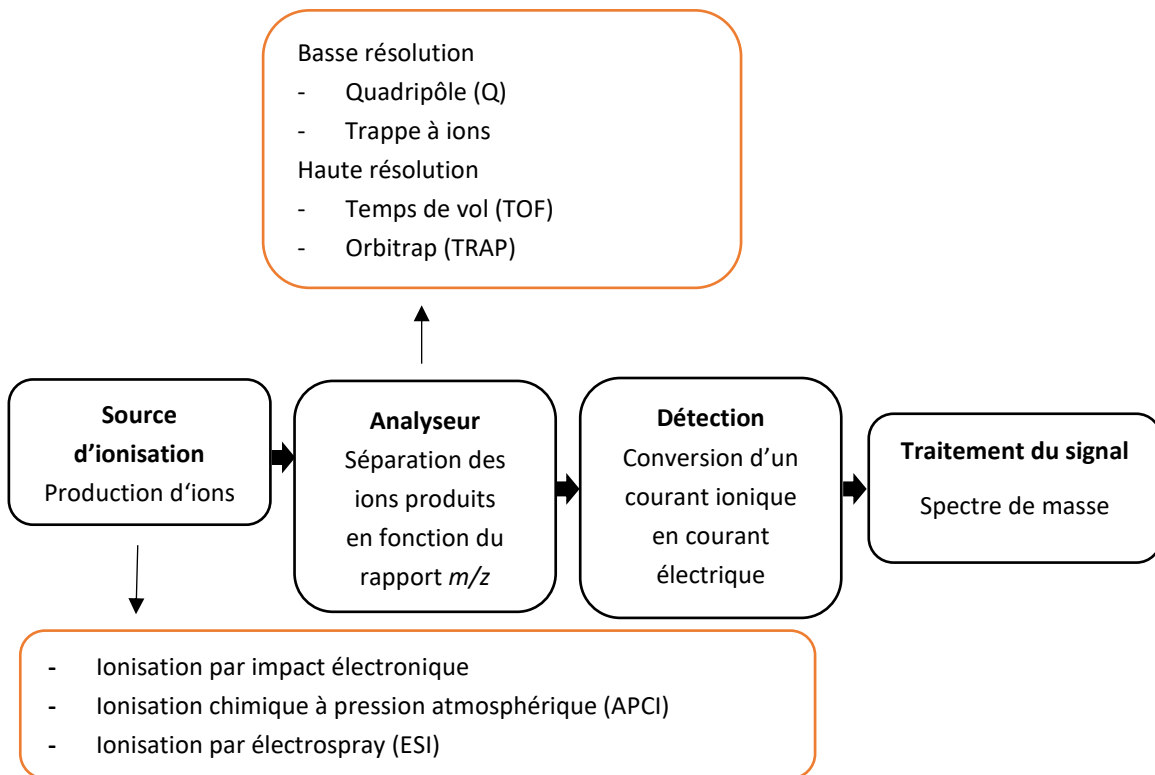
Dans la présente thèse, la composition des extraits de houblon a été étudiée sur la base des composés phénoliques prénylés majoritaires purifiés au laboratoire et identifiés par spectrométrie de masse haute résolution (HR-SM) et par résonance magnétique nucléaire (RMN). Néanmoins, il est également possible de caractériser des extraits, ou au moins d'émettre des hypothèses sur la présence de certains composés, sans passer par une phase de purification. On parle alors de déréplication.

#### **Déréplication et quantification par différentes techniques de couplage**

Diverses techniques analytiques ont été utilisées dans la littérature, pour identifier les composés du houblon. La caractérisation d'extraits, sans purification préalable est plus ou moins difficile, en fonction de la nature de l'extrait à analyser. Généralement, les extraits riches sont préalablement fractionnés pour être rendus moins complexes. Des techniques de chromatographies liquides (CL), telles que la chromatographie liquide haute performance (CLHP) et la chromatographie liquide ultra-haute performance (CLUHP) ; ou de chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour les huiles essentielles ; peuvent être couplées à plusieurs types de détecteurs : UV, SM, ou RMN. Ces derniers peuvent être seuls ou associés en série, on parle alors de techniques de couplage, pour regrouper un panel de données plus large. Ces méthodes analytiques peuvent aussi être employées pour quantifier les différents métabolites dans les extraits de la plante. Pour le houblon, la plupart des études utilisent la CL-SM ou éventuellement la CL-SM/SM. La **figure 17** montre les différentes parties d'un spectromètre de masse (Menet, 2011).

Pour les composés plutôt polaires du houblon, la méthode d'ionisation la plus utilisée en masse semble être l'électrospray (ESI). Il s'agit de la dispersion d'un liquide sous forme de gouttelettes chargées électriquement. Cette méthode est en effet utilisée pour analyser des matrices contenant des petites molécules non volatiles. Plusieurs composés ont été identifiés dans le houblon grâce à ce mode d'ionisation. Sagesser et Deinzer (1996) ont par exemple mis en évidence la présence de nombreux hétérosides de flavonols chez le houblon, à partir d'une fraction de cônes soluble dans l'eau, après séparation par CLHP en phase inverse. La CLUHP couplée à un détecteur de masse de type quadripôle-temps de vol (Q-TOF) avec pour mode d'ionisation l'ESI, a également permis à Luzak et al. (2016) d'identifier des flavonols libres et sous forme d'hétérosides, ainsi que des proanthocyanidines et des acides phénols dans un extrait de cônes obtenu par CO<sub>2</sub> supercritique. Concernant les composés plus apolaires, Kao et Wu (2013) ont séparé et identifié des flavonoïdes prénylés et certains acides amers du houblon retrouvés dans la bière, à partir d'un extrait éthanolique. Pour cela, des analyses en CLHP couplée à un détecteur UV à barrette de diodes (DAD) et à un détecteur de masse de type quadripôle avec comme source d'ionisation, l'ionisation chimique à pression

atmosphérique (APCI), ont été effectuées (Kao et Wu, 2013). Intelmann et al. (2009) ont également identifié de nombreux composés phénoliques dans un extrait alcoolique de houblon, incluant des dérivés minoritaires d'acides amers, par le biais d'analyses plus précises par CL-SM/SM avec un détecteur de type quadripôle couplé à un orbitrap (Q-TRAP) et l'ESI en source d'ionisation. Avec ce même type d'appareillage, des dérivés d'acides  $\beta$  ainsi que des produits de dégradation de ces derniers (hulupones) ont été identifiés dans une fraction de houblon enrichie obtenue après traitement thermique (Dusek et al., 2014). Concernant la caractérisation de l'huile essentielle de houblon, des analyses en CPG-SM utilisant un quadripôle pour la détection de masse semble suffisant (Nickerson et al., 1988 ; Aberl et Coelhan, 2012). Par ailleurs, les détecteurs de masse haute résolution permettent bien sûr d'obtenir la masse exacte de nos produits purifiés et d'en déduire leur formule brute. La RMN mono- et bi-dimensionnelle complétera l'identification structurale de nos produits.



**Figure 17.** Schéma de fonctionnement d'un spectromètre de masse avec quelques exemples de sources d'ionisation et d'analyseurs d'après Menet (2011)

La RMN a par contre été employée plus rarement pour la déréplication et la quantification des composés du houblon. Elle a tout de même permis l'identification et la quantification de certains composés phénoliques, tels que des hétérosides de flavonols, des acides amers ainsi que des terpènes dans plusieurs extraits complexes provenant de différents cultivars de houblon (Frag et al., 2012). Koning et al. (1998) ont identifié un certain nombre d'acides amers par chromatographie liquide couplée à la RMN dans un extrait de cônes de houblon obtenu par CO<sub>2</sub> supercritique, dont les acides

gras et les cires avaient préalablement été éliminées par précipitation au MeOH. Dans une moindre mesure, la RMN peut être utilisée pour étudier la stabilité d'un produit en solution dans plusieurs conditions, et pour quantifier les ratios d'isomères éventuellement formés spontanément après solubilisation dans divers solvants deutérés, ou suite à l'envoi d'un flux de gaz par exemple, comme cela a été le cas pour le DMX (Chen et al., 2009).

Une méthode d'électrochimie appelée « square-wave adsorptive-stripping voltammetry » a également été utilisée pour quantifier le XN dans des extraits de houblon. Cette méthode est basée sur la voltampérométrie, ou la mesure d'un flux de courant résultant de la transformation chimique de composés en solution, sous l'effet d'une différence de potentiel induite entre deux électrodes. Les limites de détection et de quantification étant cinq fois plus basses avec cette méthode, celle-ci serait plus sensible que la CLHP-UV pour doser les produits du houblon (Moreira et al., 2011).

### **Purification des composés phénoliques du houblon**

Diverses techniques ont été utilisées pour purifier les composés du houblon. Des méthodes de chromatographie solide/liquide sont par exemple décrites dans la littérature. Magalhães et al. (2009) ont purifié des acides phénols, des flavonols et des flavanols après séparation sur une matrice de polyvinylpyrrolidone. Il s'agit d'un polymère organique ayant la capacité d'adsorber les polyphénols avec une affinité croissante à mesure que le nombre de fonctions phénols augmente. Ortega et al. (2016) ont isolé le XN par le biais d'une chromatographie par fluide supercritique avec une phase stationnaire en phase inverse, à partir d'un extrait enrichi en XN. Ces méthodes de chromatographie sur colonne peuvent également être couplées à des techniques de chromatographie liquide/liquide, comme l'ont fait Tanaka et al. (2014) en combinant la CLHP préparative en phase inverse et la chromatographie à contre-courant (CCC), leur permettant ainsi de purifier 39 composés à partir d'un extrait commercial de houblon riche en composés phénoliques.

Au cours de ce projet, les composés phénoliques prénylés du houblon ont principalement été obtenus par une technique de chromatographie liquide/liquide, la CPC, une attention particulière est donc portée sur l'utilisation de techniques similaires pour purifier les composés du houblon. Néanmoins, il a été constaté que la plupart des publications retrouvées dans la littérature datent de plusieurs années. La purification de certains métabolites est délicate.

Parmi les composés phénoliques prénylés, des flavonoïdes ont déjà été isolés par CPC. Cette dernière est une technique de chromatographie sans support solide, où les phases mobiles et stationnaires sont liquides. Elle est basée sur le principe de la CCC. À la différence que la phase stationnaire est maintenue immobile par le biais d'une force centrifuge constante. La séparation des composés se base sur la différence d'affinité



entre les deux phases du système. Le principe de cet appareil est présenté en détails dans la partie 6.3.1. Le XN étant le flavonoïde majoritaire des cônes de houblon, c'est avec lui que la plupart des essais ont été effectués. À partir d'un extrait éthanolique complexe, Renault et al. (2006) ont séparé le XN des autres composés grâce au système quaternaire Heptane/Toluène/Acétone/H<sub>2</sub>O. Une méthode appelée CCC à grande vitesse (high speed counter-current chromatography en anglais) a également permis d'isoler le XN. C'est une technique hydrodynamique proche de la CPC car elle implique une force centrifuge. Grâce à cette dernière, Chen et al. (2012) ont obtenu le XN avec une pureté supérieure à 95% avec un système Arizona composé d'Hexane/AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O.

Les premières tentatives de purification des acylphloroglucinolins ont montré que, par une méthode liquide/liquide, la proximité de polarité entre les acides  $\alpha$  et  $\beta$ , était un frein pour une séparation optimale des différents dérivés présents dans la plante. Fischer et al. (1991) conseillaient de ne pas travailler avec des systèmes de solvants aqueux, à cause de la faible solubilité de ces composés dans l'eau. Ils ont utilisé un système de solvants ternaire composé d'Hexane/ACN/Éther de méthyl-*tert*-tiobutyle (MTBe), qui leur a permis de séparer certains acides  $\alpha$  avec un taux de purification de 80 à 90%. Ces auteurs ont émis l'idée de travailler avec des systèmes tamponnés, dans le but d'ajouter un paramètre discriminant supplémentaire entre les acides  $\alpha$  et  $\beta$  : le pKa. En suivant ce principe, d'autres auteurs ont réussi à séparer les acides  $\alpha$  et  $\beta$  majoritaires (dérivés *n*-, *co*-, *ad*-) par CPC avec deux méthodes distinctes, adaptées à chaque groupe (Hermans-Lokkerbol et Verpoorte, 1994a ; Hermans-Lokkerbol et al., 1997). C'est également le cas de Todd et Guzinski (1990) qui ont d'abord écarté les acides  $\alpha$  d'un extrait de houblon pour ensuite pouvoir purifier les acides  $\beta$  en jouant sur les rapports de pH des différentes phases. Ces publications montrent la nécessité de séparer les acides  $\alpha$  des  $\beta$  avant de pouvoir isoler les différents dérivés/isomères de chaque groupe.

Certaines études traitent de l'isolement des produits d'intérêt brassicole, les acides iso- $\alpha$ , qui ont un intérêt économique. Les premières publications utilisent des techniques de chromatographie solide/liquide, comme la CLHP préparative. Hughes (1996) a séparé les isomères *cis*- et *trans*- d'acides iso- $\alpha$  sur une phase inverse. Il a utilisé une phase mobile composée d'EtOH/H<sub>2</sub>O/Acide acétique glacial. Les études plus récentes utilisent des techniques de chromatographie liquide/liquide. Dahlberg et al. (2012) ont séparé les différents isomères *cis*- et *trans*- d'acides iso- $\alpha$ , par une technique de CCC en deux étapes, impliquant d'abord un système biphasique avec de l'hexane et une eau tamponnée ; puis avec un système quaternaire. La CCC est une technique hydrodynamique au sein de laquelle deux axes de rotations sont impliquées dans l'immobilisation des phases, contrairement à la CPC où seule la rotation du rotor est responsable de la force centrifuge.

## 2.3. Utilisation du houblon dans la bière

On dit que « la bière est plus ancienne que l'idée même de la civilisation ». La première trace écrite daterait de 4000 ans avant Jésus-Christ (Martorana, 2010). Relativement à cela, l'utilisation de houblon dans la bière est plutôt récente, elle daterait du Moyen-Âge. Le premier brassage avec du houblon date de l'an 822, il aurait été réalisé par des moines Français en Picardie (Bois, 1996). Entre le XI<sup>ème</sup> et le XII<sup>ème</sup> siècle, Hildegard von Bingen, bénédictine et herboriste Allemande, note l'intérêt du houblon dans la bière : « son amertume repousse la décomposition des boissons et augmente la durée de conservation » (von Bingen, 2005). C'est à cette période que les cultures de houblon ont commencé. Son utilisation dans la bière est alors devenue incontournable.

### 2.3.1. La place du houblon dans le processus de fabrication de la bière

La **figure 18** montre le processus de fabrication général de la bière.

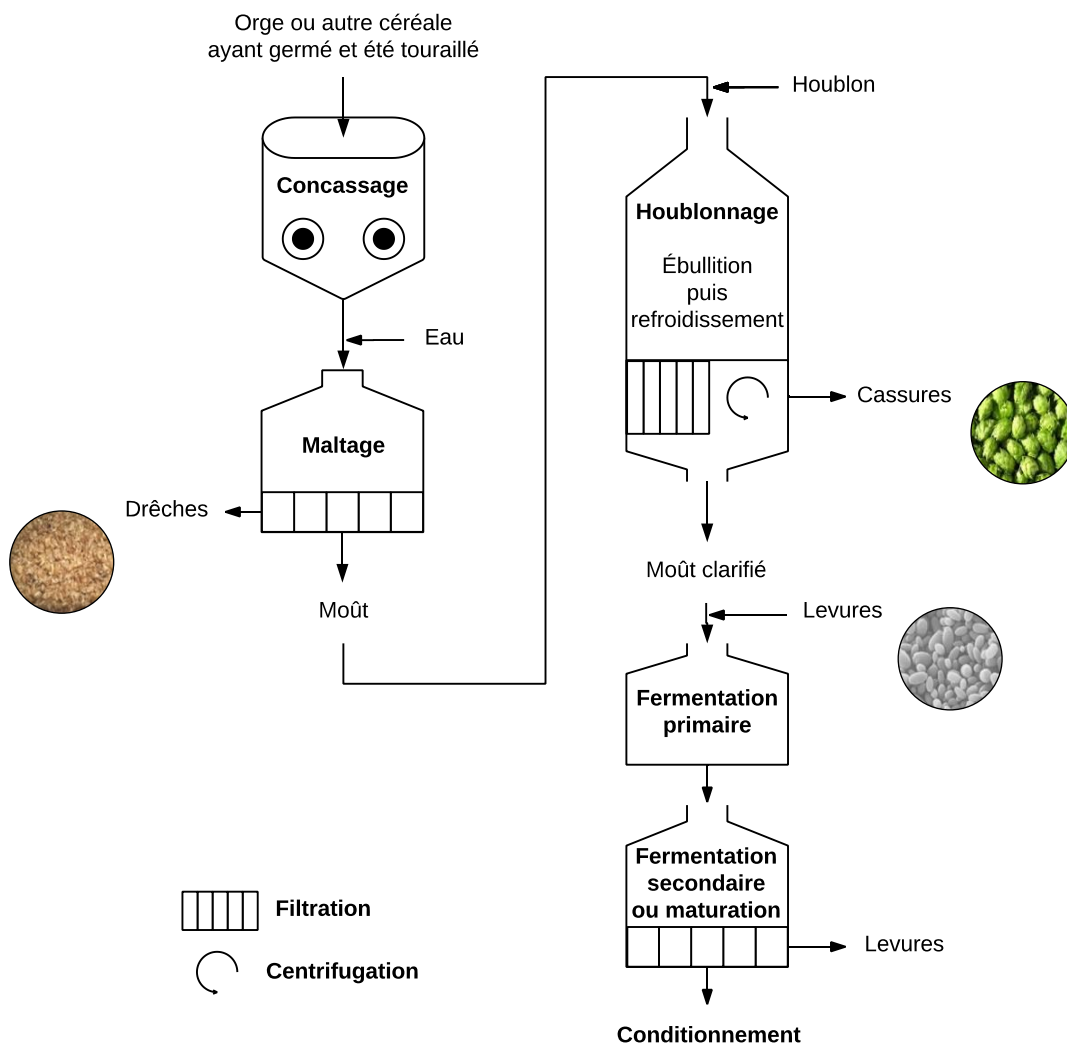


Figure 18. Processus général de fabrication de la bière, schéma inspiré de [www.brassieurs-de-france.com](http://www.brassieurs-de-france.com)

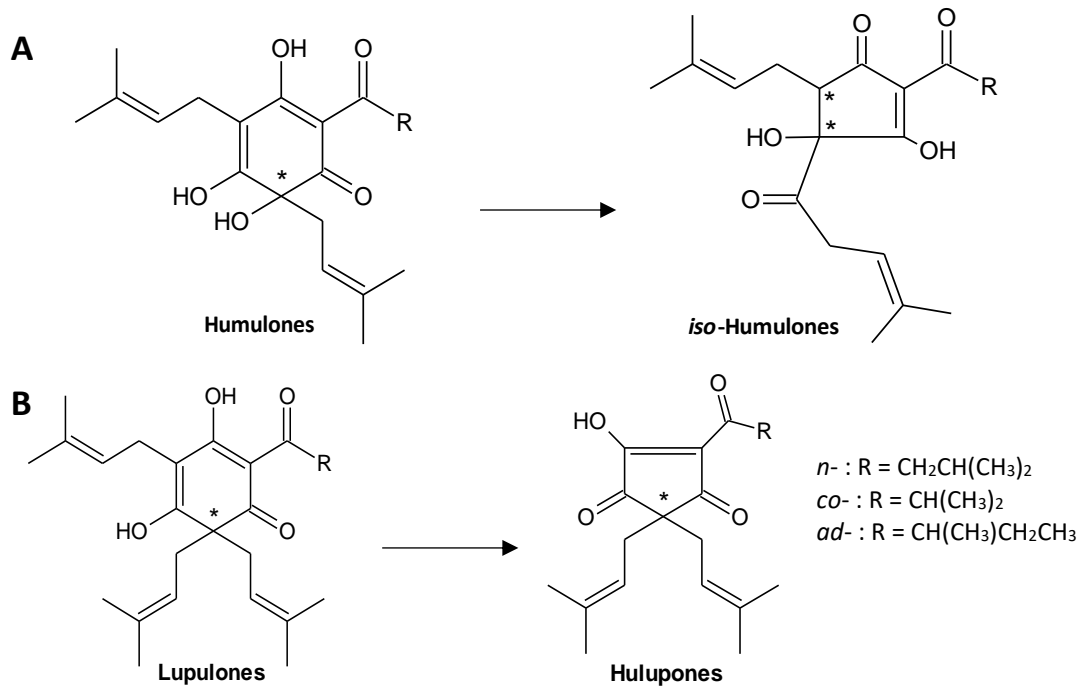
Le houblon est un ingrédient mineur du processus de fabrication de la bière, entre 100 et 200 g sont utilisés pour 100 L d'eau, mais son impact sur la qualité et le goût de la bière est majeur. À titre de comparaison, 19 kg de malt sont nécessaires pour obtenir une bière à 5° d'alcool. Le houblon peut être utilisé sous diverses formes : des pellets, ce sont des cônes secs ayant été moulus et comprimés en bâtonnets ; des cônes séchés non comprimés, ou des extraits alcooliques. Lorsqu'il est introduit dans le processus de brassage, le moût est porté à ébullition pendant une à deux heures, avant d'être refroidit, c'est l'étape d'houblonnage (**Fig. 18**).

Les métabolites secondaires du houblon confèrent une certaine amertume, des arômes et un pouvoir antiseptique. Ils aideraient également à stabiliser la mousse de la bière. La composition chimique du houblon est donc cruciale selon le type de bière souhaité. D'un point de vue organoleptique, les composés d'intérêt sont les terpènes, les acides amers et les flavonoïdes.

### 2.3.2. *Devenir des composés d'intérêt dans la bière*

Les composés les plus recherchés dans le houblon sont les acides amers et plus spécifiquement les acides  $\alpha$  (humulone et dérivés). Ils sont un critère discriminant des variétés de houblon. Les variétés « aromatiques » comptent entre 3 et 4% d'acides  $\alpha$ , alors que les variétés « amères » possèdent au moins 8% et jusqu'à 15% d'acides  $\alpha$  (Jelinek et al., 2010). Après ajout du houblon et pendant l'ébullition du moût, les acides  $\alpha$  sont isomérisés en des composés plus amers et solubles dans l'eau : les acides iso- $\alpha$  ou dérivés d'iso-humulones. Ils sont majoritairement représentés par les *n-iso*-humulone, *co-iso*-humulone et *ad-iso*-humulone (**Fig. 19A**). Ils seraient également présents sous forme de traces dans le houblon. Les *iso*-humulones possèderaient des effets intéressants sur la santé humaine, notamment anti-inflammatoires. Ils permettraient également de lutter contre l'obésité (Bland et al., 2015). Cependant, leur biodisponibilité semble faible, elle est inférieure à 15% d'après Cattoor et al. (2011). Dans la bière, on en compte entre 8 et 41 mg.L<sup>-1</sup> selon les cultivars utilisés (Oladokun et al., 2016).

Dans une moindre mesure, les acides  $\beta$  participeraient également à l'amertume de la bière par leur transformation en dérivés d'hulupones (**Fig. 19B**) (Spetsig et Steninger, 1960 ; Almaguer et al., 2014).



**Figure 19.** Transformation des acides  $\alpha$  et des acides  $\beta$  au cours du processus de fabrication de la bière ; les étoiles montrent les carbones asymétriques.

Concernant les autres classes de composés phénoliques, seules des traces de XN ont été retrouvées dans la bière, sa concentration ne dépasse pas 1 mg.L<sup>-1</sup> (Stevens et al., 1999 ; Karabín et al., 2013). Pendant l'ébullition du moût, entre 50 et 75% de XN est isomérisé en IXN, qui se retrouve dans la bière à des teneurs variables : 0,1 à 3,4 mg.L<sup>-1</sup>. Le DMX est quant à lui transformé en 6- ou 8-PN présents dans la bière à des concentrations de l'ordre de 0,6 et 0,2 mg.L<sup>-1</sup> (Schmandke, 2010 ; Sandoval-Ramírez et al., 2017). Les flavanols de la bière comme la catéchine et l'épicatéchine proviennent à la fois du malt (céréales) et du houblon. Ils induisent l'astringence de la bière (Collin et al., 2013). D'un point de vue économique, la quantité totale de flavonoïdes dans le houblon doit être proche de 5 g pour 100 g de cônes secs (Karabín et al., 2015). Les acides phénols confèreraient des arômes. Certains dérivés d'acides hydroxycinnamiques et hydroxy-benzoïques sont partiellement retrouvés dans la bière, une autre partie peut être cyclisée et/ou décarboxylée (Collin et al., 2013). Concernant les stilbènes du houblon, le *trans*-resvératrol est dégradé à des températures élevées. Le *trans*-picéide est plus stable à la chaleur donc il n'est pas transformé pendant l'ébullition du moût. En revanche, il serait tout de même converti en resvératrol un peu plus tard dans le processus, par les levures (Collin et al., 2013).

L'huile essentielle du houblon participe également à la saveur de la bière, elle confère ses arômes. Néanmoins, la plupart de ces composés sont évaporés pendant l'ébullition du moût. Leur présence dans la bière dépend de leur vitesse d'évaporation et du processus de fabrication (ébullition plus ou moins longue). Les sesquiterpènes ont

généralement un point de fusion plus élevé que les monoterpènes. Après l'ébullition, on estime que 85 à 95% de l'huile essentielle est évaporée. Parmi les 5 à 15% restants, une partie serait adsorbée par les levures et retenus lors de la dernière filtration avant conditionnement. Une très petite quantité de celle-ci est donc retrouvée dans la bière à la fin du processus (Almaguer et al., 2014). Certains composés majoritaires comme le  $\beta$ -myrcène et l' $\alpha$ -humulène ont toutefois été identifiés dans certaines bières (Dresel et al., 2013). La technique de « houblonnage à cru » s'est beaucoup développée ces dernières années, elle permet d'éviter l'évaporation de l'huile essentielle. En effet, le houblon est ajouté au même moment que les levures et n'est pas chauffé. Les arômes de la bière sont décuplés car certains composés de l'huile essentielle ne sont pas évaporés et sont ainsi retrouvés dans la bière. En revanche pendant le houblonnage à cru, les acides  $\alpha$  ne se solubilisent pas dans la bière et restent dans le houblon résiduel. C'est pour cela que cette méthode est bien souvent effectuée en complément du houblonnage classique (Oladokun et al., 2017).

### 2.3.3. Les sous-produits brassicoles

À la fin du processus de fabrication de la bière, plusieurs sous-produits sont obtenus. Ils sont présentés dans les bulles de la **figure 18**.

- Les premiers sous-produits sont les drêches qui proviennent du malt. Elles constituent le sous-produit le plus abondant avec 85% des sous-produits totaux. Les drêches sont principalement composées de protéines, de cellulose et de minéraux, elles sont valorisées à travers l'alimentation animale (Aliyu et Bala, 2011). L'incorporation de drêches à des aliments tels que la farine de blé, d'amidon ou de maïs, permettrait d'augmenter leur teneur en protéines et leur densité, mais également la quantité d'acide phytique, qui inhibe l'absorption de certains minéraux (Stojceska et al., 2008). L'entreprise américaine Regrained en a d'ailleurs créé des barres de céréales (Regrained Supergrain, [www.regrained.com](http://www.regrained.com)).
- Les cassures, également appelées « houblon épuisé », sont ensuite obtenues. Elles constituent environ 85% de la masse de houblon ajoutée, qui, malgré l'étape d'houblonnage, ne se solubiliseront pas dans l'eau qui deviendra la bière. Les cassures peuvent être seules ou mélangées à la drêche selon le processus de fabrication. Elles sont riches en fibres, en protéines, en acides aminés essentiels et leur composition en métabolites secondaires serait proche du houblon initial (Kao, 2018). D'un point de vue nutritionnel, leur composition est intéressante mais l'amertume causée par les acylphloroglucinols encore présents, limite leur utilisation dans l'alimentation. Une fermentation de quelques jours par *Candida parapsilosis*, qui est capable de dégrader ces composés, permettrait d'atténuer ce goût amer (Huszczka et Bartmańska, 2008). Grâce à leur forte teneur en azote, les cassures ont également un intérêt comme fertilisant, ce qui en fait l'axe de valorisation principal (Kao, 2018).

- Les levures sont récupérées en fin de processus. Elles sont le second sous-produit le plus abondant en termes de quantité, avec 10% des sous-produits totaux. Sa composition dépend du type de levures présentes. Généralement, les constituants majeurs sont des protéines, des vitamines et des sucres. Après avoir été séchées, elles sont utilisées en complément de l'alimentation humaine et animale (Kao, 2018).

## 2.4. Utilisation du houblon en santé et propriétés biologiques associées

### 2.4.1. Activités antimicrobiennes

L'activité antibactérienne des cônes de houblon envers les souches à Gram positif est connue depuis de nombreuses années. Le houblon a en revanche peu d'effet sur les souches à Gram négatif (Schmalreck et Teuber, 1975 ; Mizobuchi et Sato, 1985). Le potentiel antibactérien serait, en partie, lié à la présence de composés phénoliques prénylés. Des extraits riches en huiles essentielles semblent moins actifs que des extraits riches en dérivés prénylés d'acylphloroglucinols (Karabín et al., 2016). Néanmoins, une activité modérée de l'huile essentielle a été décelée sur des bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli* et *Yersinia enterocolitica* (Langezaal et al., 1992 ; Jirovetz et al., 2006 ; Akdemir, 2015). La sélectivité d'action des extraits de houblon envers les bactéries à Gram positif impliquées dans les infections humaines regroupe un spectre assez large avec des souches de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, ainsi que des souches de *Streptomyces* et de *Mycobacterium* (Schmalreck et Teuber, 1975 ; Bhattacharya et al., 2003 ; Gerhäuser, 2005a). Certains auteurs ont montré l'efficacité du houblon vis-à-vis de bactéries pathogènes retrouvées dans les industries agro-alimentaires comme des souches de *Clostridium* et de *Listeria monocytogenes* (Johnson et Gerhard, 2001 ; Sansawat et al., 2016 ; Cermak et al., 2017). Le houblon permet également d'agir sur certains contaminants de la bière tels que *Lactobacillus* et *Pediococcus* (Sakamoto et Konings, 2003). A l'inverse, il n'est pas actif contre les levures de type *Saccharomyces* (Schmalreck et Teuber, 1975).

Plusieurs composés issus des cônes femelles de houblon ont été isolés et testés sur différentes souches de bactéries. L'effet est variable selon le type de microorganismes. Parmi les composés recensés comme étant responsables de l'activité antibactérienne, on retrouve les dérivés prénylés d'acylphloroglucinols (acides  $\alpha$  et  $\beta$ ). Ce potentiel augmente avec leur degré d'hydrophobicité et la taille de leur chaîne carbonée, qui permet alors une interaction plus facile avec la membrane des cellules. Il est admis que les dérivés de la lupulone sont plus actifs que les dérivés de l'humulone (Larson et al., 1996). Leur efficacité serait donc décroissante comme suit : acides  $\beta$  (lupulone et dérivés) > acides  $\alpha$  (humulone et dérivés) > acides iso- $\alpha$  (iso-humulone et dérivés) (Larson et al., 1996 ; Karabín et al., 2016). Par exemple, Mizobuchi et Sato (1985) ont

montré qu'un mélange d'acides  $\beta$  est deux fois plus actif qu'un mélange d'acides  $\alpha$  avec des CMI de 3,13 et 6,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  envers *S. aureus*, respectivement. Simpson et Smith (1992) ont montré que l'activité de ces derniers augmente avec la diminution du pH, comme c'est le cas sur *Lactobacillus brevis*. La CMI de l'humulone est par exemple divisée par deux lorsqu'on passe d'un pH 7 à un pH 4 (Simpson et Smith, 1992). Ce phénomène n'a pas été retrouvé envers des souches de *Streptococcus mutans* (Bhattacharya et al., 2003). Une étude *in vivo* montre que lorsque la lupulone est utilisée comme potentiel facteur de croissance, à 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  dans l'eau de boissons de poulets d'élevages, elle diminue significativement la population de *Clostridium perfringens*, incluant des espèces pathogènes, et de certains *Lactobacillus* (Tillman et al., 2011). L'activité anti-*Clostridium perfringens* de la lupulone avait également été démontrée par Siragusa et al. (2008).

Parmi les flavonoïdes, le XN possède lui aussi un large spectre anti-infectieux et une activité intéressante en particulier vis-à-vis de souches de *Staphylococcus* et de *Streptococcus* (Gerhäuser, 2005a ; Yamaguchi et al., 2009). Il serait capable d'interagir avec les membranes bactériennes. Il est admis que le XN est moins actif que la lupulone (Gerhäuser, 2005a). Dans une moindre mesure, la 6-PN serait également impliquée dans l'activité antibactérienne des cônes femelles de houblon (Mizobuchi et Sato, 1985). Le mode d'action de ces molécules est encore inconnu. Une piste a été avancée au cours d'une étude sur des staphylocoques, le développement bactérien pourrait être ralenti par l'inhibition de la formation du biofilm (Rozalski et al., 2013).

Le potentiel antibactérien des feuilles de houblon a également été évalué contre des souches de *S. aureus* et comparé à celui des cônes femelles. Les feuilles présentent un effet modéré avec une CMI de l'ordre de 0,3  $\text{mg.mL}^{-1}$  contre 0,003  $\text{mg.mL}^{-1}$  pour les cônes (Abram et al., 2015).

Concernant le potentiel antifongique, l'huile essentielle de houblon ainsi que des extraits de cônes femelles ont montré une activité envers des souches de champignons pathogènes de l'Homme. Le XN et la 6-PN se sont montrés être de puissants antifongiques vis-à-vis des dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* et *T. rubrum* avec une CMI de 3,13  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Ils sont également actifs contre *Mucor rouxianus* avec une CMI de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  alors qu'ils ont une faible activité contre des souches de *Fusarium* et de *Candida albicans*, contrairement aux acylphloroglucinols (Langezaal et al., 1992 ; Gerhäuser, 2005).

Le houblon a également fait l'objet d'études antivirales. Les acides iso- $\alpha$  et le XN seraient impliqués dans ce potentiel. Ils ont montré une activité modérée contre le virus de l'hépatite C et certains virus de l'herpès, contrairement aux acides  $\beta$  qui se sont avérés inactifs (Buckwold et al., 2004). Le XN diminue significativement la quantité d'ARN présents dans le virus à partir de 1,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Lou et al., 2014). Le virus de la

diarrhée virale bovine est également sensible au XN avec une concentration inhibant 50% de la viabilité cellulaire (CI<sub>50</sub>) de 1,4 µg.mL<sup>-1</sup>. A titre comparatif, les acides iso-α sont bien moins efficaces contre ce virus (CI<sub>50</sub> >50 µg.mL<sup>-1</sup>). L'activité inhibitrice de ce composé sur les effets cytotoxiques et les taux d'ARN viral serait plus fort que la ribavirine, un analogue nucléosidique de synthèse à large spectre antiviral, mais plus faible que celle de l'interféron-α qui est un antiviral largement utilisé pour lutter contre les hépatites (Zhang et al., 2009). De plus, le XN agirait en coaction avec l'interféron α (Zhang et al., 2010). Les propriétés antivirales du XN ont été confirmées vis-à-vis du virus de l'immunodéficience humaine en inhibant les effets cytotoxiques induits par le virus à partir de 0,82 µg.mL<sup>-1</sup> (Wang et al., 2004).

Le XN a également déjà montré des effets antiparasitaires. Il est efficace contre *Plasmodium falciparum*, montrant des CI<sub>50</sub> de 2,9 à 8,5 µg.mL<sup>-1</sup> pour des souches sensibles à multi-résistantes (Frölich et al., 2005). Cette activité a préalablement été démontrée par Srinivasan et al. (2004) et Herath et al. (2003). Le XN est également actif envers diverses espèces de *Leishmania*, avec une CI<sub>50</sub> d'environ 2,5 µg.mL<sup>-1</sup> (Monzote et al., 2017).

Aucune donnée n'est en revanche disponible dans la littérature, sur d'éventuels tests antimicrobiens des tiges ou des rhizomes de houblon.

#### 2.4.2. Activités sédatives

Depuis plusieurs siècles, le houblon est utilisé pour ses propriétés apaisantes. Ces effets constituent aujourd'hui l'utilisation reconnue du houblon en phytothérapie (European Medicines Agency, 2014). L'HMPC (Herbal Medicinal Products Committed) a publié une monographie préconisant le houblon pour lutter contre les stress mineurs et pour favoriser le sommeil. Il peut être utilisé sous forme d'infusions de cônes, ou en poudre dans des gélules en vue d'une administration orale. Le **tableau 2** montre les doses recommandées par l'HMPC (European Medicines Agency, 2014).

**Tableau 2.** Posologie et méthode d'administration du houblon, *Humulus lupulus* en fonction du type d'effet souhaité, données pour des personnes de plus de 12 ans (HMPC)

Types d'utilisations	Pour lutter contre le stress	Pour aider à dormir
En infusion à partir de cônes	500 mg dans 150-200 mL d'eau bouillante, 4 fois par jour	500-1000 mg dans 150-200 mL d'eau bouillante, 30-60 minutes avant d'aller dormir
En poudre (gélules)	400 mg, 2 fois par jour (adultes) 200 mg, 2 fois par jour (adolescents)	800-2000 mg, 30-60 minutes avant de dormir
Extrait sec (extraction à l'éthanol 50%)	125 mg, 2 à 3 fois par jour	125-250 mg, 60 minutes avant de dormir



Les premières investigations datent de 1967 par Hänsel et Wagener, mais celles-ci n'ont pas permis de mettre en évidence quelconque effet sédatif ou hypnotique. Ce n'est que quelques années plus tard que des scientifiques espagnols ont pu prouver cette activité, observant une diminution de l'activité motrice de souris lorsque des extraits de houblon étaient injectés par voie intra-péritonéale (Bravo et al., 1974). L'intensité de l'activité s'est révélée différente selon le solvant utilisé pour l'extraction. Les composés extraits avec de l'éther semblaient être plus actifs que les fractions aqueuses et alcooliques (Zanoli et Zavatti, 2008). Le 2-méthyl-3-butène-2-ol, a été identifié par Hänsel et al. (1982) comme le composé principalement responsable de cette d'activité. Il provient de la dégradation des acylphloroglucinols du houblon lorsque celui-ci est stocké à température ambiante. Les acides amers jouent également un rôle dans l'activité sédatrice du houblon, et plus particulièrement les acides  $\alpha$  qui possèdent un effet semblable à celui d'un antidépresseur (Zanoli et al., 2005). Le houblon pourrait agir au niveau des récepteurs de la mélatonine, hormone du sommeil ; ainsi que de la sérotonine, qui jouent un rôle dans l'inhibition de l'agressivité, le rapport à la souffrance et la dépression (Abourashed et al., 2004).

#### 2.4.3. Activités antioxydantes

Les activités antioxydantes sont principalement corrélées aux flavonoïdes. Les flavonoïdes non prénylés comme le kaempférol, la quercétine et la rutine sont connus pour leur capacité à piéger les radicaux libres (Stevens et Page, 2004). *In vitro*, le XN inhibe l'oxydation des lipoprotéines de basse densité à partir de  $1,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Le DMX présente également une activité antioxydante mais celle-ci est inférieure (Miranda et al., 2000). Un potentiel antioxydant intéressant a été décelé pour certains acides amers, celui-ci serait supérieur à celui du XN (Yamaguchi et al., 2009). Une étude réalisée *in vivo* a pu mettre en évidence la capacité d'un acide iso- $\alpha$  à inhiber les dommages causés par un stress oxydatif dans des reins de rats (Van Cleemput et al., 2009).

Récemment, un extrait acétate d'éthyle de feuilles de *Humulus japonicus* a montré une activité antioxydante avec une  $\text{CI}_{50}$  de l'ordre de  $0,32 \text{ mg.mL}^{-1}$ , contre  $1,99 \text{ mg.mL}^{-1}$  pour les tiges et  $0,68 \text{ mg.mL}^{-1}$  pour les rhizomes. Ce potentiel est corrélé avec la quantité de polyphénols totaux qui est supérieur dans les feuilles, par rapport aux tiges et aux rhizomes (Choi et al., 2018).

#### 2.4.4. Activités anti-inflammatoires

L'inflammation se produit lors de la dégradation ou le dysfonctionnement d'un tissu. Les composés phénoliques anti-inflammatoires ont généralement un mode d'action tourné vers le facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B), qui régule l'inflammation en induisant l'expression de gènes pro-inflammatoires codant par exemple pour des kinases, les

cyclooxygénases 1 et 2 (COX-1 et -2), des interleukines, ou encore le facteur de nécrose tumorale (TNF). Le houblon a beaucoup été étudié pour son pouvoir anti-inflammatoire. L'humulone a été identifiée comme étant le composé en partie responsable de cette activité. Il est efficace dans le traitement de l'œdème de l'oreille chez la souris à 0,2 mg par oreille (Yasukawa et al., 1993). L'humulone régulerait certaines kinases impliquées dans la réponse inflammatoire (Van Cleemput et al., 2009). Elle inhiberait également l'expression de COX-2 induite spécifiquement par le TNF sur une lignée d'ostéoblastes (MC3T3-E1) avec une  $CI_{50}$  à  $10,9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Yamamoto et al., 2000). Diverses études ont également pu démontrer l'activité anti-inflammatoire des dérivés d'acides iso- $\alpha$  (Nozawa et al., 2005). Concernant les flavonoïdes, l'IXN, le XN et la 8-PN ont également déjà montré un potentiel anti-inflammatoire *in vitro* (Negrão et al., 2013 ; Bartmańska et al., 2013).

#### 2.4.5. Activités œstrogéniques

La présence de phyto-œstrogènes chez le houblon a été suggérée pour la première fois en 1953 par Koch et Heim. Pendant longtemps, le pouvoir œstrogénique du houblon a été controversé, certains auteurs ne pouvant pas démontrer cette activité. Finalement, la 8-PN a été identifiée comme la molécule responsable de l'activité. Elle a été caractérisée pour la première fois par Milligan et al. en 1999. Son activité semble plus puissante que la plupart des phyto-œstrogènes connus. Des études *in vitro* ont montré sa capacité à interagir avec des récepteurs aux œstrogènes (Zanoli et Zavatti, 2008). Elle présente une forte affinité de liaison avec les récepteurs aux œstrogènes, entraînant 50% d'interaction à  $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Des expérimentations *in vivo* et des études cliniques ont par la suite confirmé son activité et son innocuité (Milligan et al., 1999 ; Van Breemen et al., 2014). Contrairement à la 8-PN, la 6-PN ne possède qu'un faible effet œstrogénique (Milligan et al., 1999).

#### 2.4.6. Activités anti-oncogènes et anti-mutagènes

Certains composés phénoliques du houblon sont considérés comme des agents préventifs du cancer (Wang et al., 2004 ; Zanoli et Zavatti, 2008). Le XN serait capable d'inhiber l'activation métabolique, l'initiation et la progression des différents stades de la carcinogénèse (Stevens et Page, 2004). Il posséderait en plus, une activité anti-mutagène (Kac et al., 2008). Certains acylphloroglucinols pourraient aider à lutter contre certains cancers en induisant l'apoptose des cellules tumorales, ainsi qu'en inhibant l'angiogénèse qui joue un rôle clé dans le développement des tumeurs malignes (Van Cleemput et al., 2009). Mouratidis et al. (2013) ont mis en évidence le potentiel cytotoxique de la lupulone contre des cellules cancéreuses de la prostate. L'IXN et la 8-PN ont également montré une action anti-oncogène et anti-mutagène en réduisant la prolifération de cellules tumorales dans le colon (Allsopp et al., 2013).

#### 2.4.7. Autres activités biologiques

Des extraits aqueux de houblon seraient efficaces pour lutter contre l'obésité lorsqu'ils sont donnés en complément de l'alimentation chez la souris, ils ralentiraient la prise de poids et l'accumulation des lipides (Sumiyoshi et Kimura, 2013). Des polyphénols comme le XN, sont en effet connus pour améliorer le métabolisme des lipides et des sucres chez la souris (Nozawa, 2005). Ces propriétés ont été confirmées chez le rat par Legette et al. (2013). Le houblon permettrait donc de lutter contre le diabète de type-2. En effet, une alimentation supplémentée par du XN ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ou par de la 8-PN ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) permettrait de diminuer la glycémie, le taux de triglycérides et de cholestérol dans le sang, tout en augmentant la sensibilité à l'insuline (Costa et al., 2017). Des études *in vitro* et *in vivo* montrent que les acides iso- $\alpha$  ont également un intérêt dans la prévention de l'obésité (Shimura et al., 2005 ; Yajima et al., 2004 et 2005).

Le houblon et plus particulièrement ses composés phénoliques prénylés, auraient des effets neuro-protecteurs. À ce sujet, l'efficacité du XN, à la fois comme protecteur cellulaire et comme activateur de la différenciation des cellules neuronales, a été démontrée *in vitro* (Oberbauer et al., 2013). Il s'est avéré efficace dans le traitement d'une ischémie cérébrale et a permis de diminuer les déficits neuro-comportementaux chez le rat (Yen et al., 2012). Il a également permis d'atténuer les dommages cérébraux inflammatoires et apoptotiques liés à l'âge chez la souris (Rancán et al., 2017).

#### 2.4.8. Les métabolites secondaires : un rôle de défense *in planta* ?

Les composés cités précédemment présentent des activités biologiques variées. Il est admis que les métabolites secondaires végétaux ont un rôle *in planta*. Ils peuvent permettre de lutter contre les stress biotiques ou abiotiques. Les flavonoïdes sont par exemple connus pour leur rôle d'attraction ou de répulsif pour certains organismes. Ils sont notamment impliqués dans la tolérance au froid, aux rayonnements UV et à la sécheresse. Grâce à leur capacité à piéger les radicaux libres, ce sont de très bons antioxydants qui protègent la plante. Chez le houblon, il a déjà été démontré que la différenciation des trichomes, ainsi que le métabolisme des acides amers et des flavonoïdes prénylés pouvaient être perturbés après infection de la plante par un pathogène viral (Mishra et al., 2016). Il en est de même pour la biosynthèse des terpènes qui est stimulée suite à l'attaque d'un champignon (Progar et al., 2017). Ces données sont la preuve de l'implication des métabolites secondaires dans la défense du houblon. Néanmoins, il est encore difficile de déterminer leur rôle exact dans la plante. À ma connaissance, aucune donnée dans la littérature n'explique clairement le rôle des chalcones et des dérivés prénylés d'acylphloroglucinols dans les mécanismes de défense du houblon.

## 2.5. Biodisponibilité et toxicité du houblon et de ses métabolites

### 2.5.1. Toxicologie

Des allergies au houblon ont été décrites chez les agriculteurs. Elles peuvent se faire par contact direct, notamment pour ceux qui cueillaient les cônes à la main. Elles se manifestent par des dermatites ou autres problèmes de peau du type érythèmes (Spiewak et Dutkiewicz, 2002). Elles peuvent également survenir suite à l'inhalation de poudre des cônes, provoquant des symptômes similaires à l'asthme (Reeb-Whitaker et Bonauto, 2014). Le pollen du houblon est également allergène, principalement à cause de la présence de profiline, une protéine de 15 kDa (Jeong et al., 2013).

Le houblon est utilisé en phytothérapie pour ses effets bénéfiques sur la santé humaine (European Medicines Agency, 2014). De nombreuses études de toxicité ont été réalisées, à partir de préparations commerciales et de produits purifiés. La plupart des études de cytotoxicité *in vitro* disponibles dans la littérature sont effectuées sur des lignées cellulaires cancéreuses. Les lignées saines étant plus difficiles à cultiver en laboratoire, elles sont moins utilisées. Il peut donc être difficile d'extrapoler leur toxicité, ou leur non-toxicité, sur un organisme sain. Des études *in vivo* et des études cliniques ont également été réalisées afin de montrer l'innocuité du houblon à l'échelle du tissu, de l'organe ou de l'organisme, en voici quelques exemples.

Parmi les flavonoïdes du houblon, le XN est probablement celui qui présente le panel de propriétés biologiques le plus large. Certaines études montrent que sa toxicité sur cellules saines est inférieure à celle sur cellules cancéreuses, comme l'ont démontré Ho et al. (2008) sur des hépatocytes. Dorn et al. (2010) ont constaté un facteur 4 entre les doses toxiques sur hépatocytes cancéreux et sur hépatocytes sains. Les valeurs de  $CI_{50}$  retrouvées dans la littérature sont très variables, elles dépendent de la lignée étudiée, du test effectué ainsi que du temps de traitement. Pour le XN, des  $CI_{50}$  entre  $8,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$  et  $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ont été rapportées sur diverses lignées d'hépatocytes (Ho et al., 2008 ; Dorn et al., 2010). Jusqu'à  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , le XN ne semble pas inhiber les cellules de l'épithélium intestinal Caco-2. L'IXN induirait quant à lui 25% de mort cellulaire entre 10 et  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Machado et al., 2017). Concernant la toxicité *in vivo* du XN, une étude conduite sur des souris ayant un régime alimentaire supplémenté avec  $0,18 \text{ mg.mL}^{-1}$  de XN a montré l'absence d'effet néfaste sur les fonctions majeures de l'organisme. Aucune différence concernant le métabolisme des lipides, des protéines, des glucides et de l'acide urique n'a été observée (Vanhoecke et al., 2005). Des études *in vivo* ont également souligné l'innocuité d'environ 100 mg de XN par kg de masse corporelle chez des rats ; ainsi que de 1000 mg/kg chez des souris (Hussong et al., 2005 ; Dorn et al., 2010). Une étude clinique a également montré la non toxicité de la molécule en prise unique à 20, 60 ou 180 mg (Legette et al., 2014).

Les dérivés prénylés d'acylphloroglucinols ont quant à eux été moins étudiés. Certains acides amers comme la lupulone ont déjà montré des activités cytotoxiques envers des cellules cancéreuses. Les  $CI_{50}$  varient de 4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  envers des lignées cellulaires cancéreuses prostatiques, à 16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  pour des lignées cancéreuses du sein (Tyrrell et al., 2012 ; Mouratidis et al., 2013 ; Machado et al., 2017). La toxicité de ces composés ne semble pas avoir été déterminée sur des lignées saines.

Concernant des extraits complexes de houblon, ou de mélanges de produits, Van Breemen et al. (2014) ont montré l'absence d'effet d'un extrait de houblon contenant du XN, de l'IXN, de la 6-PN et de la 8-PN sur les hormones sexuelles et la coagulation du sang de femmes, après plusieurs mois de traitement. La 8-PN prise en dose unique de 750 mg est bien tolérée par les femmes, tout en montrant une absorption complète et une grande stabilité métabolique (Rad et al., 2006). Une étude sur des jeunes hommes et femmes a également été réalisée pour évaluer le potentiel du houblon à lutter contre l'anxiété. Des doses de 200 mg de poudre de houblon ingérées par jour pendant plusieurs semaines se sont avérées sans effet, ni sur la prise de poids, ni sur la quantité ou la composition circulante du cortisol du sang de sujets humains (Kyrou et al., 2017).

### 2.5.2. Biotransformations et biodisponibilité

#### **Le xanthohumol (XN)**

Le XN a fait l'objet de nombreuses études de métabolisation et de biodisponibilité. *In vitro*, une incubation de 2 heures avec un fluide gastrique simulé diminue de 17% la teneur en XN. Après 1 à 2 heures de contact avec un fluide intestinal, 20 à 50% de pertes sont constatées (Hanske et al., 2010). Suite à l'administration orale de 1000 mg/kg de XN à des rats, 89% du XN excrété n'est pas transformé. Les 11% restants se répartissent à travers 22 métabolites dérivés du XN suite à des réactions de type hydroxylation ou *O*-méthylation (Nookandesh et al., 2004). Ces modifications seraient liées au microbiote intestinal. En effet, lorsque le XN est mis en contact avec des boues fécales issues d'un organisme simulant le microbiote humain, 43% de la molécule est dégradée. A l'inverse, lorsqu'il est incubé avec des boues fécales dont l'organisme ne possède pas de microbiote, 84% de la concentration initiale est retrouvée (Hanske et al., 2010). Cette métabolisation a été retrouvée *in vivo* après administration à des rats (17 mg de XN/kg). Le XN ainsi que des dérivés ont été retrouvés dans le sang de l'ensemble des rats. En revanche, l'IXN a été uniquement retrouvé dans le sang de rats ayant un microbiote humain (Hanske et al., 2010). La transformation du XN en IXN par le microbiote a également été démontrée par Legette et al. (2012).

Des études *in vitro* se sont spécifiquement intéressées à la capacité du XN à traverser, ou non, la barrière intestinale. Ce paramètre est un marqueur important de la biodisponibilité d'un produit car c'est à ce niveau qu'a lieu le passage des métabolites

dans le sang. *In vitro*, l'analyse du potentiel à traverser la barrière intestinale se fait généralement en étudiant la perméabilité d'une monocouche cellulaire de Caco-2. Elles sont capables de se différencier en cellules intestinales polarisées pour former un épithélium possédant des caractéristiques de la barrière intestinale. En comparaison avec le propranolol connu pour traverser la monocouche Caco-2, le **tableau 3** traduit une faible biodisponibilité du XN. Il a été démontré que dans le sens de la barrière intestinale (apical-basal), le XN s'accumule rapidement dans les cellules puis se lie à des protéines cytosoliques, il devient alors incapable de passer la membrane basale de ces dernières (Pang et al., 2007). Ces données sont différentes de celles obtenues par Rodriguez-Proteau et al. (2006) qui ont montré un coefficient de perméabilité de  $1,5 \times 10^{-5}$  cm/s. Néanmoins, la concentration testée était 10 fois moins importante que celle utilisée par Pang et al. en 2007. Legette et al. (2012) ont émis une notion de dose seuil au-dessus de laquelle le XN ne traverserait plus la barrière intestinale : 5-6 mg/kg.

**Tableau 3.** Perméabilité d'une monocouche cellulaire de Caco-2 au XN à  $3,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  *in vitro*, d'après les résultats de Pang et al. (2007) ; AP : apical, BL : basal

	XN (AP-BL)	XN (BL-AP)	Sucrose	Propranolol
<b>Coefficient de perméabilité (cm/s)</b>	$1,33 \times 10^{-7}$	$2,37 \times 10^{-7}$	$1,96 \times 10^{-7}$	$6,75 \times 10^{-5}$

### La 8-prénylnaringénine (8-PN) : le phyto-estrogène du houblon

La 8-PN est l'un des plus puissants phyto-estrogènes connus à ce jour. La teneur en 8-PN des cônes est limitée. Néanmoins, la métabolisation de certains flavonoïdes prénylés du houblon par l'organisme, permettrait d'augmenter la teneur en phyto-estrogènes biodisponibles. Le microbiote intestinal serait impliqué dans ce phénomène, par la conversion de l'IXN en 8-PN. En effet, lorsque des cultures fécales humaines sont incubées en présence d'un mélange de XN, d'IXN et de 8-PN, 36% de l'IXN est transformé en 8-PN par le biais d'une O-déméthylation (Possemiers et al., 2005). Possemiers et al. (2006) ont montré que sans passage par l'intestin grêle, le XN, l'IXN et la 8-PN pourraient arriver non modifiés au niveau du colon. La transformation de l'IXN en 8-PN aurait précisément lieu dans les parties transverses et descendantes du colon. Un tiers des bactéries présentes à ce niveau, comme c'est le cas de *Eubacterium limosum*, seraient capables de convertir l'IXN en 8-PN (Possemiers et al., 2008 ; Żoźniarczyk et al., 2015). L'IXN étant 10 à 30 fois plus abondant dans les cônes de houblon, par rapport à la 8-PN, il constitue une source de pro-phyto-estrogènes (Stevens et al., 1999). Il a également été remarqué que lorsqu'on augmente la dose prise d'IXN par des sujets humains, la quantité d'IXN récupérée dans les urines ne change pas alors que celle de 8-PN augmente (Bolca et al., 2007). Après être passée dans le sang, la 8-PN pourrait être modifiée au niveau du foie. En effet, des microsomes hépatiques humains seraient capables de former 12 métabolites différents sur la base de la chaîne prénylée ou du

fragment flavanone (Nikolic et al., 2004). Guo et al. (2006) ont identifié une enzyme hépatique qui serait également capable de transformer l'IXN en 8-PN. Enfin, une étude clinique a permis de confirmer que la 8-PN passe au travers de la barrière hémato-encéphalique pour interagir avec l'axe hypothalamus-hypophyse et ainsi, agir sur la synthèse hormonale (Rad et al., 2006).

### Les autres composés phénoliques

Les informations concernant la biodisponibilité des autres composés d'intérêt du houblon, comme les acylphloroglucinols, sont limitées (Karabín et al., 2015). La capacité de ces derniers à traverser la barrière intestinale a également été étudiée *in vitro*. La monocouche de cellules de Caco-2 a montré une perméabilité supérieure pour les acides  $\alpha$  en comparaison avec les acides  $\beta$  dans le sens de la barrière intestinale. Les coefficients de perméabilité pour les acides  $\beta$  sont 20 à 40 fois inférieurs à ceux des acides  $\alpha$ , traduisant une faible biodisponibilité (Cattoor et al., 2013). Cette absorption serait limitée à cause de transporteurs de type pompes à efflux ainsi que de réactions du métabolisme de phase II, menant à des substances conjuguées non biodisponibles (Cattoor et al., 2010). Concernant les acides iso- $\alpha$ , les cellules Caco-2 se sont avérées davantage perméables aux dérivés tétrahydro- par rapport aux dérivés dihydro-. Le facteur limitant la perméabilité impliquerait également le métabolisme de phase II (Cattoor et al., 2011).

Les données de la littérature présentées ici montrent une toxicité *a priori* peu élevée des composés phénoliques prénylés du houblon en prise orale. Néanmoins, exceptée pour la 8-PN, ils semblent peu biodisponibles par le biais de cette voie d'administration.

## 2.6. Biotechnologies végétales et culture *in vitro* de houblon

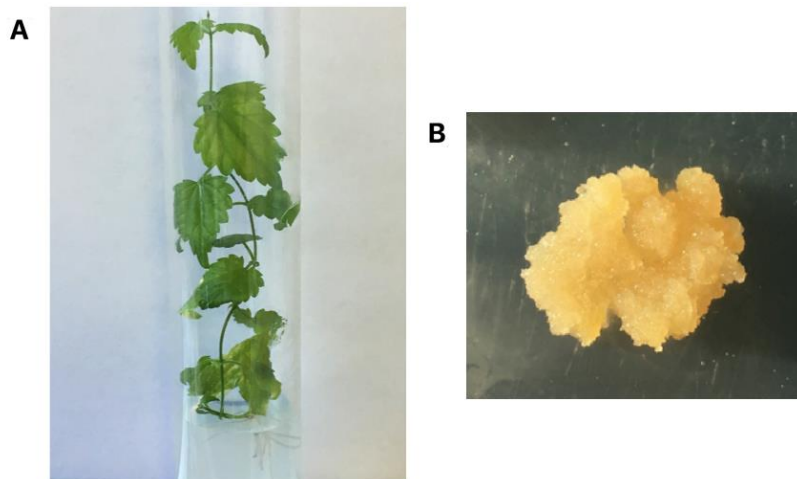
Plusieurs techniques sont disponibles en biotechnologies végétales, pour produire des métabolites d'intérêt : la culture *in vitro* de plants ou de cals, la production de « hairy roots » ainsi que les suspensions cellulaires végétales. Cette partie donnera un bref aperçu des possibilités de production des métabolites d'intérêt du houblon.

### 2.6.1. La culture *in vitro* ou micro-propagation

La culture *in vitro* peut être effectuée à partir de divers tissus ou organes. Les parties répondant le mieux à la régénération par culture *in vitro* chez le houblon seraient les entre-nœuds. Horlemann et al. (2003) ont mis au point un milieu inducteur de pousses permettant de régénérer 50% d'explants de manière directe à partir d'entre-nœuds, c'est à dire que l'organogenèse se produit directement sur la surface des explants inactifs cultivés. Les plantules ainsi obtenues (**Fig. 20A**) ont ensuite pu être transférées en pots puis en serre, en moins de 6 mois. L'organogenèse directe est contraire à

l'organogenèse indirecte qui se produit à partir de cals préalablement formés. Les cals sont des amas de cellules indifférenciées capables de donner une plante entière (**Fig. 20B**). Plusieurs études ont montré la possibilité de produire des cals à partir de divers explants de houblon. Smýkalová et al. (2001) ont par exemple pu induire des cals à partir d'entrenœuds, grâce à un milieu approprié. Ils ont également mis en évidence la forte variabilité de régénération entre les cultivars (Faragó et al., 2009).

La culture *in vitro* permet d'obtenir de nombreuses plantes en un temps court. Le milieu de culture étant contrôlé, il est possible d'y ajouter des régulateurs de croissance pour permettre une régénération accrue. Roy et al. (2001) ont par exemple pu multiplier par trois le nombre de pousses régénérées à partir d'explants nodaux de houblon, après utilisation de thidiazuron. Les hormones végétales peuvent également être utilisées sur des parties végétales qui ne sont pas des méristèmes, comme les pétioles, les feuilles ou encore les entre-nœuds. Néanmoins, il est difficile d'obtenir des cônes avec cette méthode, elle ne paraît donc pas optimale pour la production des métabolites secondaires prénylés cités dans les parties précédentes.



**Figure 20.** Vitro-plant de houblon de deux mois (A) et cals obtenus par micro-propagation (B) (Bocquet et al., 2018b)

### 2.6.2. Les cultures de « hairy roots » ou « chevelus racinaires »

Les « chevelus racinaires » se développent à partir d'un explant végétal, après infection par *Agrobacterium rhizogenes*. Ils possèdent une croissance rapide et infinie même en l'absence d'hormones végétales. Son importante biomasse représente un avantage majeur pour la production de métabolites (**Fig. 21**). La transformation par *A. rhizogenes* est employée pour transférer des gènes et modifier le métabolisme de l'explant, lui permettant ainsi de produire des composés d'intérêt. Chez le houblon, une seule étude utilisant cette technique a été recensée. Les auteurs ont transformé des segments de feuilles par *A. rhizogenes* présentant des gènes de biosynthèse de flavonoïdes et de phloroglucinols. Ils n'ont néanmoins pas cherché à produire des métabolites, mais plutôt à valider des gènes candidats pour une transformation réussie



par insertion d'un gène de la  $\beta$ -glucuronidase. Aucune donnée sur la capacité de croissance et de production de métabolites d'intérêt n'a été faite (Gatica-Arias et al., 2012).

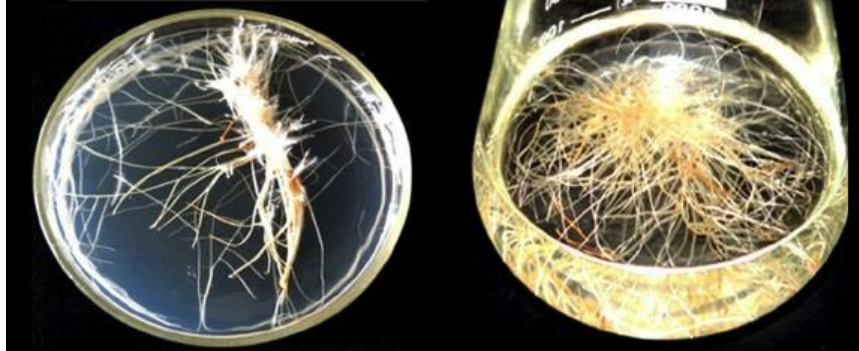


Figure 21. Exemples de « chevelus racinaires » obtenus à partir de *Solanum procumbens* (Shilpha et al., 2015)

### 2.6.3. Les suspensions cellulaires

La suspension cellulaire végétale est un procédé de culture en milieu liquide, permettant de multiplier un grand nombre de cellules à partir d'un fragment de plante. Les cellules végétales peuvent alors sécréter les métabolites d'intérêt dans le milieu. Les premières suspensions cellulaires de houblon n'ont pas permis de produire les métabolites d'intérêt tels que les acides  $\alpha$  et les composés volatiles. Seul le XN a déjà été identifié dans des suspensions cellulaires de houblon (Faragó et al., 2011). Langezaal et Scheffer (1992) ont mis en place un système biphasique avec une phase lipophile pour solubiliser plus facilement ces composés apolaires. Ce système n'a néanmoins pas aidé à produire les composés désirés.

### 2.6.4. La production hétérologue

L'organogenèse directe, la transformation par *Agrobacterium* et les suspensions cellulaires n'ayant pas donné de résultats concluants pour la production des métabolites du houblon, la production hétérologue par l'intermédiaire de bactéries ou de levures pourrait être envisagée (Tatsis et O'Connor, 2016). En effet, les voies de biosynthèse des produits d'intérêt du houblon et la plupart des enzymes impliquées sont aujourd'hui connues (Nagel et al., 2008 ; Tsurumaru et al., 2012 ; Li et al., 2015). De plus, son génome a déjà été séquencé (Natsume et al., 2015). La seule étude disponible à ce sujet dans la littérature semble être la reconstruction de la voie de biosynthèse des acides amers dans une levure modifiée, pour que celle-ci produise ces composés. Les rendements sont faibles pour le moment mais la transformation a été un succès (Li et al., 2015). Les systèmes de production hétérologues pourraient donc être une piste prometteuse pour produire les métabolites d'intérêt.

# **Deuxième partie**

## **Résultats et discussion**

## Chapitre 3.

# Phytochimie : extraction, purification, caractérisation et quantification des composés antimicrobiens du houblon

Au début de l'étude, des extraits hydro-alcooliques de feuilles, de tiges, de cônes et de rhizomes de houblon du cultivar Nugget, ont été réalisés. Nous verrons plus tard que suite au criblage de l'activité antimicrobienne, les cônes femelles se sont avérés être les parties les plus intéressantes. Un intérêt particulier a donc été porté sur leur composition chimique. Les composés majoritaires de cette partie de la plante ont ainsi été purifiés et identifiés afin de pouvoir évaluer leur activité biologique. Les standards commerciaux étant peu disponibles ou leur coût étant élevé, cette purification a également permis de caractériser de façon plus précise les extraits par CLHP-UV dans un premier temps, puis de les quantifier par CLUHP-UV dans ces mêmes extraits.

### 3.1. Composition des diverses parties de houblon

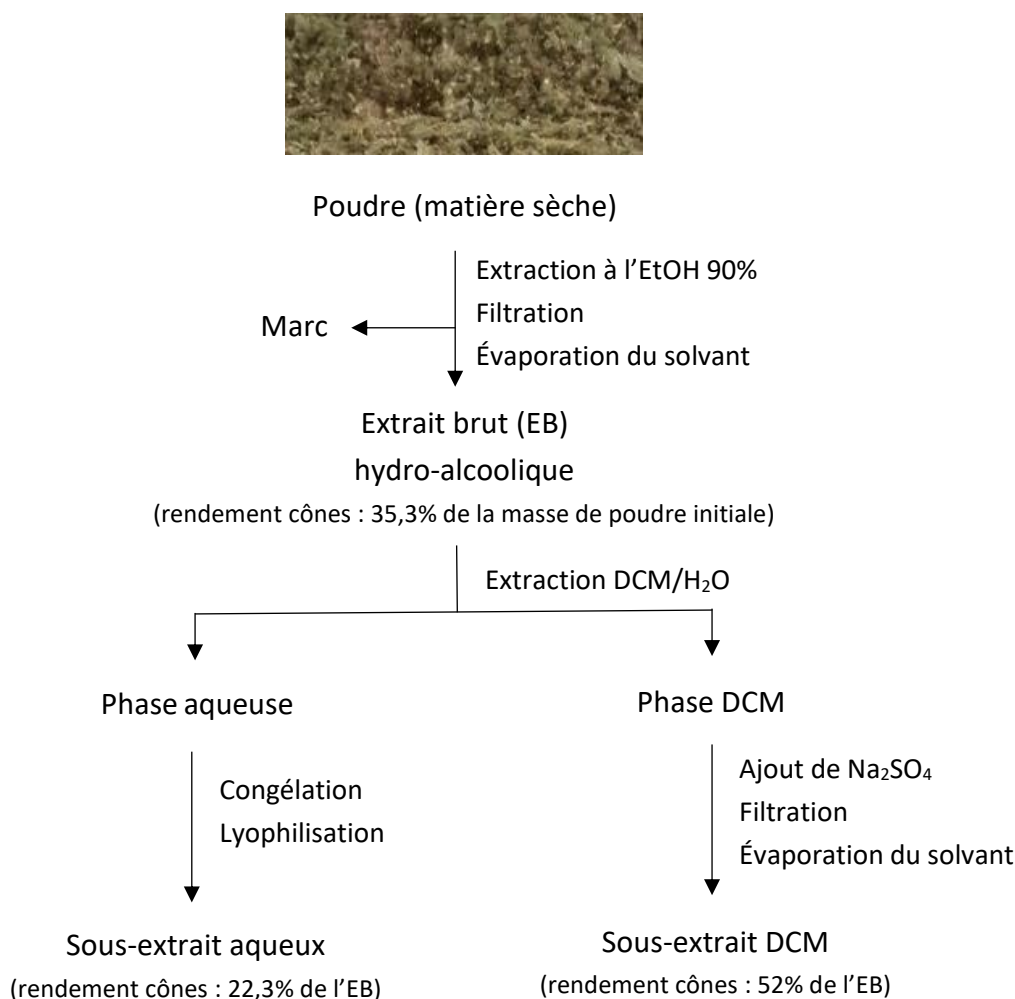
#### 3.1.1. Caractérisation par CLHP-UV des extraits et sous-extraits

##### Extraits et sous-extraits de cônes femelles

Les composés majoritaires des cônes femelles de houblon, purifiés par chromatographie préparative et identifiés par HR-SM et RMN ont servi de standards pour être replacés sur les différents chromatogrammes. Le choix du solvant d'extraction (EtOH/H<sub>2</sub>O, 9:1, v/v) pour préparer l'extrait brut a été optimisé en amont de ma thèse. Il permet une extraction des composés phénoliques avec une large gamme de polarité. L'objectif étant d'étudier les composés phénoliques prénylés du houblon, une extraction liquide-liquide par du dichlorométhane (DCM) a d'abord permis de les réunir dans la phase organique (ou sous-extrait DCM), se « débarrassant » ainsi des polyphénols polaires plus classiques qui eux se sont retrouvés dans la phase aqueuse (ou sous-extrait aqueux) (**Fig. 22**). Les rendements en extraits et sous-extraits sont présentés dans le **tableau 4**.

**Tableau 4.** Rendements moyens obtenus pour les extraits bruts et sous-extraits aqueux et DCM en pourcentages de matière sèche ; les rendements des sous-extraits sont calculés à partir de la masse récupérée des extraits bruts.

Extraits et sous-extraits	Rendements (%)			
	Cônes	Feuilles	Tiges	Rhizomes
Extrait brut hydro-alcoolique	35,3	19	15,6	18,7
Sous-extrait DCM	52	27,5	5,9	6,2
Sous-extrait aqueux	22,3	56,6	77	90,3

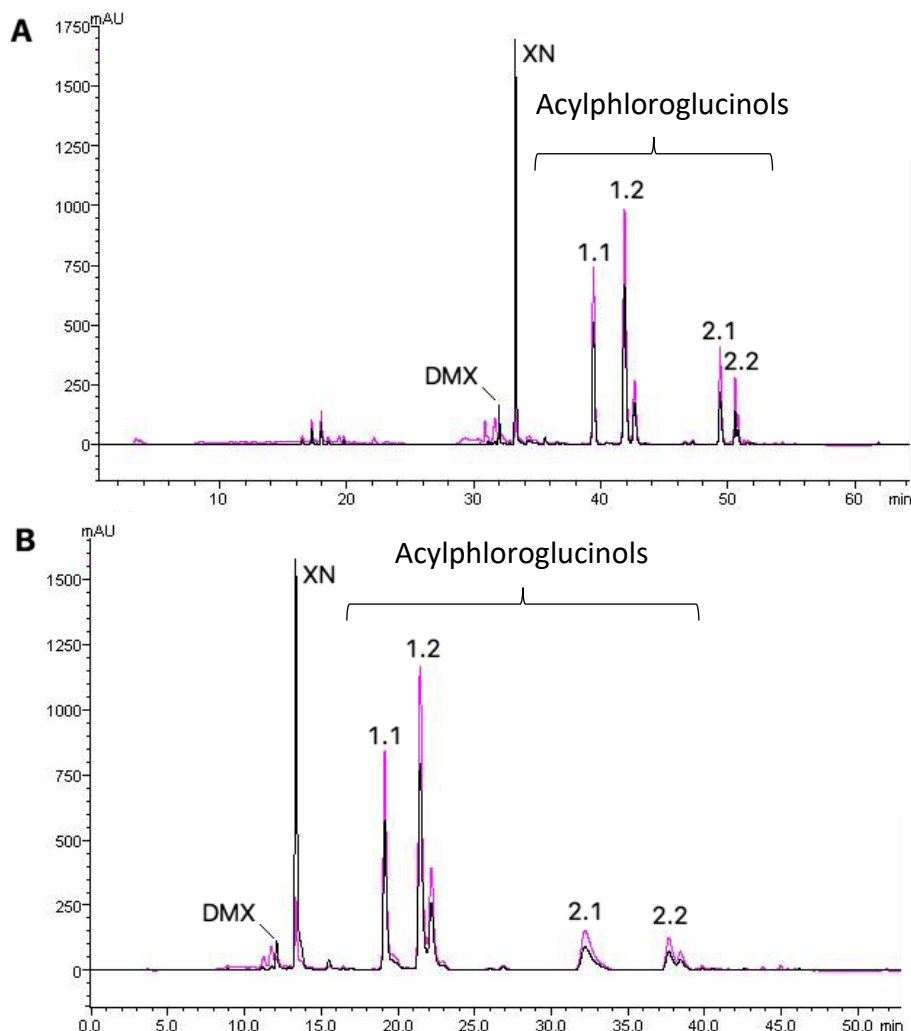


**Figure 22.** Procédé d'obtention des extraits bruts hydro-alcooliques et des sous-extraits DCM enrichis avec les rendements associés pour les cônes ; EB : extrait brut

La **figure 23** montre les profils chromatographiques en CLHP-UV de l'extrait hydro-alcoolique de cônes, en comparaison avec le sous-extrait DCM. La phase stationnaire utilisée étant une phase inverse et le gradient de phase mobile étant polaire en début d'analyse (détails dans la partie 6.2.2.), les composés polaires sont élués en premier.

La zone entre 15 et 20 minutes regroupe les métabolites les plus polaires de l'extrait brut (**Fig. 23A**). Cette zone est absente dans le sous-extrait DCM (**Fig. 23B**). Si l'on s'appuie sur les données de la littérature, elle est probablement composée de polyphénols, majoritairement des flavonols de type quercétine, kaempférol, myricétine (Sagesser et Deinzer, 1996 ; Magalhães et al., 2010 ; Farag et al., 2012 ; Karabín et al., 2016) et de certains de leurs hétérosides comme l'astragaline (Segawa et al., 2014 ; Luzak et al., 2016). Un pic majoritaire est visible au centre du chromatogramme à 370 nm (environ 33 minutes (**Fig. 23A**)). Il s'agit du XN, chalcone prénylée majoritaire des cônes femelles du houblon (Stevens et al., 1999 ; Chadwick et al., 2006). Il est également retrouvé dans le sous-extrait DCM (**Fig. 23B**). Le XN est précédé par son précurseur *in planta*, le DMX, plus minoritaire, qui élue à 32 minutes (**Fig.23A**). Au centre du

chromatogramme (vers 36 minutes), un regroupement d'autres composés moins bien séparés est visible à la fois à 254 et 370 nm (**Fig. 23A**). Ces molécules pourraient être des chalcones, ou autres flavonoïdes minoritaires. En effet, de nombreux autres prénylflavonoïdes déjà décelés dans les cônes femelles n'ont pas encore été identifiés dans nos extraits, car ils n'ont pas été purifiés (Stevens et al., 1997 et 1999).



**Figure 23.** Chromatogrammes CLHP-UV de l'extrait hydro-alcoolique (A) et du sous-extrait DCM (B) de cônes femelles à 10 mg.mL<sup>-1</sup>, avec les méthodes adaptées respectives présentées dans la partie 6.2.2. ; le choix des longueurs d'ondes s'est fait à 254 nm (rose), proche de l'un des maximums d'absorption des acylphloroglucinols permettant également de détecter plusieurs autres composés, et 370 nm (noir) qui est l'un des maximums d'absorption des chalcones ; les composés d'intérêt pour la suite de l'étude sont mis en évidence, les chalcones (DMX : desméthylxanthohumol et XN : xanthohumol) et les acylphloroglucinols (1.1. co-humulone, 1.2. humulone, 2.1. co-lupulone, 2.2. lupulone).

Enfin, la partie la plus apolaire du chromatogramme commence aux alentours de 40 minutes (**Fig. 23A**). Ce sont des produits qui absorbent davantage à 254 nm qu'à 370 nm. Les spectres UV de ces composés montrent un second maximum d'absorption, plus spécifique, à 330 nm (**Fig. 24**). Il s'agit des dérivés prénylés d'acylphloroglucinols ou acides amers. Deux groupes peuvent être distingués. Le premier groupe élué à la fin du plateau à 75% et jusqu'à 100% d'ACN (38 à 44 minutes) sont les acides  $\alpha$  ou dérivés de

l'humulone, de gauche à droite se trouvent la *co*-humulone (1.1) puis l'humulone (1.2). Le deuxième groupe élué au cours du plateau à 100% représente les acides  $\beta$  ou dérivés de la lupulone, dans l'ordre sont élués la *co*-lupulone (2.1) et la lupulone (2.2). Le caractère plus apolaire de ces derniers s'explique par la présence d'une chaîne prénylée supplémentaire par rapport aux acides  $\alpha$  (**Fig. 15**). Ces composés sont présents dans le houblon sous forme d'un mélange complexe de plusieurs dérivés en proportions différentes. Il existe des dérivés d'acides  $\alpha$  et  $\beta$  présents en de plus faibles quantités encore : *pré-*, *post-*, *adpré-* et *adpost-* humulone ou lupulone (Zanoli et Zavatti, 2008).

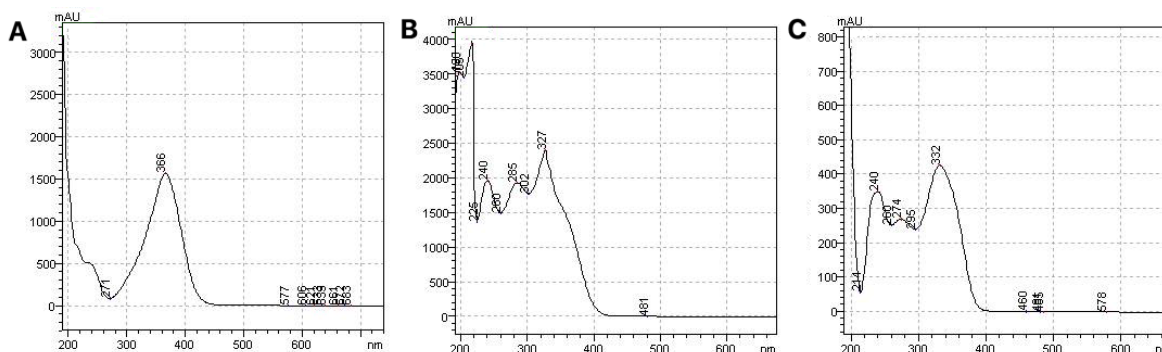


Figure 24. Spectres UV du xanthohumol (A), de l'humulone (B) et de la lupulone (C)

#### Remarque

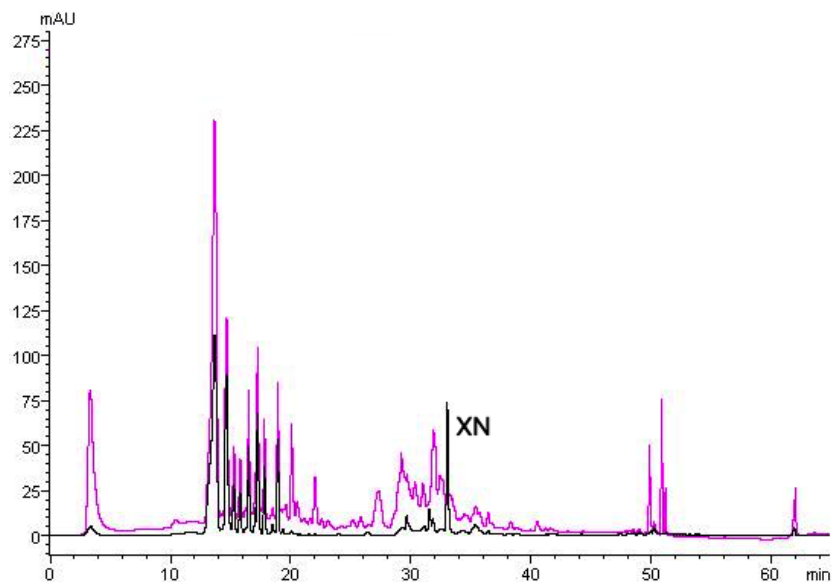
Dans une optique de chimie verte et en vue de faciliter une éventuelle extrapolation industrielle, un essai de remplacement du fractionnement DCM/H<sub>2</sub>O par une élution sur résine d'Amberlite a été réalisée. L'objectif étant d'obtenir un sous-extrait enrichi en composés phénoliques prénylés de composition proche du sous-extrait DCM. Néanmoins, le test n'a pas été concluant. Cette résine de polarité intermédiaire (XAD7), est constituée d'esters polyacryliques (RCOO) créant des interactions avec les cycles aromatiques. Elle est capable de retenir les composés phénoliques, mais ne permet pas une sélectivité envers les composés prénylés. Le sous-extrait obtenu comprenait donc encore la partie polaire non désirée de l'extrait brut.

Une extraction par fluide supercritique pourrait être envisagée dans le futur. Cette méthode consiste à faire circuler du CO<sub>2</sub> supercritique à la place du solvant, sur la

#### Extraits d'inflorescences femelles et d'inflorescences mâles

Les inflorescences des pieds femelles et des pieds mâles sont non seulement différentes par leur aspect, mais également par leur composition chimique. Pour rappel, le houblon étant une plante dioïque, seuls les pieds femelles sont cultivés par les producteurs. Les pieds mâles sont trouvés à l'état sauvage. Ainsi, le houblon analysé ici n'est pas du cultivar Nugget, il a été collecté dans le Sud-Est de la France. Les chalcones

prénylées identifiées précédemment sont présentes en de moins grandes quantités, seul le XN est décelable avec certitude, dans les inflorescences mâles. Leur présence est probablement liée aux glandes à lupuline retrouvées au niveau des anthères (Nickerson et al., 1988). Les dérivés d'acylphloroglucinols semblent être absents. Les teneurs des composés plutôt polaires éluant entre 10 et 20 minutes sont plus importantes dans les inflorescences mâles que dans les inflorescences femelles (**Fig. 25**).



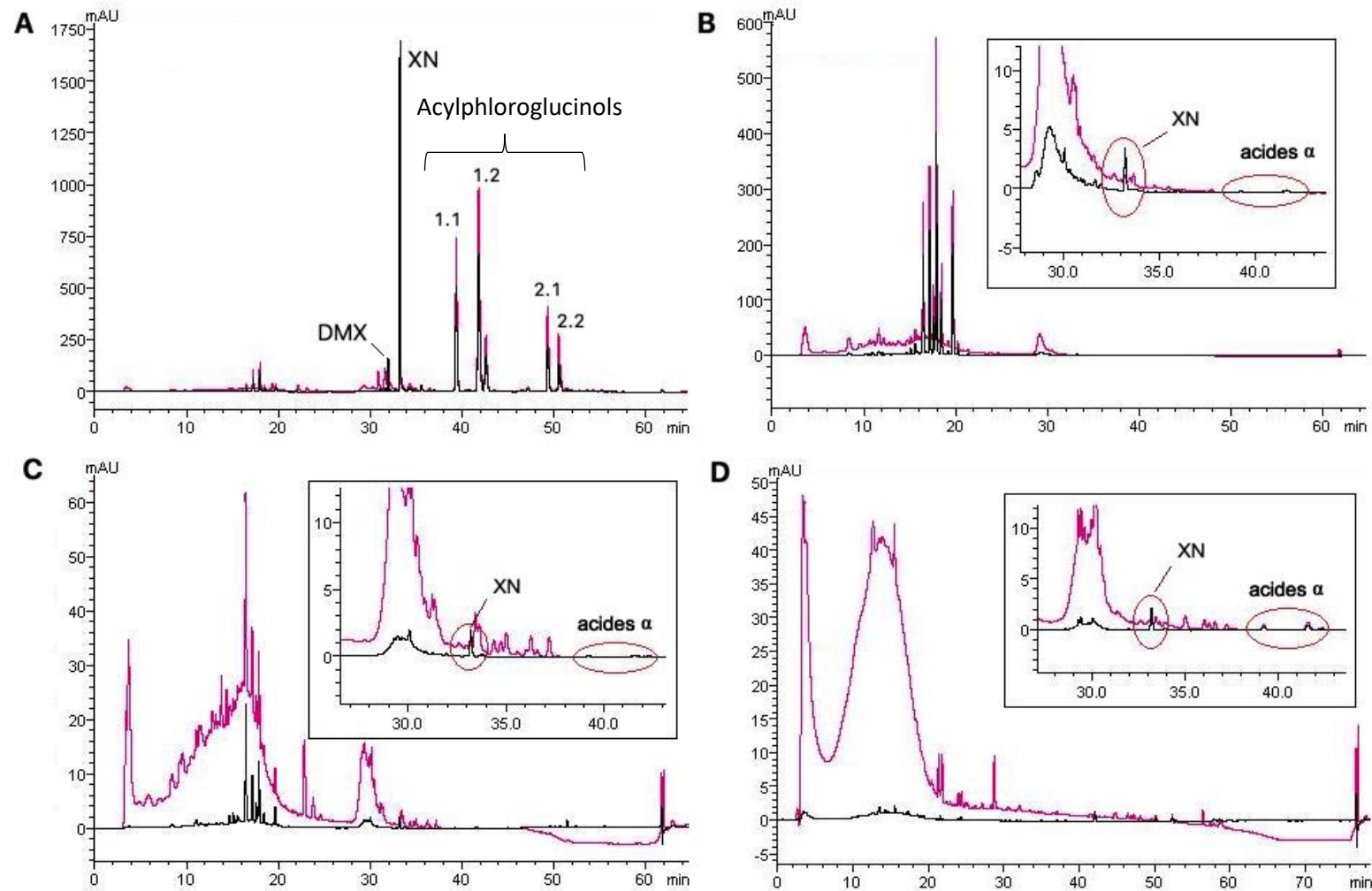
**Figure 25.** Chromatogramme CLHP-UV de l'extrait hydro-alcoolique d'inflorescences mâles à 10 mg.mL<sup>-1</sup>, avec la méthode adaptée aux extraits bruts présentée dans la partie 6.2.2., à 254 nm (rose) et 370 nm (noir)

### Extraits de feuilles, de tiges et de rhizomes

Comme pour les inflorescences mâles, aucun composé n'ayant été purifié de ces parties de houblon, une simple comparaison des chromatogrammes obtenus par CLHP-UV avec celui des cônes femelles a été effectuée (**Fig. 26A**). Le groupe de molécules plutôt polaires élué entre 15 et 20 minutes est majoritaire dans les feuilles et les tiges (**Fig. 26B, C**). Ils ne semblent pas décelables dans les rhizomes (**Fig. 26D**). Les rendements en sous-extraits montrent une dominance davantage polaire dans les extraits de feuilles, de tiges et de rhizomes en comparaison avec les cônes femelles (**Tableau 4**). Au niveau des composés d'intérêt, seuls le XN et des dérivés de l'humulone ont été détectés dans les autres parties de la plante, à des teneurs bien inférieures, voire à l'état de traces. Leur présence dans les feuilles a déjà été décrite. Elle se justifie par la présence de trichomes glandulaires sur la face inférieure des feuilles, de plus petite taille et présents en moins grandes quantités que dans les cônes (Sugiyama et al., 2006 ; Čeh et al., 2007 ; Abram et al., 2015). Des tanins pourraient être également présents dans les tiges et les rhizomes. Ces derniers ont été mis en évidence par révélation au chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>) par chromatographie sur couche mince (CCM). En CLHP-UV ils se présentent sous la forme d'un amas absorbant principalement à 280 nm dans les 20 premières minutes de l'analyse. En effet, des dérivés de procyanidines ou encore des prodelphinidines ont été

recensés dans le houblon. Dans les cônes, ces composés seraient présents à des teneurs inférieures à 0,1%, ils semblent davantage représentés dans les autres parties de la plante (Li et Deinzer, 2006 ; Tanaka et al., 2014 ; Karabín et al., 2016).

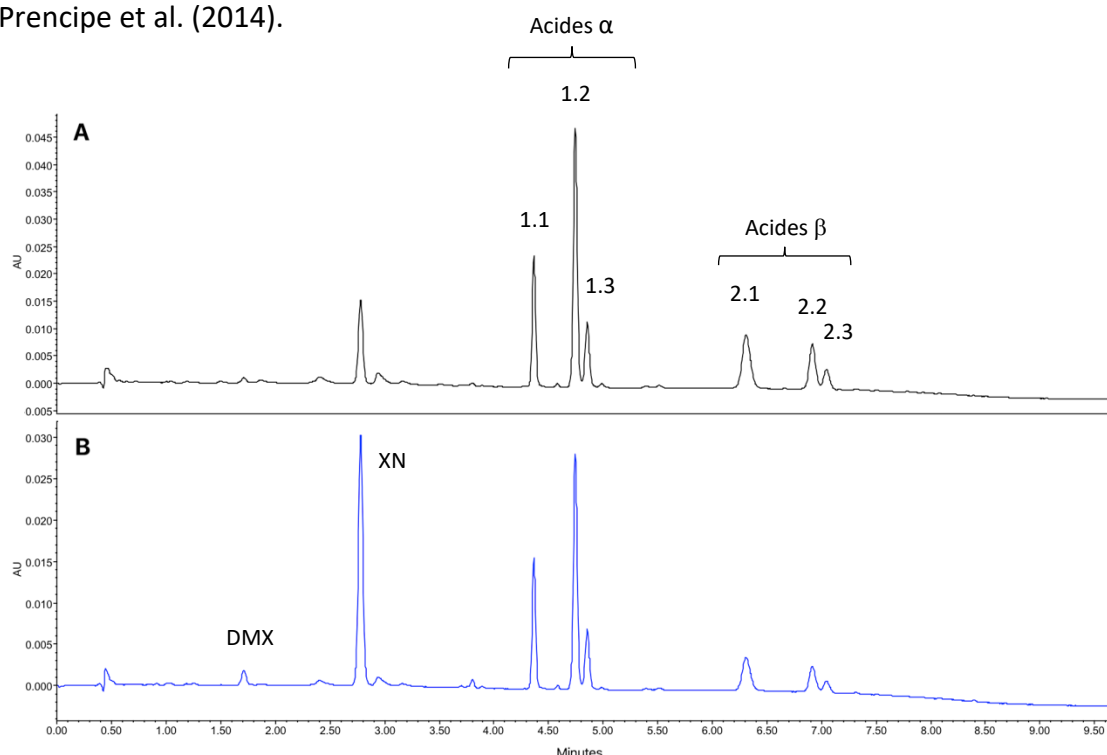




**Figure 26.** Comparaison des chromatogrammes CLHP-UV des extraits hydro-alcooliques de différentes parties d'un pied femelle de houblon à 10 mg.mL<sup>-1</sup>, avec la méthode adaptée aux extraits bruts présentée dans la partie 6.2.2., à 254 nm (rose) et 370 nm (noir) ; les encadrés des chromatogrammes B, C et D mettent en évidence le xanthohumol (XN) et les dérivés d'acylphloroglucinols (1.1 *co*-humulone, 1.2 humulone, 2.1 *co*-lupulone, 2.2 lupulone) ; A. cônes femelles, B. feuilles, C. tiges, D. rhizomes

### 3.1.2. Profil chromatographique des extraits de cônes en CLUHP-UV

Les chromatogrammes ci-dessous montrent la transposition de la CLHP à la CLUHP avec les méthodes correspondantes (parties 6.2.2. et 6.2.3., respectivement). Les profils chromatographiques des extraits bruts de cônes sont similaires, mais le temps d'analyse est nettement réduit (**Fig. 26A** et **Fig. 27**, respectivement). Le détecteur UV de la chaîne CLUHP est couplé à un spectromètre de masse (SM) ayant comme source d'ionisation l'ESI et comme analyseur un quadripôle. L'identification des métabolites précédemment cités a ainsi pu être confirmée. Nous avons également identifié d'autres composés phénoliques majoritaires qui n'ont pas été purifiés, notamment les composés 1.3 et 2.3 (**Fig. 27**). Il s'agit de dérivés d'acides amers, respectivement l'*ad*-humulone et l'*ad*-lupulone (**Tableau 5**). Le profil CLUHP et les données de masse sont en accord avec Prencipe et al. (2014).



**Figure 27.** Chromatogramme CLUHP-UV de l'extrait brut de cônes à 100 µg.mL<sup>-1</sup>, à 330 nm (A) et 370 nm (B), avec la méthode présentée dans la partie 6.2.3. ; 1.1 *co*-humulone, 1.2 humulone, 1.3 *ad*-humulone ; 2.1 *co*-lupulone, 2.2 lupulone, 2.3 *ad*-lupulone, DMX : desméthylxanthohumol, XN : xanthohumol

**Tableau 5.** Composés majoritaires identifiés dans un extrait brut de cônes de houblon après analyses par CLUHP-UV-SM, les codes correspondant aux composés mis en avant sur les chromatogrammes de la **figure 27**.

Code	Composé	Temps de rétention (min)	UV λ <sub>max</sub> (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)
DMX	Desméthylxanthohumol	1,71	370	377,2
XN	Xanthohumol	2,78	370	353,2
1.1	<i>co</i> -Humulone	4,37	254, 330	347,3
1.2	Humulone	4,75	254, 330	361,3
1.3	<i>ad</i> -Humulone	4,86	254, 330	361,3
2.1	<i>co</i> -Lupulone	6,31	254, 330	399,4
2.2	Lupulone	6,92	254, 330	413,4
2.3	<i>ad</i> -Lupulone	7,05	254, 330	413,4

### 3.1.3. Dosage des produits d'intérêt dans les diverses parties de houblon par CLUHP-UV

Certains produits d'intérêt ont été dosés dans les diverses parties de la plante, à partir de gammes étalons : le XN pour les chalcones, l'humulone et la lupulone pour les acylphloroglucinols. Des estimations de quantification d'autres dérivés tels que les *co-* et *ad-*acides ont été effectuées à partir des droites d'étalonnage de l'humulone et de la lupulone. La teneur en DMX étant inférieure à la gamme de linéarité validée pour le XN, l'estimation de sa quantification n'a pu être effectuée. Ce dosage a été réalisé par le Dr Natacha Bonneau dans le cadre du stage de Justine Jacquin (stage de fin de cycle ingénieur de l'ENSAIA, Nancy, 2017-2018) par le biais d'analyses en CLUHP-UV (DAD).

#### Validation de la méthode

Il a dans un premier temps été nécessaire de valider les gammes étalons de chaque produit à doser en termes de concentrations, de linéarité et de déviation (détails dans la partie 6.2.3.). Les concentrations choisies pour les gammes étalons de chacun des produits ainsi que les paramètres évalués sont présentés dans le **tableau 6**. La linéarité de chaque gamme est correcte ( $R^2 > 0,99$ ). Les déviations étant inférieures à 15% pour les concentrations autres que la limite de quantification (LOQ), elles sont acceptables. Ces dernières sont légèrement supérieures mais restent inférieures aux 20% acceptés pour la LOQ (European Medicines Agency, 2015).

**Tableau 6.** Paramètres de validation des gammes étalon du xanthohumol (XN), de l'humulone et de la lupulone par CLUHP-UV pour le dosage des métabolites d'intérêt dans les extraits de houblon, la première concentration de chaque gamme est considérée comme la limite de quantification (LOQ) de chaque produit.

Produit	Gamme de concentrations	Nombre de points	R <sup>2</sup>	Déviations maximale (%)
XN (370 nm)	250 ng.mL <sup>-1</sup> – 50 µg.mL <sup>-1</sup>	8	0,995	13,7% (LOQ) 13,9% (>LOQ)
Humulone (330 nm)	25 ng.mL <sup>-1</sup> – 100 µg.mL <sup>-1</sup>	12	0,998	18,6% (LOQ) 11,5% (>LOQ)
Lupulone (330 nm)	100 ng.mL <sup>-1</sup> – 100 µg.mL <sup>-1</sup>	10	0,998	15,6% (LOQ) 13,7% (> LOQ)

La précision de la méthode a été évaluée sur l'extrait brut hydro-alcoolique de cônes, avec chacun des trois produits à doser (méthodes de calculs détaillées dans la partie 6.2.3.). Les variabilités intra- et inter-jours exprimées par le biais des coefficients de variation, sont présentées dans le **tableau 7**. Pour chacun des trois composés, les variabilités intra- et inter-jours étant inférieures à 15%, même pour les LOQ, elles sont acceptables (European Medicines Agency, 2015).

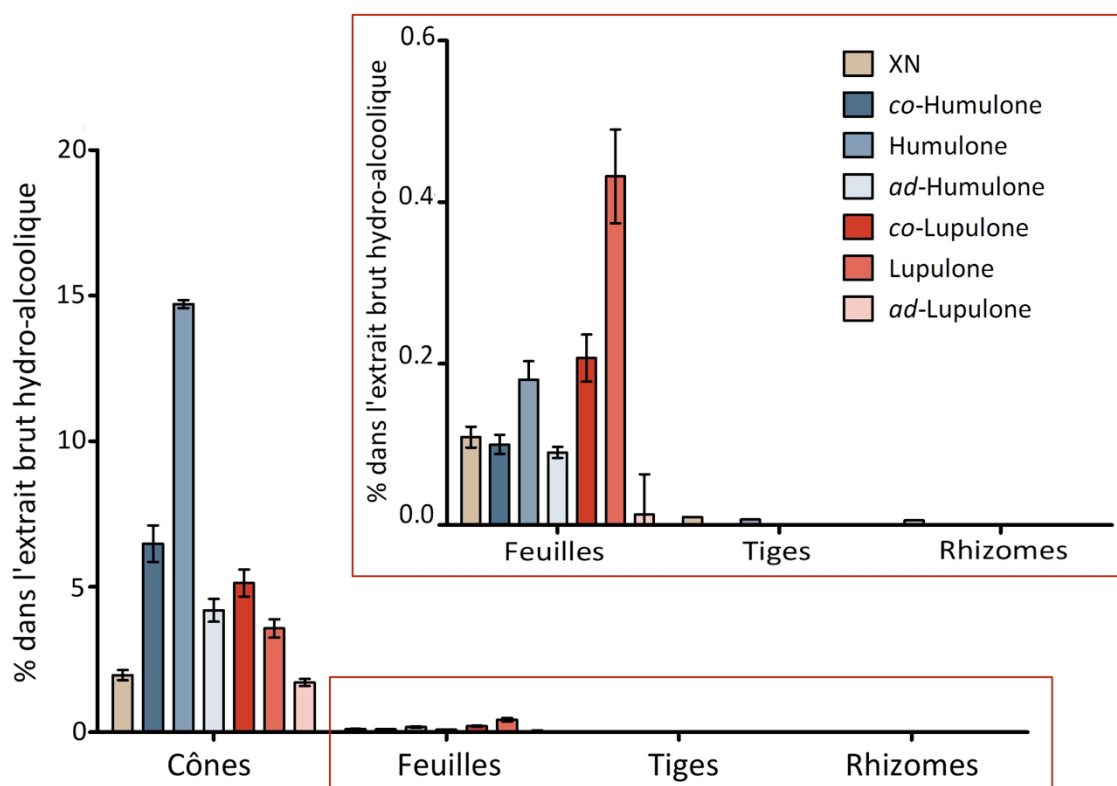
L'injection de MeOH seul avant, pendant, et après les diverses séries d'analyses, a permis de montrer l'absence d'interférences aux temps de rétention des composés à doser. La sélectivité de la méthode a ainsi pu être confirmée.

**Tableau 7.** Précision de la méthode de dosage pour chacun des composés dans l'extrait brut de cônes ; les coefficients de variation (CV en %) traduisent la répétabilité intra- et inter- jour.

Produit	Répétabilité intra-jour	Répétabilité inter-jour
XN (370 nm)	11,8%	13,0%
Humulone (330 nm)	12,2%	12,9%
Lupulone (330 nm)	10,4%	10,4%

### Résultats du dosage pour les extraits bruts hydro-alcooliques

Les résultats du dosage sont présentés de deux manières : le pourcentage de ces derniers dans l'extrait brut hydro-alcoolique (**Fig. 28**) et la quantité que cela représente en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait (**Tableau 8**). Les cônes contiennent l'ensemble des composés dosés. Même si le DMX n'a pu être quantifié, il a été détecté. Les feuilles contiennent également la plupart des composés phénoliques dosés ici. Les tiges et les rhizomes sont quant à eux plutôt pauvres en ces composés : les dérivés *co-* et *ad-* d'acides amers n'y sont pas retrouvés.



**Figure 28.** Pourcentages des composés phénoliques prénylés majoritaires du houblon, dans les extraits bruts hydro-alcooliques de cônes, de feuilles, de tiges et de rhizomes ; XN : xanthohumol, DMX : desméthylxanthohumol

**Tableau 8.** Concentrations (en µg/mg d'extrait brut ± écart-type) en xanthohumol (XN), desméthylxanthohumol (DMX), *co*-, *ad*- et *n*-humulone ainsi qu'en *co*-, *ad*- et *n*-lupulone dans les différentes parties de pieds femelles de houblon ; ND : composé non détecté, < LOQ : valeur inférieure à la première concentration de la gamme étalon correspondante

	Concentrations dans l'extrait brut (en µg/mg d'extrait brut)			
	Cônes	Feuilles	Tiges	Rhizomes
XN	19,6 ± 1,8	1,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
DMX	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<i>co</i> -Humulone	64,8 ± 6,3	1,0 ± 0,1	ND	ND
Humulone	147,1 ± 1,4	1,8 ± 0,2	0,1 ± 0,0	ND
<i>ad</i> -Humulone	41,9 ± 3,9	0,9 ± 0,1	ND	ND
<i>co</i> -Lupulone	51,3 ± 4,7	2,1 ± 0,3	ND	ND
Lupulone	35,7 ± 3,1	4,3 ± 0,6	< LOQ	< LOQ
<i>ad</i> -Lupulone	17,1 ± 1,2	0,1 ± 0,1	ND	ND

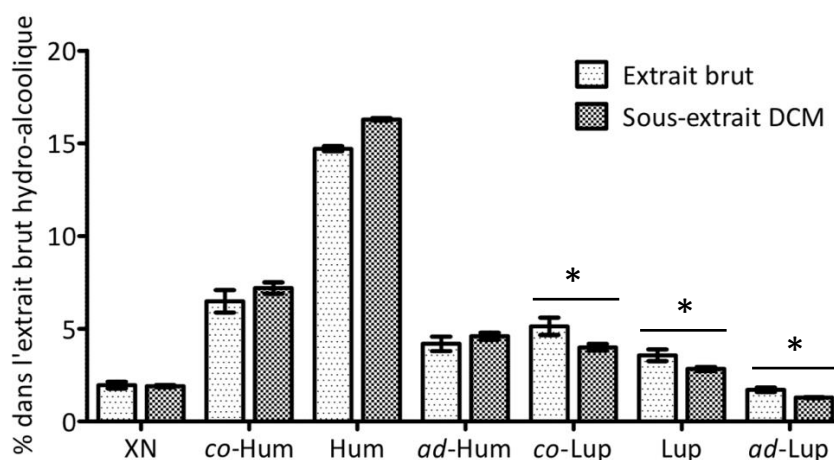
Les acides α sont majoritaires dans les extraits de cônes du cultivar étudié, avec 14,7% d'humulone, 6,5% de *co*-humulone et 4,2% d'*ad*-humulone, soit un total de plus de 25% d'acides α dans l'extrait brut hydro-alcoolique. Les acides β comptent 3,6% de lupulone, 5,1% de *co*-lupulone et 1,7% d'*ad*-lupulone ; soit un total de 10,4% de ces trois dérivés dans l'extrait brut de cônes (**Fig. 28**). Rapportées aux rendements d'extraction, ces valeurs correspondent à 8,83% du poids sec des cônes pour les acides α. Le cultivar Nugget est donc considéré comme un cultivar « amer » (Jelinek et al., 2010). Les acides β représentent 3,67% du poids sec des cônes. Dans la littérature, le pourcentage en acides β totaux varie de 1,1 à 6,5% du poids secs des cônes, selon les cultivars et les années de récolte (De Keukeleire et al., 2007). D'un point de vue des quantités relatives en chacun des dérivés, les acides α sont généralement représentés par l'humulone (30 à 75% des acides α totaux), la *co*-humulone (20 à 65%) puis l'*ad*-humulone (10 à 15%). Les acides β sont répartis de la même manière mais en quantité globalement moins importante, la lupulone représente 30 à 55% des acides β totaux, puis arrivent la *co*-lupulone et l'*ad*-lupulone, qui sont plus minoritaires. Or, dans les cônes du cultivar Nugget, les teneurs en *co*-lupulone sont supérieures à celle de la lupulone (**Tableau 8, Fig. 28**). En effet, les teneurs en acides amers et autres composés phénoliques varient en fonction du cultivar et des conditions de culture (Nickerson et Williams, 1986 ; De Keukeleire et al., 2007 ; Rossini et al., 2016). Prencipe et al. (2014) ont illustré cette variabilité de teneurs en quantifiant les principaux composés phénoliques prénylés du houblon dans plusieurs cultivars. La tendance s'est parfois inversée, avec des teneurs supérieures en acides β par rapport aux acides α. Il est également arrivé que les dérivés *ad*- soient présents en de plus grandes quantités que les dérivés *co*- et *n*-. Farag et al. (2012) ont quant à eux montré que ces métabolites sont davantage concentrés dans la résine des cônes, en comparaison avec les bractées.

Le XN constitue à lui seul, presque 2% de l'extrait brut. Rapporté aux rendements d'extraction, il représente 0,68% du poids sec des cônes. Ces valeurs sont en accord avec les données de la littérature. En effet, le XN varie selon les cultivars entre 0,1 et 1% du poids sec des inflorescences femelles (Stevens et al., 1999 ; Chadwick et al., 2006 ; Prencipe et al., 2014). Le DMX, serait en moyenne 10 fois moins représenté que le XN, avec des teneurs de 0,01 à 0,09% du poids sec des cônes (Prencipe et al., 2014).

Les autres parties de la plante montrent des teneurs, en chacun des composés, inférieures à 0,5%. Les feuilles dénombrent tout de même une certaine diversité en composés phénoliques prénylés, les acides  $\beta$  étant les plus représentés par rapport aux acides  $\alpha$ . La lupulone  $\gamma$  est le composé majoritaire parmi les produits dosés. Abram et al. (2015) ont mis en évidence des teneurs 30 fois moins importantes des composés phénoliques prénylés dans les feuilles de houblon, en comparaison avec les cônes, ce qui correspond aux résultats du dosage. Ces métabolites sont présents en quantités infimes, bien souvent non quantifiables ici, dans les tiges et les rhizomes.

### Résultats du dosage dans les sous-extraits aqueux et DCM de cônes

Les cônes femelles étant les parties d'intérêt pour la suite de cette étude, le comparatif des teneurs en composés prénylés dans l'extrait brut et le sous-extrait DCM ne sera effectué qu'avec ces parties. L'un des objectifs de l'extraction liquide-liquide est de concentrer le sous-extrait DCM en composés d'intérêt. Or, si l'on compare les teneurs dans l'extrait brut et le sous-extrait DCM, il ne semble pas y avoir, en quantité relative, plus de produits dans le sous-extrait DCM (Fig. 29). Une tendance inverse est même constatée pour les dérivés d'acides  $\beta$ . Les métabolites n'étant pas quantifiables dans les sous-extraits aqueux, ils ne sont donc pas représentés dans le graphique suivant. L'intérêt de l'extraction liquide/liquide est donc uniquement d'éliminer les composés beaucoup plus polaires qui ont moins d'intérêt dans notre étude.



**Figure 29.** Comparaison du pourcentage de chaque produit dans l'extrait brut et le sous-extrait DCM de cônes ; les conditions marquées par une étoile montrent une différence significative entre les teneurs dans l'extrait brut et le sous-extrait DCM, après des tests de *t*-student avec  $p = 0,05$  ; XN : xanthohumol, co-Hum : co-humulone, Hum : humulone, ad-Hum : ad-humulone, co-Lup : co-lupulone, Lup : lupulone, ad-Lup : ad-lupulone

#### 3.1.4. Huile essentielle de cônes

Des essais d'hydro-distillation des diverses parties du houblon ont été effectués à l'aide d'un appareil de Clevenger, afin d'obtenir une huile essentielle de cônes, de feuilles et de tiges séchés. Il pourrait en effet être intéressant de valoriser les sous-produits de culture du houblon (feuilles et tiges). Le rendement s'est avéré être très variable en fonction de la partie de la plante. Une petite goutte a été obtenue pour les feuilles, mais celle-ci s'est retrouvée collée aux parois de l'appareil au cours de la récupération, le rendement était trop faible pour les analyses. Les tiges n'ont, quant à elles, donné aucune huile essentielle. Seuls les cônes ont permis d'avoir une huile essentielle en volume suffisant. C'est donc avec cette dernière que les analyses ont été poursuivies.

A partir des 100 g de poudre de cônes, 590  $\mu\text{L}$  d'huile essentielle sont en moyenne récupérés, soit un rendement de 0,59%. Ces données correspondent aux valeurs de la littérature : l'huile essentielle représente entre 0,1% et 2% du poids sec des cônes (Aberl et Coelhan, 2012 ; Bruneton, 2016). Sur les trois hydro-distillations réalisées au cours des trois années de récolte, la masse volumique moyenne de l'huile essentielle a été estimée à 861  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

L'étude de sa composition par CPG-SM a été réalisée à l'aide du Dr Charles Dermont (EA 7394, ICV), à partir des pieds collectés en septembre 2016. Un seuil arbitraire de 1% pour l'identification des composés a été fixé. Le tableau suivant montre les 15 composés identifiés par CPG-SM. Les indices de Kovats, qui sont des données de référence, ont permis de les identifier avec certitude par comparaison avec la littérature. L'huile essentielle de cônes est composée majoritairement de monoterpènes et de sesquiterpènes volatils, mais également d'acides gras, de cétones et d'aldéhydes (**Tableau 9**). Les monoterpènes sont majoritairement représentés par le  $\beta$ -myrcène (17,7%). Les sesquiterpènes sont, quant à eux, représentés par l' $\alpha$ -humulène (32,5%) et le  $\beta$ -caryophyllène (14,99%). Les autres sesquiterpènes couramment rencontrés dans le houblon, comme le  $\gamma$ -élémane et  $\beta$ -sélinène, n'ont pas été identifiés ici (Bernotiene et al., 2004 ; Akdemir, 2015). Tous les composés identifiés sont connus, les teneurs déterminées sont propres au cultivar Nugget de la ferme Beck (Bailleul, département du Nord). Comme pour les composés phénoliques, des différences de composition de l'huile essentielle sont en effet observées en fonction du cultivar (Kovačević et Kač, 2002) et des facteurs environnementaux tels que les conditions climatiques et le sol (Bernotiene et al., 2004). Néanmoins, dans la plupart des cas, les terpènes majoritaires restent les mêmes.

Tableau 9. Caractérisation des composés de l'huile essentielle de cônes femelles de houblon  $\geq 1\%$  par CPG-SM

Nom du composé	Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	Formule brute	Temps de rétention (minutes)	Pourcentage	Indice de Kovats
$\beta$ -Myrcène	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	16,9	17,7%	792
Linalool	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	24	1,46%	786
Undecanone	170	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O	36,9	1,08%	1238
Acide 4-decenoïque ou Ester de méthyle	184	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	38,1	2,04%	1246
2,6-Octadiénal	252	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	38,3	1,13%	1246
$\beta$ -Caryophyllène	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	45,3	14,99%	1400
$\alpha$ -Humulène	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	47,3	32,50%	1440
Guaiène ou Isolédène ou $\gamma$ -Muuroène	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	48,7	1,87%	1458
Valencène	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	49,1	2,80%	1467
2-Tridecanone	198	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O	49,5	1,15%	1475
$\alpha$ -Sélinène	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	49,7	3,50%	1583
$\gamma$ -Cadinène	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	50,7	1,62%	1491
$\beta$ - et $\delta$ -Cadinène	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	51,3	2,44%	-
Humulène époxyde	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	55,5	2,16%	-
Calarène époxyde ou Aromadendrène époxyde	200	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	56,8	1,25%	-

L'huile essentielle d'inflorescences mâles de houblon montrerait quelques similitudes avec l'huile essentielle de cônes femelles. Le  $\beta$ -myrcène serait absent, mais d'autres terpènes tels que le  $\beta$ -caryophyllène, l' $\alpha$ -humulène et certaines formes de cadinène y ont été décrits (Nickerson et al., 1988).

### 3.2. Purification des composés antimicrobiens

Les composés antimicrobiens du houblon ont été purifiés par fractionnement bioguidé. Le point de départ était le sous-extrait DCM, qui s'est avéré être le plus actif. Le XN, chalcone largement majoritaire dans ce sous-extrait, a d'abord été purifié. La méthode mise au point en CPC a également permis d'obtenir des fractions enrichies en d'autres composés phénoliques prénylés (DMX et dérivés d'acylphloroglucinols), qui ont ensuite été isolés par CLHP préparative.



### 3.2.1. Purification du xanthohumol par CPC

#### Mise au point du système de solvant adapté en CPC

L'étape cruciale pour la mise au point d'une méthode CPC est le choix du système de solvants. Sur la base d'une étude bibliographique, plusieurs systèmes de solvants ont été testés afin de purifier le XN. Pour les systèmes où la molécule semblait se répartir dans les deux phases en CCM, le coefficient de partage (Kd) a été calculé grâce à des analyses complémentaires par CLHP-UV (**Tableau 10**). La méthodologie de calcul est détaillée dans la partie 6.3.1.

**Tableau 10.** Liste des systèmes de solvants évalués pour purifier le xanthohumol (XN) par CPC et Kd attribués par les biais d'analyses en CLHP-UV ; AcOEt : acétate d'éthyle, DCM : dichlorométhane, MeOH : méthanol, CHCl<sub>3</sub> : chloroforme ; ND : Non déterminé

Nom des systèmes de solvants	Composition	Kd (XN)	Source
	Heptane/AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O		
Arizona	N (1:1:1:1)	0,2	(Berthod et al., 2005)
	P (6:5:6:5)	0,7	
	Q (3:2:3:2)	1,8	
	Adapté (5:5:4:3)	1,1	(Chen et al., 2012)
Re	Heptane/Toluène/Acétone/H <sub>2</sub> O (24,8:2,8:50:22,4)	3,8	(Renault et al., 2006)
MaHo1	Heptane/CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O (3:12:6:4)	ND	(Marston et Hostettmann, 2006)
MaHo2	CHCl <sub>3</sub> /DCM/MeOH/H <sub>2</sub> O (2:2:3:2)	ND	
MaHo3	CHCl <sub>3</sub> /DCM/MeOH/H <sub>2</sub> O (4:4:3:2)	ND	

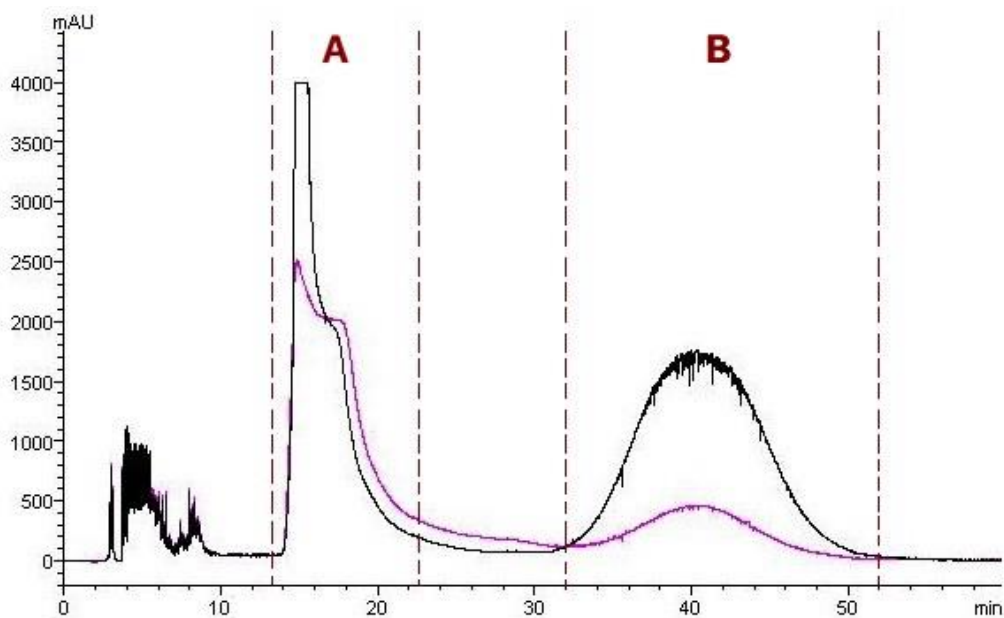
Les systèmes Arizona semblent être les plus efficaces pour purifier le XN. Ceux avec un Kd proche de 1 (P, Q et le système adapté, **Tableau 10**) ont fait l'objet d'un essai avec une petite quantité du sous-extrait DCM afin d'évaluer leur efficacité réelle. Ils ont tous permis de purifier la molécule avec un pourcentage de pureté supérieur à 95%. Ito (2005) ayant préconisé un Kd compris entre 0,5 et 1 - données pour la CCC à grande vitesse applicables en CPC - c'est le système Arizona P que nous avons sélectionné et gardé pour les sessions de purification. De plus, ce système n'est pas cité dans la littérature pour purifier le XN.

Renault et al. (2006) ont également pu obtenir le XN par CPC grâce au système quaternaire suivant : Heptane/Toluène/Acétone/H<sub>2</sub>O (24,8:2,8:50:22,4, v/v). D'après nos essais de mise au point, le Kd était trop éloigné de 1, ce système n'a donc pas été testé en purification. En revanche le système Arizona adapté par Chen et al. (2012) s'est

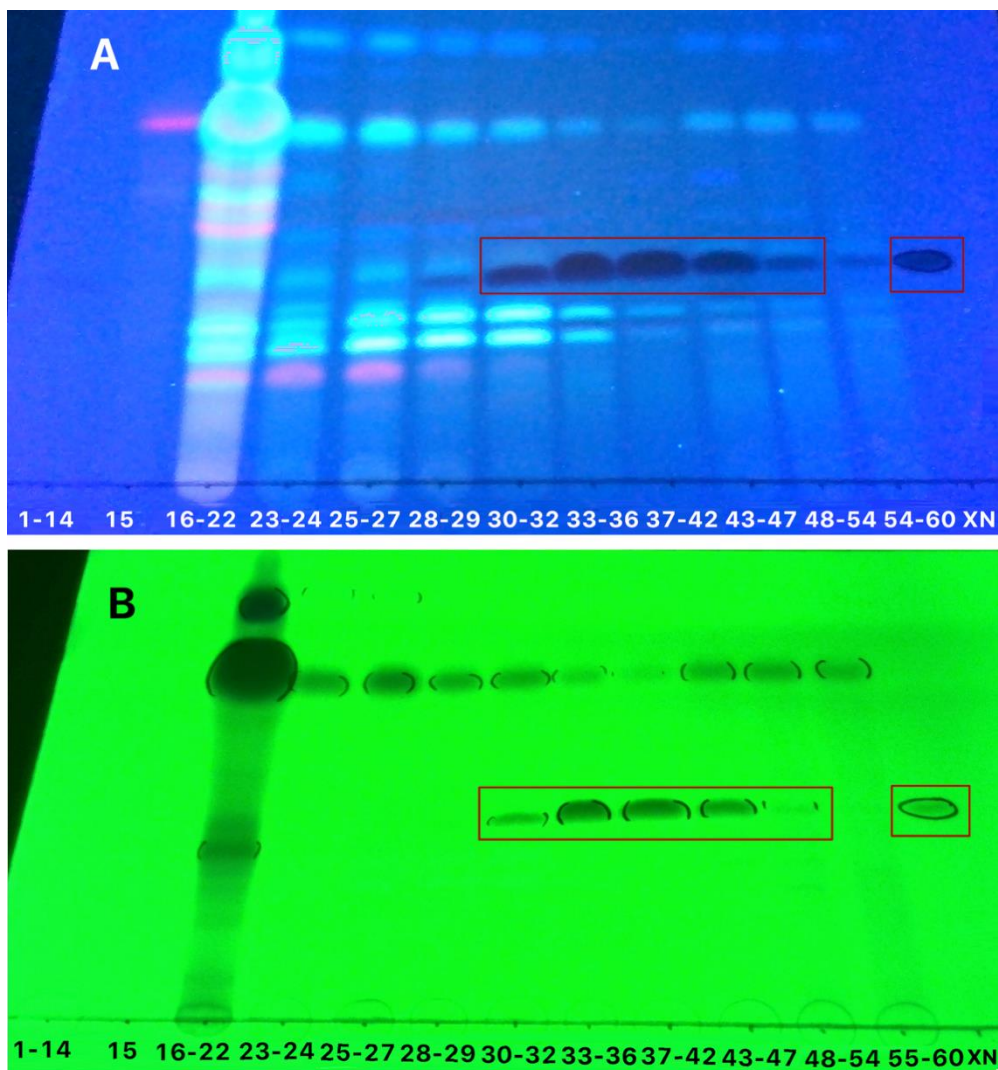
avéré être efficace : Hexane/AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O (5:5:4:3). Les systèmes tirés de Marston et Hostettmann (2006) ont été choisis car ils avaient déjà été utilisés pour purifier des chalcones. Pour la plupart d'entre eux, ils s'agissaient des chalcones ou des flavonoïdes plus polaires, ce qui explique le fait que le XN ne se soit pas bien reparti dans les deux phases. Le K<sub>d</sub> n'a donc pas été déterminé pour ces systèmes.

### Purification du xanthohumol

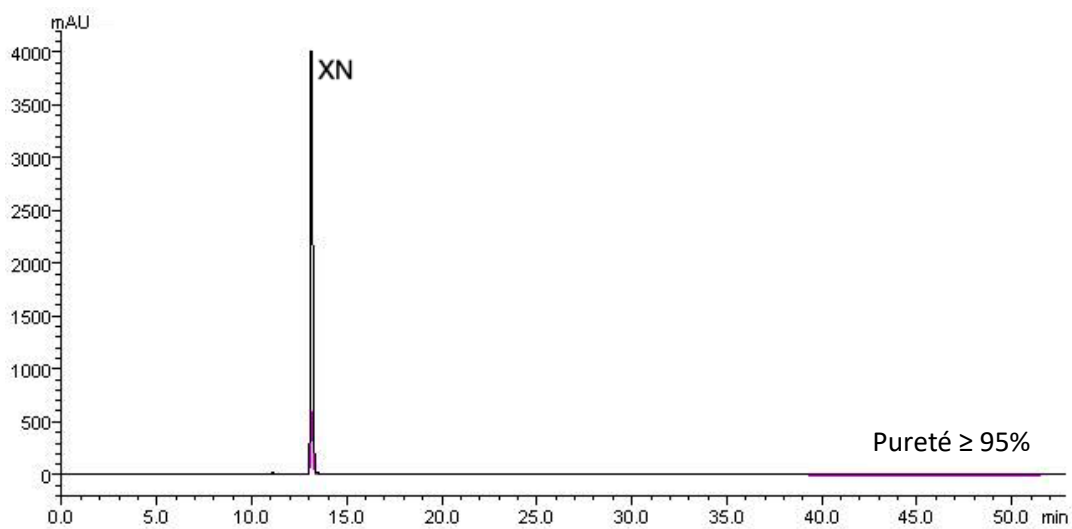
Sur le chromatogramme ci-dessous, l'élution des métabolites du sous-extrait DCM est réalisée en mode ascendant (**Fig. 30**). L'analyse CPC avec le système Arizona P : Heptane/AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O (6:5:6:5) entraîne d'abord l'élution des composés ayant principalement une l'affinité avec la phase mobile, de nature apolaire. Il s'agit des acylphloroglucinols, élués à partir de la 14<sup>ème</sup> minute (zone A **Fig. 30** et fractions 16 à 22 **Fig. 31**). Diverses molécules non identifiées sont ensuite éluées. Le XN est visible à partir de la 30<sup>ème</sup> minute (volume d'élution équivalent au volume du rotor de la CPC, **Fig. 30**). Il sort d'abord en mélange dans les fractions 30 à 32, puis plutôt purifié à partir de la fraction 33 à 42, avant d'être à nouveau en mélange dans les dernières minutes de l'analyse (fractions 43 à 54, **Fig. 31**). L'analyse en CLHP-UV des fractions obtenues les plus pures a permis d'estimer une pureté de l'ordre de 95% et plus (**Fig. 32**) avec cette méthode. Cette dernière a été confirmée par RMN et SM. Les données pour le XN sont présentées dans la partie 3.4.1. Chen et al. (2012) ont purifié le XN par CCC à grande vitesse, leur permettant d'obtenir une pureté de l'ordre de 95,8%.



**Figure 30.** Profil chromatographique de la purification du XN par CPC avec le système Arizona P à 254 (rose) et 370 nm (noir) ; la zone A correspond à l'élution des acylphloroglucinols majoritairement, la zone B montre le XN ; l'extrusion (récupération de la phase stationnaire) n'ayant pas été enregistrée, elle ne figure pas sur ce chromatogramme.



**Figure 31.** CCM des fractions récupérées en CPC lors de la purification du xanthohumol (XN) avec le système Arizona P à 365 nm (A) et 254 nm (B) ; les zones encadrées montrent les fractions où le XN est élué, ainsi que le témoin ; la phase mobile utilisée est Toluène/AcOEt/Acide formique (73:18:9, v/v).



**Figure 32.** Chromatogramme du xanthohumol (XN) purifié par CPC avec la méthode CLHP-UV adaptée au sous-extrait DCM, les lectures sont faites à 370 nm (noir) et 254 nm (rose) ; la pureté est déterminée par CLHP-UV entre 250 et 800 nm.

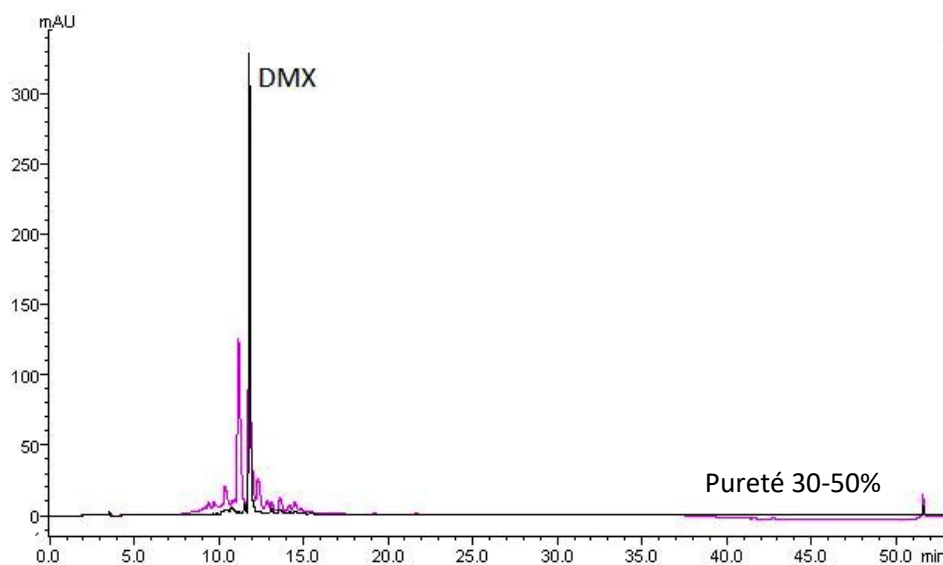
### Remarque

Les dernières sessions de purification ont été effectuées avec un rotor CPC d'un litre. La montée en échelle a très peu modifié l'élution des composés en phase ascendante. Elle a par contre entraîné quelques différences lors de l'extrusion. Le DMX était élué après 20 minutes, contre 5 minutes avec le rotor de 250 mL. La méthode a donc été légèrement modifiée : après les 60 minutes d'analyse en mode ascendant, le rotor est basculé en mode descendant. L'injection des phases s'inverse alors de manière à récupérer l'« ex » phase stationnaire (polaire) qui devient la phase mobile. Dans ce cas, la rotation et le débit ne changent pas, le système est donc moins « perturbé » et le DMX resté accroché à la phase stationnaire, est récupéré plus rapidement.

La purification du XN par CPC avec le système Arizona P a dans le même temps permis de fractionner le sous-extrait DCM. Des fractions enrichies en DMX, ainsi qu'en acylphloroglucinols ont été obtenues.

### 3.2.2. Purification du desméthylxanthohumol

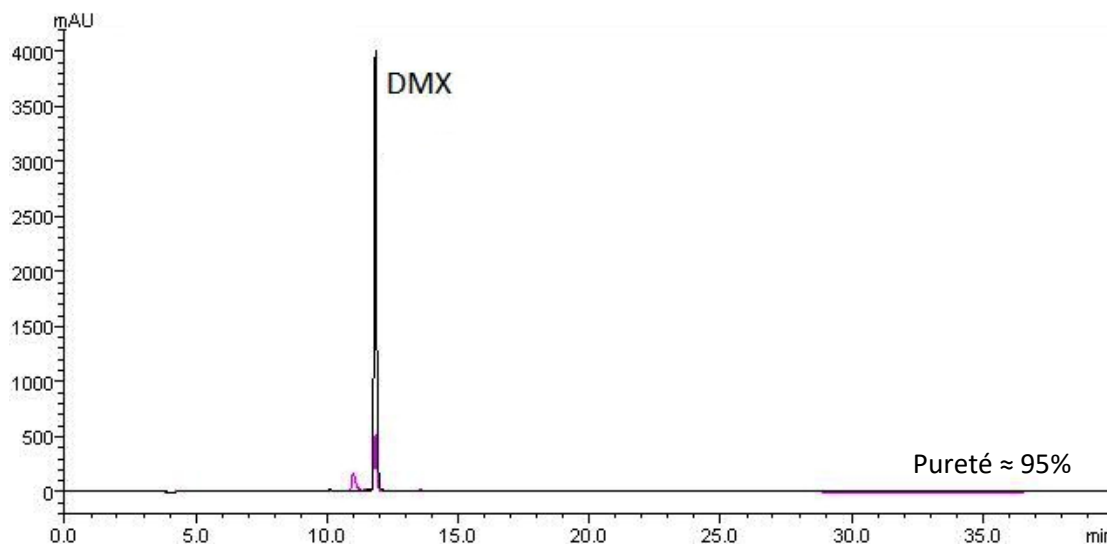
Lors de l'extrusion (récupération de la phase stationnaire) ou du passage en mode descendant, avec le système Arizona P, le DMX est récupéré dans une fraction où il apparaît majoritaire (entre 30 et 50%, **Fig. 33**).



**Figure 33.** Chromatogramme CLHP-UV de la fraction enrichie en desméthylxanthohumol (DMX) récupérée en extrusion, ou passage en mode descendant, avec le système Arizona P à 370 nm (noir) et 254 nm (rose) ; le degré de purification est estimé par CLHP-UV entre 250 et 800 nm.

Après purification par CLHP préparative, la molécule est obtenue pure. En fonction des analyses, le degré de pureté varie de 90 à 98% (**Fig. 34**). En effet, dans la fraction récupérée en extrusion, il peut arriver que le DMX élué proche d'autres composés qui

« gène » sa purification (**Fig. 33**). Il est alors difficilement totalement isolable en CLHP préparative, même après réduction du débit. Néanmoins, une pureté minimale de 95% est exigée pour la réalisation des tests biologiques. Cette dernière est estimée par CLHP-UV entre 250 et 800 nm, puis confirmée par RMN et SM. Les données pour le DMX sont présentées dans la partie 3.4.1.

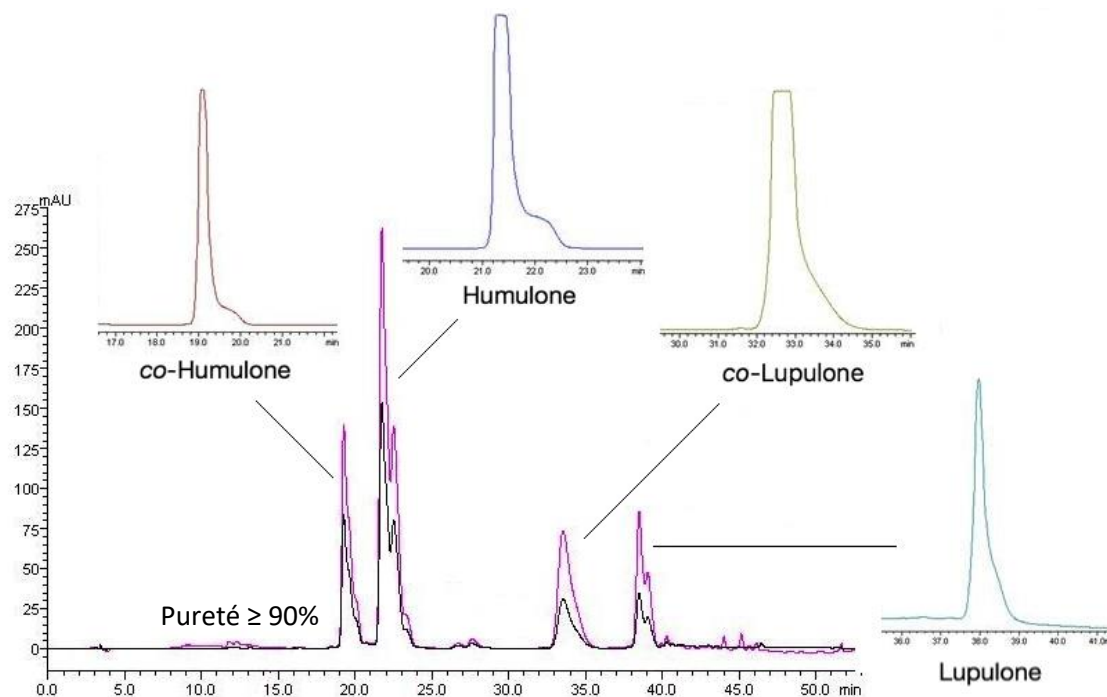


**Figure 34.** Chromatogramme CLHP-UV du desméthylxanthohumol (DMX) purifié après CLHP préparative à 370 nm (noir) et 254 nm (rose) ; la pureté est estimée par CLHP-UV entre 250 et 800 nm.

Le DMX étant minoritaire, les fractions de CPC doivent être accumulées pour avoir une quantité suffisante pour les tests biologiques, à la différence du XN. Comme nous le verrons dans le chapitre 4, le DMX fait partie des bons candidats dans notre étude, plusieurs essais afin de trouver une méthode de purification plus efficace ont été réalisés (détails dans la partie 3.3.1.)

### 3.2.3. Purification des dérivés prénylés d'acylphloroglucinols

Les acylphloroglucinols ont été purifiés par CLHP préparative à partir de la fraction enrichie élue dans les 20 premières minutes de la CPC avec le système Arizona P (fraction 16-22 de la **figure 31**). La co-humulone et l'humulone sont obtenus assez facilement avec cette méthode (**Fig. 35**). A l'inverse, les dérivés de la lupulone sont plus difficiles à purifier avec une pureté acceptable pour les tests biologiques ( $\geq 95\%$ ). Avec cette méthode, ils co-éluent bien souvent avec des impuretés plus polaires. Les structures proches des différents dérivés rendent d'autant plus difficile leur séparation. Comme pour le DMX, certains dérivés d'acylphloroglucinols sont minoritaires, particulièrement les acides  $\beta$ , qui ont donc dû être accumulés pour les tests biologiques. Comme nous le verrons dans le chapitre 4, la lupulone fait partie des bons candidats antibactériens, un système de purification par CPC a donc été recherché de manière à l'obtenir plus facilement (détails dans la partie 3.3.2.). À nouveau, les données de RMN et de SM sont disponibles dans la partie 3.4.2.

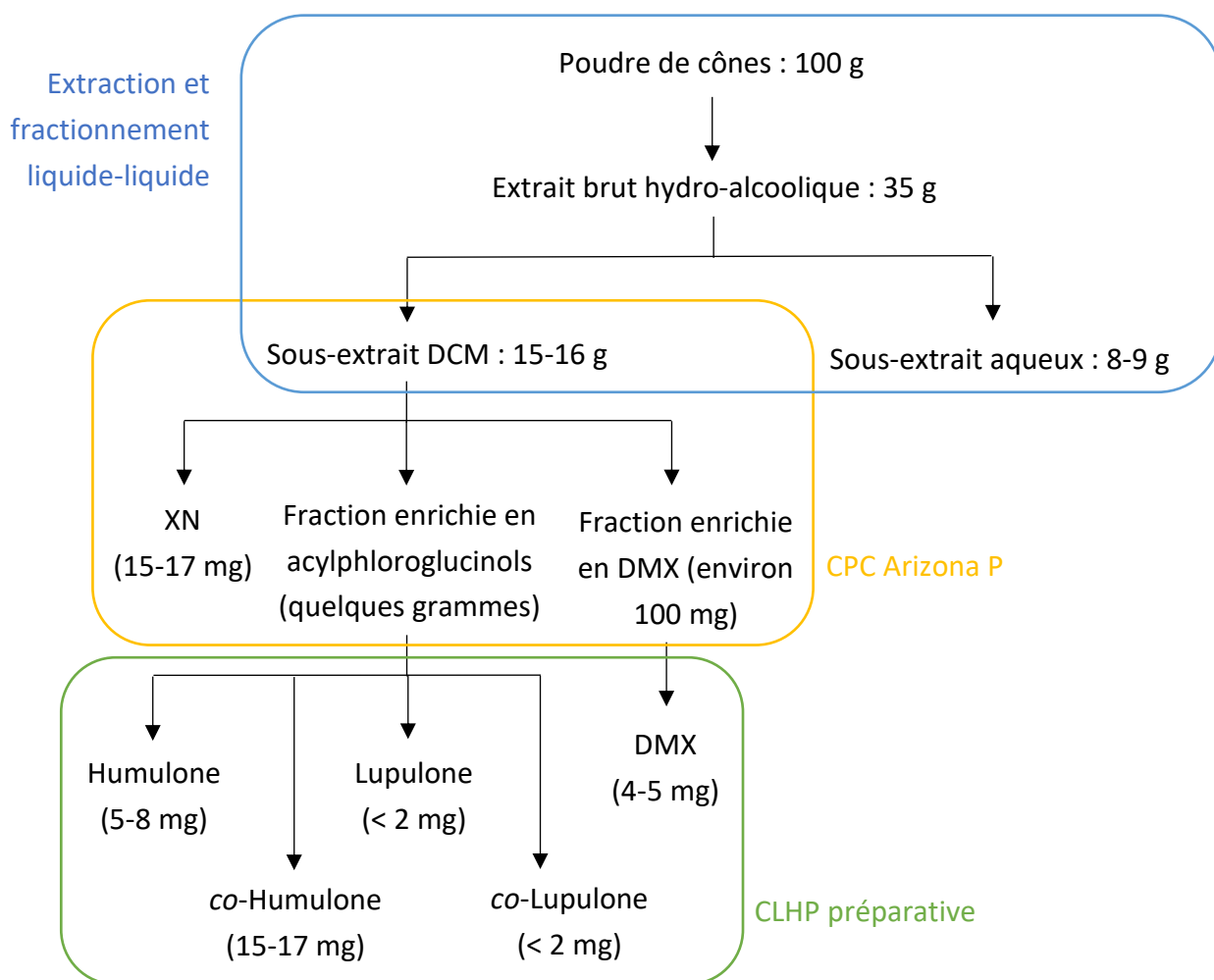


**Figure 35.** Chromatogramme CLHP-UV de la fraction enrichie en acylphloroglucinol, récupérée après CPC avec le système Arizona P à 370 nm (noir) et 254 nm (rose) avec les composés purifiés (représentés de différentes couleurs) à 254 nm ; la pureté est estimée par CLHP-UV entre 250 et 800 nm.

### 3.2.4. Rendements en composés d'intérêt

Comme mentionné précédemment, certains des composés phénoliques prénylés du houblon sont minoritaires et doivent faire l'objet de plusieurs sessions de purification pour être accumulés en quantités suffisantes pour les tests biologiques. Les différentes étapes nécessaires pour leur purification sont autant de points clés pouvant conduire à des pertes de rendement.

La **figure 36** donne une idée des rendements en divers composés. Ces derniers sont approximatifs car les fractions obtenues sont variables et les produits peuvent avoir plusieurs degrés de pureté. Rapportés aux 100 g de poudre de cônes initiaux, les rendements en XN, acides  $\alpha$  et acides  $\beta$  (*n*- et *co*-) correspondent respectivement à 1,5-1,7% ; 2-2,5% et 0,4%. Comparés aux pourcentages obtenus lors du dosage (partie 3.1.3.), les pertes en XN sont assez faibles, au contraire des acides  $\alpha$  et acides  $\beta$  pour lesquelles deux étapes de purification sont nécessaires, accentuant ainsi les pertes de produits.



**Figure 36.** Schéma de purification des composés phénoliques prénylés du houblon, avec les quantités approximatives obtenues pour chaque fraction et chaque produit purifié, à partir de 100 g de poudre de cônes secs. XN : xanthohumol, DMX : desméthylxanthohumol

### 3.3. Axes d'amélioration du processus de purification

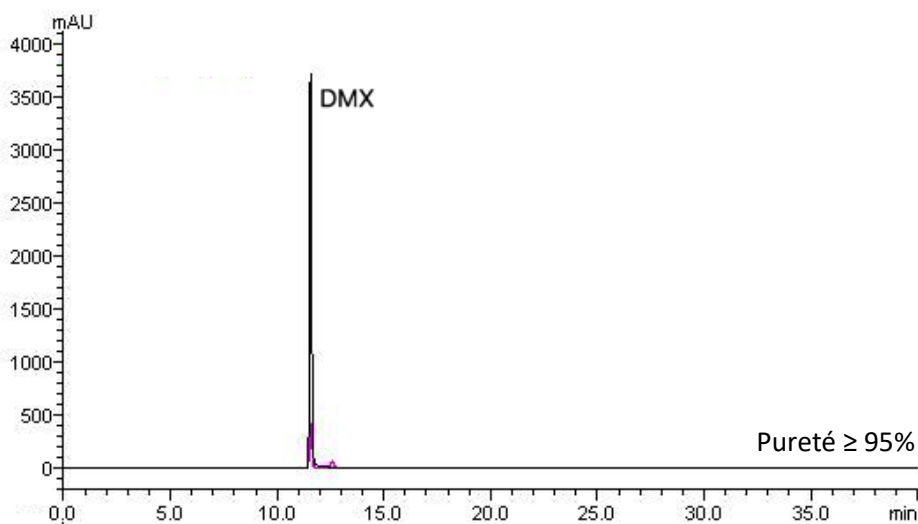
#### 3.3.1. Cas du desméthylxanthohumol

##### La colonne ouverte en phase normale

L'efficacité de cette méthode a été comparée à celle de la CLHP préparative. En effet, la fraction enrichie en DMX obtenue suite à la CPC avec le système Arizona P a été utilisée dans le but d'essayer de mieux séparer le DMX du produit qui élu très proche de lui à 254 nm (**Fig. 33**).

Au cours de l'élution sur colonne ouverte en phase normale (silice de porosité 60, 0,040 - 0,063 mm), un gradient DCM/MeOH a été utilisé, avec augmentation progressive de la proportion de MeOH (détails dans la partie 6.4.1.). Le DMX a été élu au cours du palier DCM/MeOH (99,5:0,5, v/v). Les fractions qui semblaient contenir le DMX seul ont été regroupées. Au total, 4,9 mg de fractions contenant le DMX pur entre 83 et 95% ont été récupérés en sortie de colonne. La fraction la plus propre a été obtenue avec 95,3%

de pureté (**Fig. 37**). Il a cependant été constaté que même dans la fraction la moins propre, contenant seulement 33% de DMX, celui-ci est cette fois-ci séparé du produit éluant avec un temps de rétention très proche en CLHP préparative. Néanmoins, le temps passé à réaliser la purification de cette façon et les volumes de solvants utilisés nous ont finalement conduits à ne pas retenir cette méthode pour la purification du DMX en routine, la CLHP étant plus rapide et plus économique en consommables.



**Figure 37.** Chromatogramme CLHP-UV de la fraction la plus pure en desméthylxanthohumol (DMX), obtenue par colonne ouverte de silice fine ; la pureté est estimée par CLHP-UV entre 250 et 800 nm.

### Mise au point d'une méthode CPC propre au desméthylxanthohumol

Dans le cadre du stage de Yogan Cambré (3<sup>ème</sup> année de Licence Qualité et Environnement des Productions Industrielles, Lille, 2017-2018), des essais de mise au point d'une méthode de purification du DMX par CPC ont été réalisés. Le point de départ étant à nouveau, la fraction enrichie en DMX obtenue après une première CPC avec le système Arizona P. Cette méthode serait utilisée en deuxième étape.

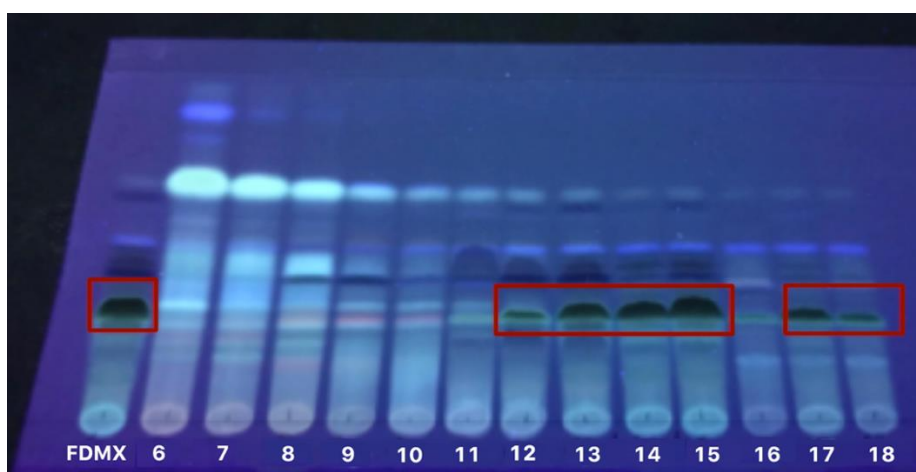
Les systèmes testés ont été choisis sur la base d'une étude bibliographique. Certains systèmes précédemment étudiés pour purifier le XN ont également été testés (**Tableau 11**). À nouveau, les systèmes Arizona semblent être plutôt intéressants pour purifier le DMX. Les systèmes  $K\alpha$  et  $K\beta$  ont été adaptés du système Arizona K car celui-ci s'est avéré être le plus prometteur. Le  $K_d$  obtenu pour le système  $K\beta$  (1,27) est le plus proche de 1. Il a donc été sélectionné pour un essai en CPC, d'abord sur la fraction enrichie en DMX. Le profil chromatographique de l'analyse CPC correspondante n'est pas présenté ici, le DMX n'y étant que très peu visible. La **figure 38** montre en revanche, les CCM des différentes fractions récupérées. Les acylphloroglucinols ne semblaient pas présents dans la fraction DMX totale. Or, ils sont élués pendant les premières minutes de l'analyse, ils s'y trouvent donc tout de même en petite quantité. D'autres composés non identifiés sont ensuite élués. Le DMX sort au niveau de la fraction 12, correspondant à un peu moins de 30 minutes d'analyses (volume d'éluant équivalent au volume du



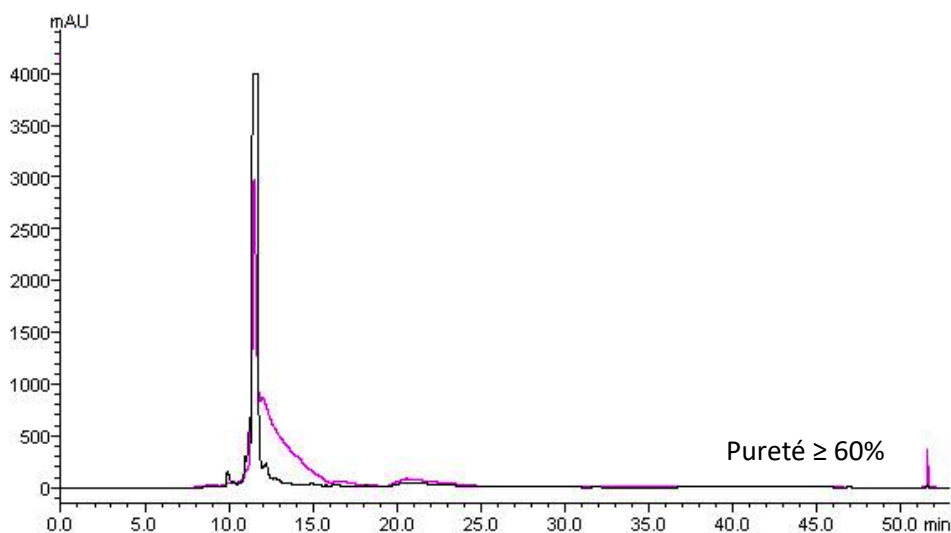
rotor). Les fractions encadrées sur la CCM (**Fig. 38**) contenant le DMX ne semblent pas pures. Les analyses en CLHP-UV réalisées sur ces dernières montrent qu'en effet le DMX co-élué avec d'autres composés. La pureté obtenue est tout de même légèrement supérieure à la fraction initiale, avec un taux de purification supérieur à 60% (**Fig. 39**).

**Tableau 11.** Liste des systèmes de solvants évalués pour purifier le desméthylxanthohumol (DMX) par CPC et Kd attribués par le biais d'analyses en CLHP-UV ; ND : Non déterminé

Nom des systèmes de solvants	Composition	Kd (DMX)	Source	
Heptane/AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O				
H	(1:3:1:3)	1,98	(Berthod et al., 2005)	
J	(2:5:2:5)	4,1		
K	(1:2:1:2)	1,44		
L	(2:3:2:3)	0,6		
Arizona	K $\alpha$	(1,5:2,5:1,5:2,5)	0,4	Adapté du système Arizona K
	K $\beta$	(1,5:2:1,5:2)	1,27	
	Ma1	(1:1:0,7:1)	0,07	(Ma et al., 2010)
	Ma2	(1:2:0,8:0,9)	0,06	
	Lu1	(5:5:7:3)	ND	(Lu et al., 2007)
Che	CHCl <sub>3</sub> /DCM/MeOH/H <sub>2</sub> O (4:3:2)	ND	(Chen et al., 2012)	
MaHo1	Heptane/Toluène/Acétone/H <sub>2</sub> O (24,8:2,8:50:22,4)	ND	(Marston et Hostettmann, 2006)	
MaHo2	CHCl <sub>3</sub> /DCM/MeOH/H <sub>2</sub> O (2:2:3:2)	ND		
MaHo3	(4:4:3:2)	ND		

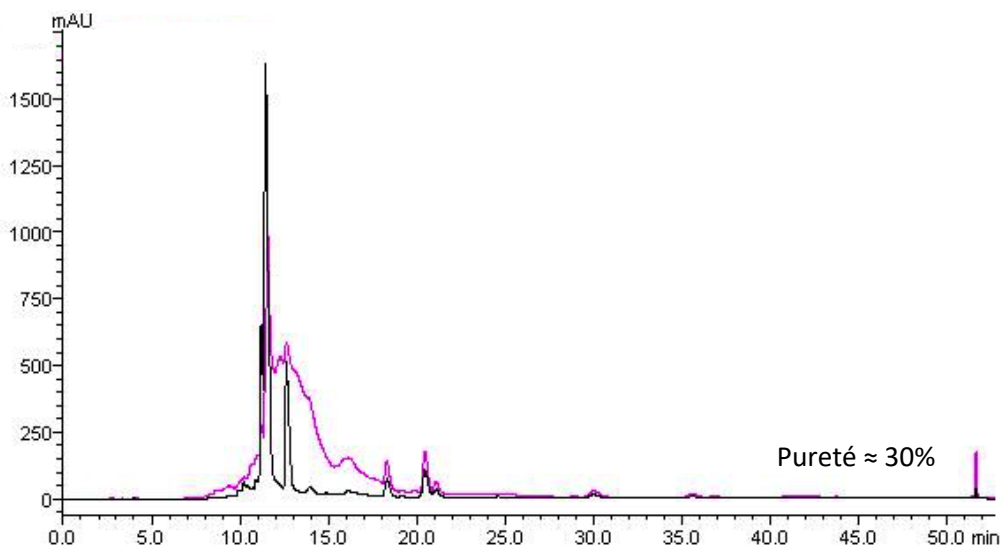


**Figure 38.** CCM des fractions récupérées en CPC lors de la purification du desméthylxanthohumol (DMX) avec le système Arizona K $\beta$  à 365 nm à partir de la fraction enrichie en DMX (FDMX) ; les zones encadrées montrent les fractions où le DMX est élué, ainsi que le témoin ; la phase mobile utilisée est Toluène/AcOEt/Acide formique (73:18:9, v/v).



**Figure 39.** Chromatogramme du desméthylxanthohumol (DMX) purifié par CPC à partir de la fraction enrichie en DMX, avec le système Arizona K $\beta$ . Les lectures sont faites à 370 nm (noir) et 254 nm (rose) ; la pureté est estimée par CLHP-UV entre 250 et 800 nm.

L'objectif étant de diminuer les étapes de purification au maximum, un essai a également été effectué directement à partir du sous-extrait DCM. À nouveau, cette méthode n'a pas permis d'obtenir le DMX suffisamment pur pour les analyses biologiques. Bien que le produit ait été séparé quasiment complètement des acylphloroglucinols et du XN, le pourcentage de pureté obtenu était de 30% (**Fig. 40**), ce qui équivaut à la fraction enrichie obtenu avec le système Arizona P permettant de purifier le XN (**Fig. 33**). Toutefois, la mise au point n'a pas été directement réalisée sur le sous-extrait DCM, pouvant expliquer ces résultats non-satisfaisants.



**Figure 40.** Chromatogramme du desméthylxanthohumol (DMX) purifié par CPC à partir du sous-extrait DCM, avec le système Arizona K $\beta$ . Les lectures sont faites à 370 nm (noir) et 254 nm (rose) ; la pureté est estimée par CLHP-UV entre 250 et 800 nm.

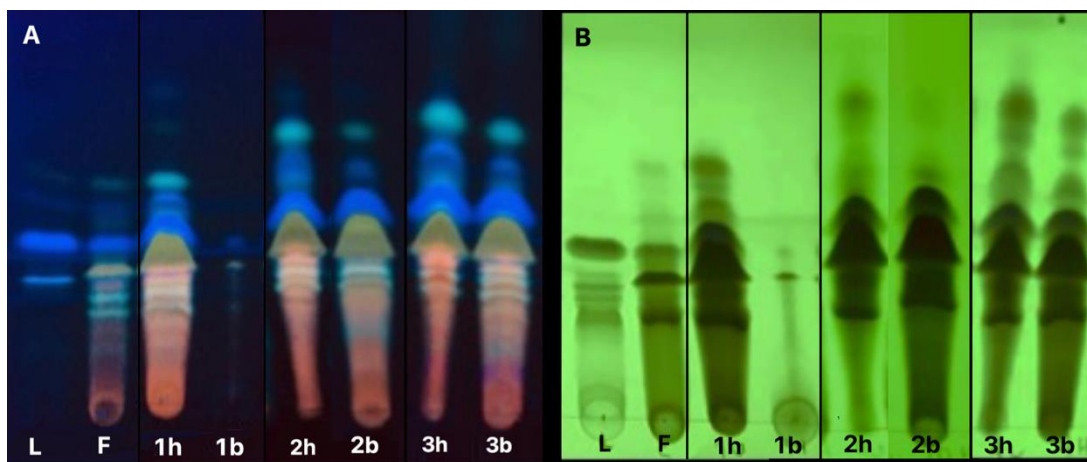
À titre de comparaison, aucune publication n'est disponible dans la littérature concernant la purification du DMX. Il est en général synthétisé chimiquement. Diller et

al. (2005) ainsi que Vogel et al. (2008), l'obtiennent, par exemple, par succession de réactions impliquant une acétophénone dont la fonction méthoxy est protégée, avec le benzaldéhyde.

### 3.3.2. Cas de la lupulone

Dans le cadre du stage de Violette Hamers (3<sup>ème</sup> année de Licence Sciences Technologies, Santé, spécialité Biologie Cellulaire et Physiologie, Lille, 2017-2018) et de Daniela Guesmundo (étudiante Erasmus en 3<sup>ème</sup> année d'études de pharmacie, Italie, 2017-2018), nous avons cherché à mettre au point un système CPC pour purifier la lupulone, à partir de la fraction enrichie en acylphloroglucinol obtenue de la CPC avec le système Arizona P. À nouveau, cette méthode serait utilisée en deuxième étape.

La lupulone est particulièrement difficile à isoler. En plus d'être retrouvée en mélange avec de nombreux dérivés de structure très proche, sa polarité est peu différente de celle des acides  $\alpha$ . Dans un premier temps, onze systèmes de solvants ont été criblés sur la base d'une recherche bibliographique. L'idée est d'obtenir un Kd proche de 1 pour les acides  $\beta$  et d'avoir les acides  $\alpha$  élués dans une seule phase, ou inversement. À titre d'exemple, certains systèmes sont présentés. Il a été confirmé qu'en travaillant uniquement avec la polarité des phases, les acides  $\alpha$  et  $\beta$  se répartissent de la même manière, soit dans les deux phases (systèmes 2 et 3, **Fig. 41**), soit dans la même phase (système 1, **Fig. 41**) qui est en l'occurrence, la plus apolaire.

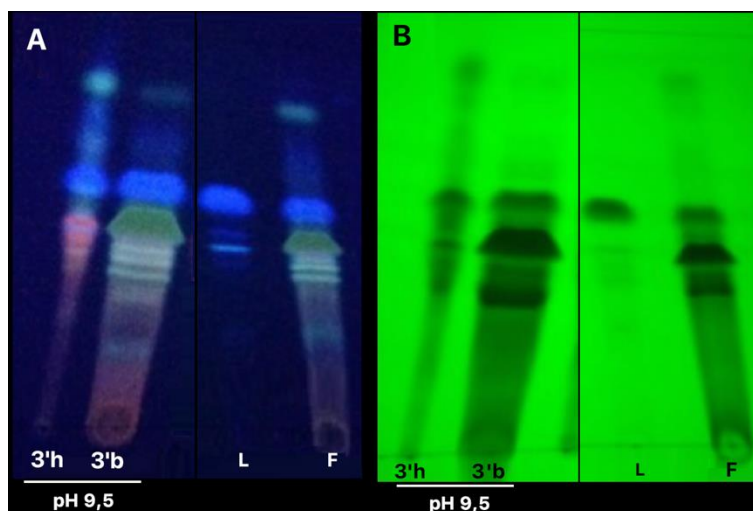


**Figure 41.** Exemples de trois systèmes de solvants testés pour la mise au point d'une méthode CPC permettant de purifier la lupulone à 365 (A) et 254 nm (B) ; les compositions des systèmes sont présentées dans le **tableau 12** (b : phase la plus dense, h : phase la moins dense) ; pour ces essais, la phase mobile en CCM a été adaptée de manière à ce que la lupulone montre un Rf proche de 0,5 : Heptane/n-Propanol/Acide formique (90:15:0,5, v/v) ; le témoin lupulone (L) montre la position du composé dans la fraction enrichie en acylphloroglucinol (F) et dans les diverses phases ; les acides  $\alpha$  sont représentés par la tâche jaune présente en dessous de la lupulone.

Comme introduit dans la partie 2.2.3., l'une des pistes pour séparer les acides amers du houblon, est de travailler avec des systèmes tamponnés. Le fait de modifier le pH des phases aqueuses permet d'ajouter un paramètre discriminant : le pKa. La réaction associée est la suivante : lorsque le pH est supérieur au pKa, les fonctions phénols des

molécules perdent un proton et se transforment en phénolates. On dit qu'ils se dissocient, ils deviennent alors solubles dans l'eau. Dans la théorie cette solution paraît prometteuse. Hermans-Lokkerbol et al. (1997) ont déterminé un pas de 2 entre les pKa des acides  $\alpha$  et des acides  $\beta$  dans leurs systèmes. Si on ajuste le pH de la phase aqueuse entre le pKa des deux groupes, les acides  $\alpha$  devraient se concentrer dans celle-ci. Les acides  $\beta$  pourraient alors garder une répartition dans les deux phases, comme obtenu avec les systèmes 2 et 3 (**Fig. 41**).

En suivant ce raisonnement, nous avons décidé de modifier le pH des phases polaires des systèmes. Le premier objectif étant de séparer les acides  $\alpha$  des acides  $\beta$ , nous avons adapté le système 3 qui montrait une petite différence de Kd entre les acides  $\alpha$  et  $\beta$  (**Tableau 12**). Le pH de la phase la plus polaire, constituée d'ACN et de diéthylamine à 0,2 M, a été ajustée à 9,5 à l'aide d'acide chlorhydrique 4M. Cette phase a ensuite été saturée avec de l'heptane et du MTBe (10:10:1, v/v) (système 3'). En effet, ces nouvelles conditions entraînent une répartition différente des acides  $\alpha$  et  $\beta$  (**Fig. 42**). Comme attendu, les acides  $\alpha$  étant à priori sous la forme phénolate, ils sont solubles dans la phase la plus polaire (phase la plus dense : 3'b). Ils se trouvent uniquement dans cette dernière, contrairement aux acides  $\beta$  qui semblent mieux répartis. Même si les Kd obtenus sont éloignés de 1, la petite différence de Kd observée avec le système 1 entre les acides  $\beta$  et les acides  $\alpha$  s'accroît pour le système 3' avec une inversion d'affinité (**Tableau 12**). Cet écart pourrait probablement être davantage creusé, afin d'optimiser la séparation des deux groupes d'acides amers. De plus, un problème de reproductibilité a été constaté. Lorsque ce même essai est réalisé plusieurs fois, la lupulone ne se disperse pas toujours dans les deux phases. La mise au point sera poursuivie les prochains mois.



**Figure 42.** Exemple d'un système de solvants pour la mise au point d'une méthode CPC permettant de purifier la lupulone avec régulation du pH à 9,5. La composition du système est présentée dans le **tableau 11** (b = phase la plus dense, h = phase la moins dense) ; pour ces essais, la phase mobile en CCM a été adaptée de manière à ce que la lupulone possède un Rf de 0,5 : Heptane/n-Propanol/Acide formique (90:15:0,5, v/v) ; lecture à 365 (A) et 254 nm (B) ; le témoin lupulone (L) montre la position de ce composé dans la fraction enrichie en acylphloroglucinol (F) et dans les diverses phases ; les acides  $\alpha$  sont représentés par la tâche jaune présente en dessous de la lupulone.

**Tableau 12.** Exemples d'essais de systèmes pour la mise au point d'une méthode de purification de la lupulone par CPC avec les coefficients de partage correspondants (Kd) déterminés par CLHP-UV ; le premier objectif étant de séparer les acides  $\alpha$  des acides  $\beta$ , les Kd ont été déterminés pour les acides amers majoritaires en incluant les acides  $\alpha$  (humulone et *co*-humulone) et les acides  $\beta$  (lupulone et *co*-lupulone) ; AcOEt : acétate d'éthyle, MeOH : méthanol, MTBe : éther de méthyl-*tert*-tiobutyle, ACN : acétonitrile

N°	Système	pH	Kd				Source
			<i>co</i> -Hum	Humulone	<i>co</i> -Lup	Lupulone	
1	Heptane/AcOEt/MeOH/Acide acétique/H <sub>2</sub> O (1:6:1,5:1,5:8, v/v)	-	-	-	-	-	(Hubert et al., 2014)
2	Heptane/AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O (2:1:2:1, v/v)	-	0,45	0,5	0,43	0,47	(Berthod et al., 2005)
3	Heptane/MTBe/ACN (10:1:10, v/v)	-	0,25	0,26	0,14	0,11	(Fischer et al., 1991)
3'	Heptane/MTBe/ACN 0,2M diéthylamine (10:1:10, v/v)	9,5	0,16	0,21	0,29	0,34	

D'un point de vue pratique, le fait de travailler sur le pH des phases a déjà été un succès pour purifier les acides amers. À partir d'un extrait de houblon obtenu par CO<sub>2</sub> supercritique, Hermans-Lokkerbol et Verpoorte (1994) ont séparé les dérivés majoritaires d'humulones (*n*-, *co*-, *ad*-) par le biais d'un système constitué à 0,1M de triéthanolamine dans la phase aqueuse et dont le pH est ajusté à 8,4 afin d'être bien au-dessus du pKa de l'humulone, qui serait proche de 5 (Simpson, 1993) ; cette phase a ensuite été saturée avec du toluène pour former la seconde phase. Une deuxième méthode a été mise au point pour séparer de manière efficace les acides  $\beta$ , en utilisant une phase aqueuse à 0,2M de diéthanolamine et dont le pH a été ajusté à 9,75 ; la phase organique est constituée de MeOH rajouté à posteriori (4:1, v/v) (Hermans-Lokkerbol et al., 1997). Avec ces deux systèmes, ils ont montré que les acides  $\beta$  seraient légèrement plus faibles que les acides  $\alpha$ . Ces derniers se dissocient à pH 8,4 alors qu'un pH supérieur à 10 est nécessaire pour dissocier les acides  $\beta$ . Sur le même principe, ils avaient préalablement déjà développé une méthode de CLHP en phase inverse pour analyser les acides amers du houblon (Hermans-Lokkerbol et Verpoorte, 1994b). Ces deux systèmes ont également été testés avec la fraction enrichie en acylphloroglucinols. Le di- ou tri-éthanolamine a été remplacé par du di- ou tri-éthylamine. Malheureusement, ces systèmes se sont avérés inefficaces dans les conditions choisies. En plus de former une émulsion au niveau de la phase aqueuse, les acides amers se sont tous regroupés dans la phase apolaire (données non présentées).

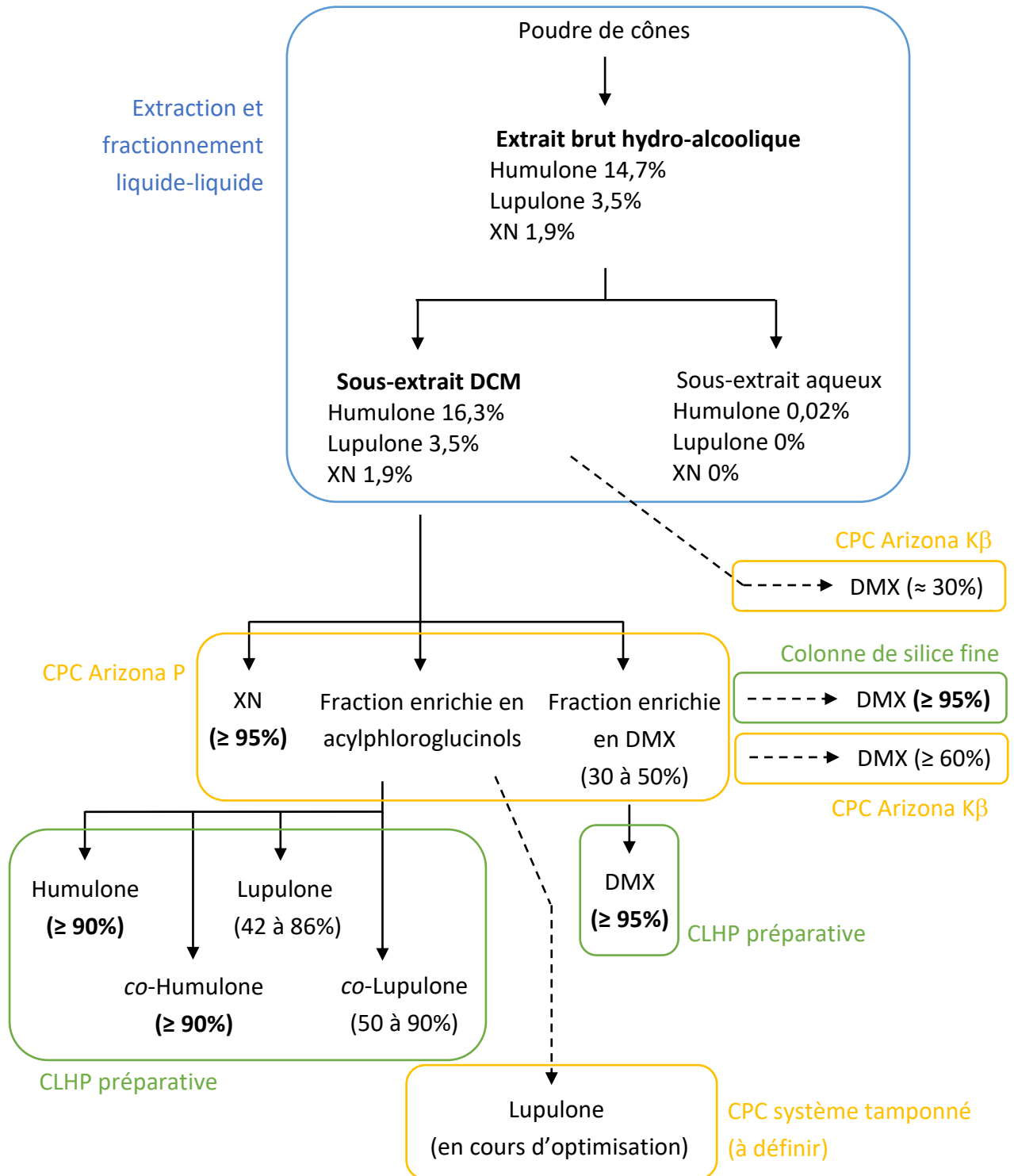
*Remarque*

Simpson (1993) a montré que selon le solvant utilisé, les valeurs de pKa des acides amers du houblon varient. Par exemple, dans l'eau le pKa de la *co*-lupulone est 6,1 et celui de l'humulone est de 5 ; dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) celui de la *co*-lupulone est de 6,3 et celui de l'humulone est en moyenne de 4,3. Hermans-Lokkerbol et al. (1997) ont, quant à eux, mis en évidence des pKa bien différents entre les acides  $\alpha$  et les acides  $\beta$ . En travaillant dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (4:1, v/v), ils ont déterminé des valeurs de 4,7 ; 5,5 et 5,7 pour les *co*-, *n*- et *ad*-humulone respectivement. Les acides  $\beta$  étant dissociés plutôt à pH > 10, ils auraient un pKa largement supérieur.

**3.3.3. Résumé des essais d'amélioration du processus de purification**

Les différents essais de mise au point sont représentés sur le schéma suivant par des flèches en pointillés, avec les taux de purification correspondants (**Fig. 43**).

Malgré les divers essais d'amélioration du processus pour la purification du DMX et de la lupulone, nous n'avons pas été en mesure de trouver une alternative plus efficace au processus de purification initial (partie 3.2.). Pour le DMX, l'essai de purification sur colonne de silice fine s'est avéré être un succès, mais davantage chronophage et consommateur de solvants par rapport à la CLHP préparative. La méthode mise au point en CPC n'a en revanche pas permis de purifier la molécule. À partir du sous-extrait DCM, nous avons plutôt obtenu une fraction enrichie en DMX, au même titre que la méthode CPC Arizona P. Concernant la lupulone, la modification du pH des phases semble prometteuse mais la mise au point nécessite d'être encore travaillée. Le fait de jouer sur le pH des phases et/ou d'alterner les modes ascendants et descendants en CPC, pourraient être des pistes.



**Figure 43.** Schéma récapitulatif des divers essais de méthodes de purification des composés phénoliques prénylés du houblon avec les taux de purification correspondant, évalués en CLHP-UV entre 250 et 800 nm, ceux écrits en gras représentent les méthodes les plus efficaces ; le processus initial est représenté par les flèches en trait plein ; les essais d'amélioration pour la purification du desméthylxanthohumol (DMX) et de la lupulone sont représentés par les flèches en pointillés ; XN : xanthohumol

### 3.4. Élucloration structurale des produits purifiés

#### 3.4.1. Les chalcones

Les structures des chalcones prénylées identifiées sont présentées dans la **figure 44**.

En HR-SM, la masse théorique  $m/z$  déterminée pour le XN en mode positif est  $[M+H]^+$  355,1552  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_5$ ). La masse  $m/z$  déterminée pour le DMX est  $[M+H]^+$  341,1397  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_5$ ). Le **tableau 13** montre les attributions en protons et carbones déduites des spectres RMN mono- et bi-dimensionnels. Ces données sont en accord avec la littérature (Vogel et al., 2008 ; Česlová et al., 2009).

#### 3.4.2. Les dérivés d'acylphloroglucinols

La structure des acylphloroglucinols identifiés sont présentées dans la **figure 45** pour les acides  $\alpha$  et la **figure 46** pour les acides  $\beta$ .

L'identification des acides amers par HR-SM n'a pas été réalisée systématiquement car les données RMN et les temps de rétention en CLHP-UV étaient parfois suffisants. Toutefois, la *co*-humulone et l'humulone ont montré des masses théoriques  $m/z$  en mode positif  $[M+H]^+$  de 349,2024 ( $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{O}_5$ ) et de 363,2178 ( $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_5$ ) respectivement. Par ailleurs, les analyses en CLUHP-SM ultérieures ont confirmé la masse de nos produits d'intérêt présents sur le chromatogramme.

Le **tableau 14** pour les acides  $\alpha$  et le **tableau 15** pour les acides  $\beta$ , montrent les attributions des protons et des carbones déduites des spectres RMN 1D et 2D. Ces données sont en accord avec la littérature (Intelmann et al., 2009 ; Farag et al., 2012).



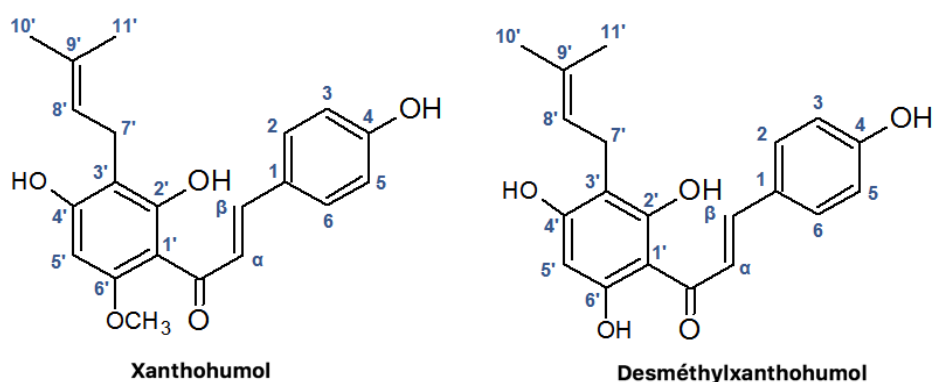


Figure 44. Structures et numérotations des chalcones prénylés purifiées

Tableau 13. Attributions des signaux  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  des chalcones à partir des spectres RMN 1D et 2D dans le MeOH deutéré (MeOD) ; s : singulet, d : doublet, t : triplet, J : constante de couplage en Hz

Carbone	Composé			
	XN		DMX	
	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1		127		127,2
2	7,50 (d, J = 8,6 Hz)	129,9	7,51 (d, J = 8,7 Hz)	129,85
3	6,84 (d, J = 8,6Hz)	114,8	6,84 (d, J = 8,7 Hz)	115,4
4		159,5		159,5
5	6,84 (d, J = 8,6Hz)	114,8	6,84 (d, J = 8,7 Hz)	115,4
6	7,50 (d, J = 8,6Hz)	129,9	7,51 (d, J = 8,7 Hz)	129,85
1'		104,2		104,5
2'		161,3		164,2
3'		107,9		106,9
4'		162,2		162,4
5'	5,95	89,3	5,95	93,85
6'		160,3		159,7
OCH <sub>3</sub>	3,91 (s)	54,4	-	-
7'	3,25 (d, J = 7,3 Hz)	20,5	3,23 (d, J = 7,3 Hz)	20,85
8'	5,22 (t, J = 7,3 Hz)	122,8	5,21 (t, J = 7,3Hz)	123,2
9'		129,9		129,7
10'	1,67 (s)	24,3	1,68 (s)	24,58
11'	1,78 (s)	16,1	1,78 (s)	16,4
$\alpha$	7,83 (d, J = 15,4Hz)	124	8,1 (d, J = 15,64 Hz)	124,6
$\beta$	7,68 (d, J = 15,4Hz)	142	7,7 (d, J = 15,64 Hz)	141,75
CO		192,5		189,85

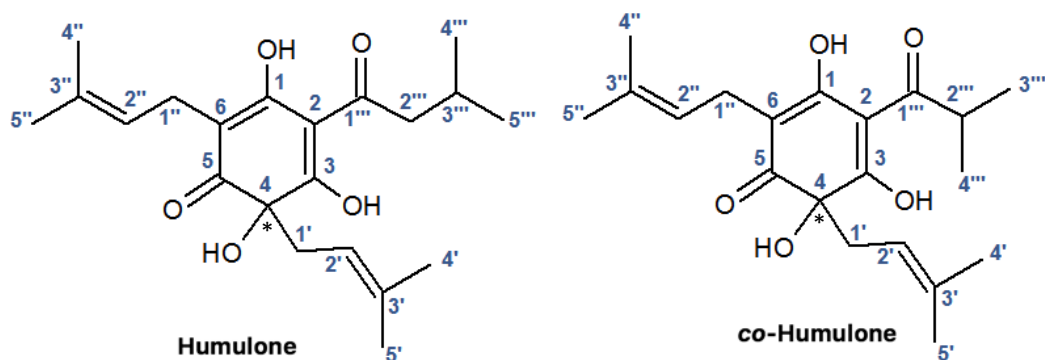


Figure 45. Structures et numérotations des acides  $\alpha$  purifiés

Tableau 14. Attributions des signaux  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  des acides  $\alpha$  à partir des spectres RMN 1D et 2D Dans le chloroforme deutéré ( $\text{CDCl}_3$ ) ; *s* : singulet, *d* : doublet, *t* : triplet, *q* : quadruplet, *m* : multiplet, *qd* : quadruplet dédoublé, *J* : constante de couplage en Hz

Carbone	Composé			
	Humulone		co-Humulone	
	$\delta \text{ } ^1\text{H}$	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$	$\delta \text{ } ^1\text{H}$	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$
1		167,7		167,7
2		109,3		109,9
3		190,8		191,06
4		106		104,4
5		195,08		194,9
6		78,7		78,8
1'	2,51 ( <i>qd</i> , <i>J</i> = 7,6 ; 13,9 Hz)	42,6	2,51 ( <i>qd</i> , <i>J</i> = 7,8 ; 13,9 Hz)	42,6
2'	5,02 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,9 ; 15,7 Hz)	115,7	5,02 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,8 ; 15,7 Hz)	115,7
3'		138,2		138,2
4'	1,70 ( <i>s</i> )	25,7	1,71 ( <i>s</i> )	25,7
5'	1,54 ( <i>s</i> )	17,8	1,55 ( <i>s</i> )	17,8
1''	3,09 ( <i>qd</i> , <i>J</i> = 6,8 ; 14,2 Hz)	21,07	3,09 ( <i>qd</i> , <i>J</i> = 7,2 ; 14,4 Hz)	21,08
2''	5,14 ( <i>qd</i> , <i>J</i> = 7,2 ; 14,2 Hz)	121,01	5,14 ( <i>qd</i> , <i>J</i> = 7,2 ; 14,4 Hz)	120,9
3''		132,8		132,8
4''	1,70 ( <i>s</i> )	26,01	1,71	26,3
5''	1,75 ( <i>s</i> )	17,7	1,75 ( <i>s</i> )	17,9
1'''		199,9		204,9
2'''	2,79 ( <i>q</i> , <i>J</i> = 4,9 ; 6,7 Hz)	46,2	3,72 ( <i>s</i> )	34,4
3'''	2,17 ( <i>m</i> )	26,4	1,22 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,8 Hz)	19,6
4'''	1,02 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,7 Hz)	22,8	1,14 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,8 Hz)	18,5
5'''	0,98 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,7 Hz)	22,5		

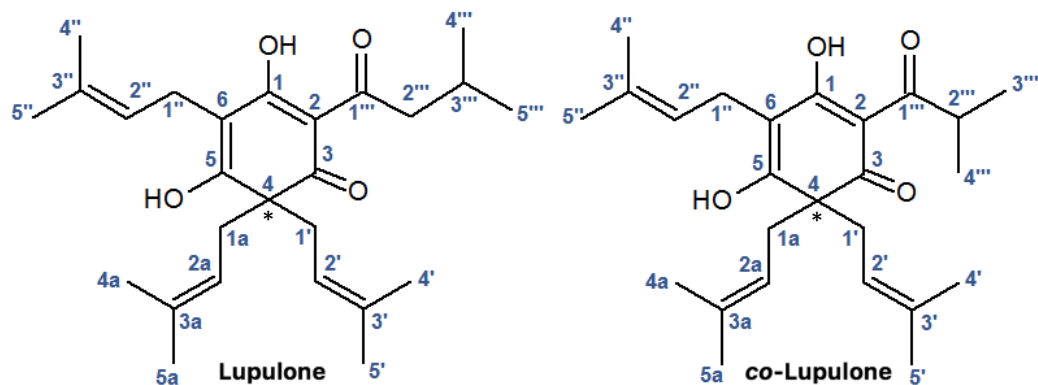


Figure 46. Structures et numérotations des acides  $\beta$  purifiés

Tableau 15. Attributions des signaux  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  des acides  $\beta$  à partir des spectres RMN 1D et 2D dans le chloroforme deutéré ( $\text{CDCl}_3$ ) ; *s* : singulet, *d* : doublet, *t* : triplet, *q* : quadruplet, *m* : multiplet, *dd* : doublet dédoublé, *J* : constante de couplage en Hz

Carbone	Composé			
	Lupulone		co-Lupulone	
	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1		114,7		114,4
2		108,8		110,1
3		196,3		195,5
4		57,2		57,3
5		171,2		172,7
6		165,3		164,6
1'	2,48 ( <i>q</i> , <i>J</i> = 7,8 ; 13,8 Hz)	37,9	2,47 ( <i>q</i> , <i>J</i> = 3,8 ; 7,2 Hz)	37,2
2'	4,77 ( <i>m</i> , <i>J</i> = 7,7 ; 15,2 Hz)	118,3	4,79 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,7 ; 15,2 Hz)	118,4
3'		135,1		135,1
4'	1,54 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,7 ; 12,3 Hz)	25,7	1,54 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 7 ; 11,2 Hz)	25,3
5'	1,54 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,7 ; 12,3 Hz)	17,7	1,54 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 7 ; 11,2 Hz)	17,3
1''	3,17 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,3 Hz)	21,06	3,17 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,3 ; 11,9 Hz)	20,7
2''	5,12 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,7 ; 14,7 Hz)	121,5	5,12 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,1 ; 13 Hz)	121,1
3''		137,8		137,4
4''	1,76 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 5,9 ; 12,5 Hz)	26,06	1,76 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 4 ; 5,9 Hz)	25,3
5''	1,76 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 5,9 ; 12,5 Hz)	18,7	1,76 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 4 ; 5,9 Hz)	17,3
1'''		202,2		207,3
2'''	2,89 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7 Hz)	48,1	4 ( <i>m</i> )	35
3'''	2,1 ( <i>m</i> )	25,7	1,10 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 4,9 ; 6,8 Hz)	18,1
4'''	0,94 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 5,9 ; 12,1 Hz)	22,6	1,10 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 4,9 ; 6,8 Hz)	18,1
5'''	0,94 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 5,9 ; 12,1 Hz)	22,6	-	-
1a	2,63 ( <i>m</i> )	37,9	2,65 ( <i>m</i> )	36,8
2a	4,77 ( <i>m</i> , <i>J</i> = 7,6 ; 15,2 Hz)	118,3	4,79 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,6 ; 15,2 Hz)	117,9
3a		135,1		135,1
4a	1,54 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,7 ; 12,3 Hz)	26,06	1,54 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 7 ; 11,2 Hz)	25,3
5a	1,54 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,7 ; 12,3 Hz)	18,7	1,54 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 7 ; 11,2 Hz)	17,3

### 3.5. Autres voies d'obtention des métabolites d'intérêt

Nous verrons dans les chapitres suivants que certains des composés purifiés constituent de bons candidats dans le traitement des infections bactériennes et fongiques. Cependant, étant obtenus à partir des cônes de houblon qui sont déjà exploités par l'industrie brassicole, une problématique se pose alors de trouver une ressource qui permettrait d'obtenir ces composés en quantité suffisante pour des applications en santé. Dans ce contexte, deux pistes ont été explorées : les sous-produits brassicoles contenant du houblon comme éventuelle ressource à valoriser, ainsi que les biotechnologies végétales qui pourraient constituer un moyen de production de ces métabolites (Faragó et al., 2009).

#### 3.5.1. Les sous-produits d'origine brassicole, une ressource rentable ?

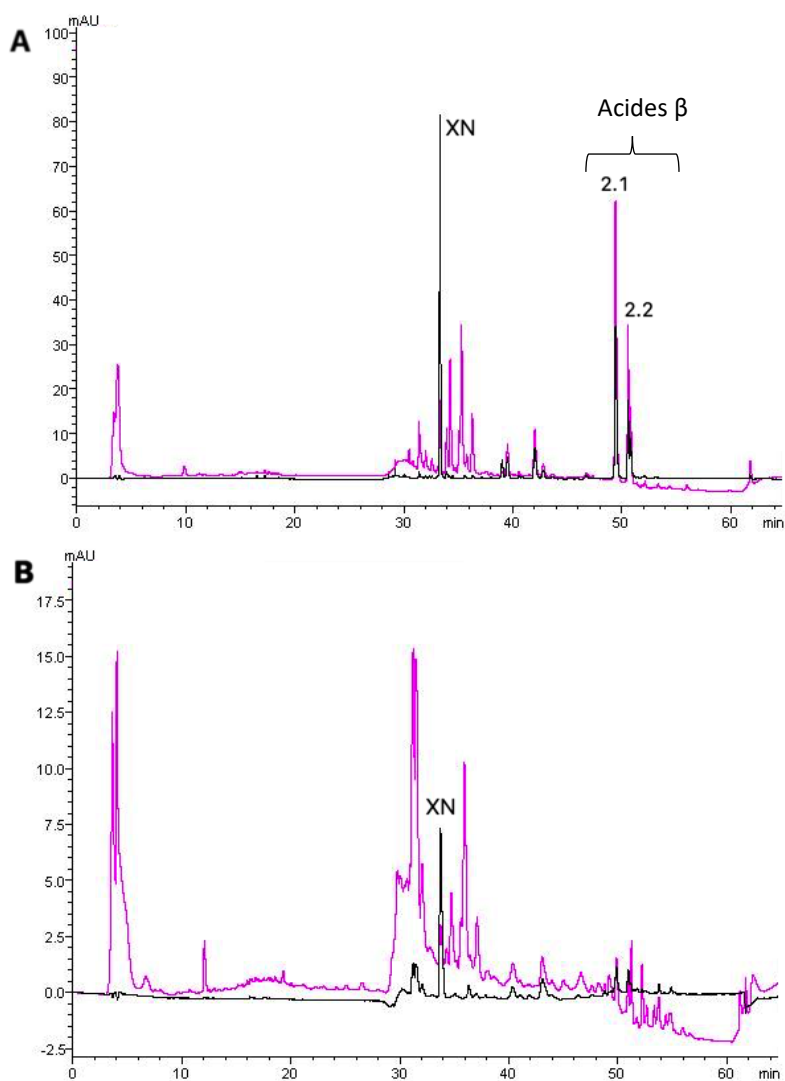
Comme introduit dans la partie 2.3.3., une grande partie de masse de houblon ajoutée au processus de fabrication de la bière est récupérée sous forme de sous-produits : les cassures. Elles sont récupérées suite à l'étape d'houblonnage, après filtration ou centrifugation. Elles contiennent les restes de houblon qui ne se sont pas solubilisés dans le filtrat. Selon le processus de fabrication, les cassures peuvent aussi contenir du malt (céréales). Ainsi, leur composition varie en fonction de la matière de départ (cultivar, type de d'extrait ou pellet) et du processus de fabrication (récupération préalable des drêches ou non, **Fig. 18**). Même si ces sous-produits ne sont pas les majoritaires, comparé aux drêches par exemple, ils sont difficiles à valoriser pour l'alimentation animale, du fait de leur amertume très prononcée. Si leur composition s'avère intéressante, il pourrait être envisageable de s'en servir comme source en produits antimicrobiens.

Grâce à une mise en contact par le biais du pôle Nutrition Santé et Longévité de Lille, deux brasseurs ont été contactés : la brasserie Page 24 à Aix-la-Noulette (62, Hauts-de-France) et la brasserie Saint Sylvestre à Saint Sylvestre Cappel (59, Hauts-de-France) qui brasse de la bière 3Monts. Ces brasseries ont été choisies car elle se fournissent en houblon de la région. Les cassures de ces deux brasseries ont été récupérées. Les rendements en extraits bruts et sous-extraits sont présentés dans le **tableau 16**.

**Tableau 16.** Rendements obtenus pour les extraits bruts et sous-extraits aqueux et DCM des sous-produits de brasseries en pourcentages de matière sèche ; les rendements des sous-extraits sont calculés à partir de la masse récupérée des extraits bruts ; - : extract

Extraits et sous-extraits	Cassures de la brasserie Page 24	Cassures de la brasserie Saint Sylvestre
Extrait brut hydro-alcoolique	61,3	72
Sous-extrait DCM	32	-
Sous-extrait aqueux	50,6	-

Les brasseries Page 24 et Saint Sylvestre utilisent des matières premières de nature différente (pellets ou extraits éthanoliques). Les fournisseurs, les cultivars de houblon, ainsi que le processus de fabrication diffèrent également. Les sous-produits obtenus ont de ce fait, des compositions différentes. L'analyse comparative par CLHP-UV indique que le sous-produit de la brasserie Page 24 est plus riche en composés d'intérêt. On y retrouve notamment le XN et les acides  $\beta$  majoritaires, incluant la co-lupulone et la lupulone (**Fig. 47A**). Les acides  $\alpha$  sont absents des deux échantillons. Ils ont probablement été isomérisés, devenant ainsi les composés amers présents dans la bière (Steenackers et al., 2015). L'extrait hydro-alcoolique du sous-produit de la brasserie Saint Sylvestre est quant à lui moins riche en composés d'intérêt. Seul le XN est décelable, à des teneurs bien inférieures à celles de l'extrait de la brasserie Page24 (**Fig. 47B**). Ce dernier semble prometteur car on y retrouve les deux composés les plus intéressants pour l'activité antibactérienne : le XN et la lupulone.



**Figure 47.** Chromatogrammes CLHP-UV des extraits bruts hydro-alcooliques de sous-produits obtenus auprès des brasseries Page 24 (A) et Saint Sylvestre (B) à  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  à 254 nm (rose) et 370 nm (noir) ; XN : xanthohumol, 2.1 co-lupulone, 2.2 lupulone.

Les cassures sont riches en protéines de haut poids moléculaire, d'acides gras, d'azote et de zinc (Dos Santos Mathias et al., 2015 ; Kuehbeck et al., 2007). Elles seraient également composées de nombreuses molécules organiques. Les données concernant la composition exacte de ces dernières sont très peu développées dans la littérature. De récentes études ont permis de déceler la présence de 6- et 8-PN, d'IXN et de XN (Coldea et al., 2017). Luzak et al. (2016) ont identifié des acides hydroxy-cinnamiques, des flavanols sous leur forme libre ou conjugués à des sucres. Ils ont également mis en évidence la forte teneur en proanthocyanidines avec 23,3% du poids sec du sous-produit étudié. Des terpènes tels que le  $\beta$ -myrcène, le limonène, l' $\alpha$ -humulène et le  $\beta$ -caryophyllène ont également été retrouvés dans le houblon épuisé en sortie de brasserie (Bedini et al., 2015).

### 3.5.2. Production des métabolites par les biotechnologies végétales

De nombreuses molécules à destination des industries de santé sont des dérivés semi-synthétiques de métabolites produits par les biotechnologies, particulièrement les biotechnologies microbiennes (Delaunay et al., 2005). Des systèmes de production de métabolites secondaires par les biotechnologies végétales ont déjà démontré leur efficacité (Lanoue, 2002 ; Chastang, 2014). Dans l'optique de produire les composés phénoliques prénylés du houblon, divers essais ont été effectués en collaboration avec le Dr Caroline Rambaud et Audrey Etienne (EA 7394, ICV).

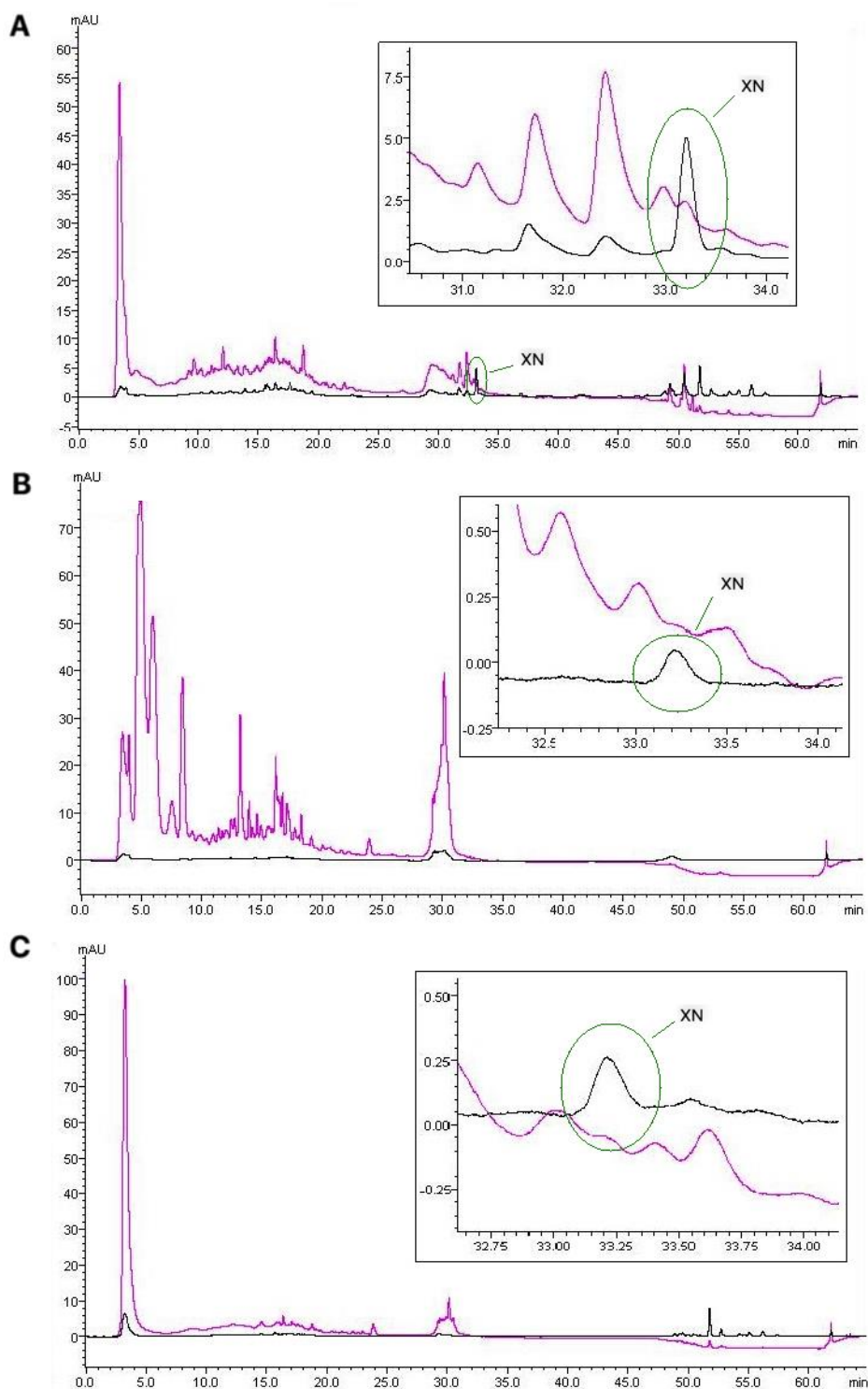
#### Les vitro-plants

Dans le cadre du stage d'Andréa Escobar Utiel (3<sup>ème</sup> année de Licence Sciences Technologies, Santé, spécialité Biologie Cellulaire et Physiologie, Lille, 2015-2016), des essais de vitro-plants de houblon ont été réalisés.

L'analyse par CLHP-UV des différentes parties des vitro-plants a révélé une quantité faible en composés phénoliques d'intérêt (**Fig. 48**). Seul le XN est décelable dans la plupart des parties. Il est en quantité plus importante dans les feuilles, en comparaison avec les tiges et les rhizomes où il est retrouvé à l'état de traces. La même tendance est retrouvée pour ces parties végétales lorsque la plante est cultivée en terre (**Fig. 26**). Les acylphloroglucinols ne semblent présents dans aucune des parties de vitro-plants étudiés ici, alors qu'on les retrouve dans chacune des parties de la plante cultivée en terre. Un mélange de composés polaires non séparés, absorbant à 254 nm, semble éluer pendant les premières minutes de l'analyse. Les composés phénoliques normalement élués entre 15 et 20 minutes, qui étaient largement majoritaires dans les extraits de feuilles provenant de la plante cultivée en terre, sont également absents des feuilles de vitro-plants.

Des essais d'élicitation des vitro-plants avec des hormones de croissance telles que le jasmonate de méthyle (MeJa) et le benzyl adénine (BAP) ont été effectués, dans le

but de stimuler la croissance et la germination. Les analyses des vitro-plants obtenus avec le MeJa n'ont pas montré de différences avec les vitro-plants non traités. Les analyses sont en cours pour les vitro-plants élicités au BAP. Il a néanmoins été constaté que la masse sèche, pour une même durée de croissance est jusqu'à 9 fois plus importante lorsque les vitro-plants sont élicités au BAP.



**Figure 48.** Comparaison des chromatogrammes des extraits hydro-alcooliques de vitro-plants de houblon à 10 mg.mL<sup>-1</sup>, avec la méthode adaptée aux extraits bruts, à 254 nm (rose) et 370 nm (noir) ; les encadrés mettent en évidence la zone d'élution du xanthohumol (XN) ; A. feuilles, B. rhizomes, C. tiges

#### Remarque

Les analyses effectuées sur les feuilles, les tiges et les rhizomes de la plante cultivée, ainsi que celles faites sur les vitro-plants ont été effectuées par CLHP-UV au début de la thèse. Récemment, le laboratoire s'est équipé d'une CLUHP-UV-SM. La sensibilité accrue de l'appareil a permis de déceler davantage de composés dans des vitro-plants analysés à posteriori, indiquant notamment la présence des acides  $\beta$  dans les diverses parties de vitro-plants analysés.

Les analyses plus récentes en CLUHP-UV ont été réalisées en séparant les jeunes feuilles, des feuilles plus âgées. Il a été remarqué que les jeunes feuilles étaient plus riches en composés phénoliques prénylés que les feuilles plus âgées. Même si celles-ci renferment moins d'humulone et de XN que dans les cônes, les premières analyses montrent que les teneurs en lupulone sont légèrement supérieures. Il pourrait donc être intéressant de trouver un moyen de produire davantage de jeunes feuilles, par exemple par bourgeonnement adventif, qui permettrait de produire plus de biomasse. Dans cette optique, des essais de culture de vitro-plants en milieu liquide sont en cours, à partir de vitro-plants entiers et de vitro-plants coupés à la racine (feuilles + tiges). Les premières semaines de culture montrent un taux de bourgeonnement supérieur à la culture en milieu solide. Si les compositions s'avèrent intéressantes, il pourrait être imaginé de faire des bioréacteurs avec les parties non utilisées par les agriculteurs. Néanmoins, de nombreuses analyses doivent encore être effectuées avant d'envisager une éventuelle purification à partir de cette matière.

#### Les « hairy roots » ou « chevelus racinaires »

La mise en place de cultures de « chevelus racinaires » ou « hairy roots » peut s'avérer être une méthode efficace pour la production de métabolites spécialisés chez les plantes. Malheureusement, le houblon semble récalcitrant à la transformation par *Agrobacterium rhizogenes*, que ce soit à partir de jeunes pousses ou de vitro-plants plus ou moins âgés. Le développement du « chevelus racinaires » est difficile et la biomasse engendrée est faible (Fig. 49). Cette méthode ne semble pas non plus optimale.



Figure 49. « Chevelus racinaires » de houblon obtenus à partir de jeune germination après 2 mois et demi de culture



## Les cals et suspensions cellulaires de houblon

La production de cals a été initiée à partir de différents explants issus de vitro-plants : feuilles et entre-nœuds. Dans les deux cas, la production s'est avérée efficace. Néanmoins, les analyses en CLUHP-UV ont montré l'absence de tout composé d'intérêt dans les cals (données non montrées). À partir de ces derniers, des essais de suspensions cellulaires de houblon, sont en cours. La biomasse formée est significative. Le milieu de culture et les débris cellulaires devront être analysés.

### 3.6. Conclusion et perspectives

La partie phytochimie présentée dans ce chapitre a principalement été réalisée en début de thèse (1<sup>ème</sup> année et début de 2<sup>ème</sup> année). Seul le dosage a été repris suite à l'arrivée de la CLUHP-SM au laboratoire, au cours de ma 3<sup>ème</sup> année. La purification des composés d'intérêt a été réalisée par CPC et par CLHP préparative, en une ou plusieurs étapes selon les produits. Le processus a été suivi de manière analytique par CCM et par CLHP-UV. Les différentes étapes de purification ont mené à l'isolement de six composés phénoliques prénylés des cônes femelles de houblon, à partir du sous-extrait DCM : deux chalcones (XN et DMX) et quatre dérivés d'acylphloroglucinols ou acides amers (humulone, *co*-humulone, lupulone et *co*-lupulone). Le XN étant assez majoritaire et obtenu en une seule étape par CPC, il était rapide d'obtenir des quantités suffisantes pour les analyses biologiques. Au contraire, le DMX et certains acylphloroglucinols purifiés en deux étapes et plus minoritaires, ont nécessité plusieurs sessions successives de purification pour réunir les quantités nécessaires aux tests biologiques. Des axes d'optimisation du processus de purification ont été explorés.

Une méthode de fractionnement bioguidé a permis d'obtenir avec un peu plus de certitudes, des produits antimicrobiens. Nous verrons dans les chapitres suivants, quels composés sont actifs et vis-à-vis de quel(s) pathogène(s).

Concernant les autres voies d'obtention de ces métabolites d'intérêt, les sous-produits brassicoles pourraient constituer une ressource prometteuse. D'autres analyses sont néanmoins nécessaires afin de corrélérer la présence de ces composés, en fonction de la matière première et du processus de fabrication utilisés par les brasseurs. Les biotechnologies végétales appliquées au houblon ne sont pour l'instant pas tout à fait convaincantes dans un objectif de production des composés phénoliques prénylés. Ces constats résultent d'essais préliminaires, ils devront être confirmés.

Dans la continuité du projet, des composés minoritaires des cônes femelles pourraient être purifiés afin de tester également leur activité antimicrobienne. Le houblon étant une plante très étudiée, la purification de molécules de structure nouvelle semble plus difficile. Il pourrait également être envisagé d'étudier plus en

détails la composition des autres parties de la plante, par exemple par une méthode de déréplication par chromatographie liquide couplée à la masse, sur des sous-extraits ou des fractions moins complexes. Quelques publications discutent de certains composés présents dans les feuilles, mais la composition des tiges et des rhizomes est encore inconnue. Or, lors de la récolte du houblon, seuls les cônes sont utilisés par l'industrie brassicole, le reste de la plante n'est pour le moment pas valorisé. Il pourrait être intéressant de connaître leur composition chimique et de les évaluer pour d'autres activités biologiques. Comme explicité dans la suite de ce mémoire, l'activité antimicrobienne de ces dernières étant faible, elles seront assez difficilement valorisées pour ce type d'activité.

## Chapitre 4.

# Activité antibactérienne du houblon envers des pathogènes humains

---

Les tests antibactériens ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr Christel Neut du laboratoire de bactériologie clinique de la Faculté de Pharmacie de Lille (INSERM U995).

### 4.1. De l'activité des extraits à l'identification des produits actifs

#### 4.1.1. Activité des extraits et des sous-extraits de houblon

Le criblage des différentes parties de la plante confirme l'activité antibactérienne des cônes femelles de houblon, qui présentent des CMI comprises entre 39 et 156  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (**Tableau 17**). Cette d'activité est exclusivement dirigée vers les bactéries à Gram positif, ce qui est en accord avec la littérature (Zanoli et Zavatti, 2008 ; Rozalski et al., 2013). Son spectre d'activité regroupe des souches de *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus* et *Streptococcus* (**Tableau 17**), ou encore, d'après les données de la littérature, des souches de *Bacillus*, *Streptomyces* et de *Micrococcus* (Schmalreck et Teuber, 1975 ; Gerhäuser, 2005b). Le houblon est également capable de combattre des pathogènes retrouvés dans l'industrie agroalimentaire comme *Clostridium* et *Listeria* (Larson et al., 1996 ; Sansawat et al., 2016 ; Cermak et al., 2017). Abram et al. (2015) ont mis en évidence une légère activité du houblon envers des souches d'*E. coli*, ce qui n'a pas été retrouvé ici. Le criblage réalisé sur 36 souches de *Candida albicans* montre un spectre d'activité étroit sur ces dernières. Seules les deux souches présentées dans le tableau ci-après se sont avérées sensibles aux extraits de cônes de houblon. Langezaal et al. (1992) ont également mis en évidence une efficacité de ces parties de plantes vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231. D'autres études ont démontré que le houblon est plus efficace sur les bactéries que sur les levures. Il ne possède par exemple, aucune activité sur *Saccharomyces*, ce qui est indispensable pour son utilisation brassicole (Schmalreck et Teuber, 1975).

Les autres parties de la plante n'ont été que peu étudiées, à la fois d'un point de vue de leur composition et de leurs activités biologiques. Nos résultats ne montrent aucune activité des feuilles et des tiges envers les souches testées, contrairement à Abram et al. (2015) qui ont mis en évidence une petite activité des feuilles de houblon des cultivars Aurora et Hallertauer Magnum, vis-à-vis de *S. aureus*. Les rhizomes ont une activité peu prononcée avec une CMI de 0,625  $\text{mg.mL}^{-1}$  et seulement sur certaines souches. Pour rappel, seuls certains composés phénoliques prénylés aux activités antibactériennes

démontrées sont présents dans les feuilles, les tiges et les rhizomes, mais à des teneurs très faibles (Fig. 26 et 28).

**Tableau 17.** CMI (en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) des extraits bruts hydro-alcooliques des parties de pieds femelles de houblon sur le premier panel de souches bactériennes pathogènes de l'Homme ; C : cônes, F : feuilles, T : tiges, R : rhizomes ; antibiotiques de référence : S : sensible, I : sensibilité intermédiaire, R : résistante ; GEN (gentamicine), S :  $\leq 4$ , R :  $> 8$  ; VAN (vancomycine), S :  $\leq 4$ , R :  $> 16$  ; AMX (amoxicilline), S :  $\leq 4$ , R :  $> 16$  ; amphotéricine B (AMB) S  $\leq 1$ , R  $> 1$  ; fluconazole (FLC) S  $\leq 2$ , R  $> 4$  ; voriconazole (VRC) S  $\leq 0,12$ , R  $> 0,12$  (Cavallo et al., 2006) ; Non actif (NA) : CMI  $\geq 1,25$   $\text{mg.mL}^{-1}$

Souches bactériennes	CMI ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				Sensibilité aux antibiotiques et antifongiques		
	C	F	T	R	GEN	VAN	AMX
<b>Bactéries à Gram positif</b>							
<i>Corynebacterium</i> T25-17	39	NA	NA	NA	S	S	S
<i>Enterococcus faecalis</i> C159-6	39	NA	NA	NA	R	S	R
<i>Enterococcus</i> sp. 8153	156	NA	NA	NA	R	S	S
<i>Mycobacterium smegmatis</i> 5003	39	NA	NA	NA	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i> 8146	39	NA	NA	NA	S	S	I
<i>Staphylococcus aureus</i> 8147	39	NA	NA	NA	S	S	S
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5001	39	NA	NA	NA	S	S	S
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 10282	98	NA	NA	NA	S	S	S
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> T26A3	156	NA	NA	625	S	S	S
<i>Staphylococcus warneri</i> T12A12	39	NA	NA	625	S	R	S
<i>Streptococcus agalactiae</i> T25-7	39	NA	NA	NA	R	S	S
<i>Streptococcus agalactiae</i> T53C2	78	NA	NA	NA	S	S	S
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> T46C14	39	NA	NA	NA	S	S	S
<b>Bactéries à Gram négatif</b>							
<i>Acinetobacter baumannii</i> 9010	NA	NA	NA	NA	S	R	R
<i>Acinetobacter baumannii</i> 9011	NA	NA	NA	625	R	R	R
<i>Citrobacter freundii</i> 11041	NA	NA	NA	NA	S	R	S
<i>Citrobacter freundii</i> 11042	NA	NA	NA	NA	S	R	R
<i>Enterobacter cloacae</i> 11050	NA	NA	NA	NA	S	R	R
<i>Enterobacter aerogenes</i> 9004	NA	NA	NA	NA	S	R	R
<i>Enterobacter cloacae</i> 11051	NA	NA	NA	NA	R	R	R
<i>Enterobacter cloacae</i> 11053	NA	NA	NA	NA	S	R	R
<i>Escherichia coli</i> 8138	NA	NA	NA	NA	S	R	R
<i>Escherichia coli</i> 8157	NA	NA	NA	NA	S	R	R
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	NA	NA	NA	NA	S	R	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 11016	NA	NA	NA	NA	S	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 11017	NA	NA	NA	NA	S	R	R
<i>Proteus mirabilis</i> 11060	NA	NA	NA	NA	S	R	R
<i>Providencia stuartii</i> 11038	NA	NA	NA	NA	S	R	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8131	NA	NA	NA	625	S	R	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27583	NA	NA	NA	625	R	R	R
<i>Salmonella</i> sp. 11033	NA	NA	NA	NA	S	R	R
<i>Serratia marcescens</i> 11056	NA	NA	NA	NA	S	R	R
<i>Serratia marcescens</i> 11057	NA	NA	NA	NA	R	R	R
<i>Stenotrophomas maltophilia</i>	NA	NA	NA	625	S	R	R
<b>Levures</b>					<b>AMB</b>	<b>FLC</b>	<b>VRC</b>
<i>Candida albicans</i> 13203	156	625	NA	NA	S	R	R
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	< 39	NA	NA	NA	S	S	S

Les cônes femelles sont donc les parties qui présentent un intérêt d'un point de vue phytochimique et biologique. Le **tableau 18** montre l'activité des extraits et sous-extraits de cônes femelles vis-à-vis de bactéries à Gram positif exclusivement.

**Tableau 18.** CMI (en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) des extraits et sous-extraits actifs de cônes femelles, sur un panel de souches exclusivement à Gram positif ; EB : extrait brut hydro-alcoolique, SS-DCM : sous-extrait DCM, SS-A : sous-extrait aqueux ; antibiotiques de référence : S : sensible, I : sensibilité intermédiaire, R : résistante, GEN (gentamicine), S :  $\leq 4$ , R :  $> 8$  ; VAN (vancomycine), S :  $\leq 4$ , R :  $> 16$  ; AMX (amoxicilline), S :  $\leq 4$ , R :  $> 16$  (Cavallo et al., 2006) ; Non actif (NA) : CMI  $\geq 1,25 \text{ mg.mL}^{-1}$

Souches bactériennes	CMI ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )			Sensibilité aux antibiotiques		
	EB	SS-DCM	SS-A	GEN	VAN	AMX
<i>Corynebacterium</i> T25-17	39	19,5	NA	S	S	S
<i>Enterococcus faecalis</i> C159-6	156	78	NA	R	R	R
<i>Enterococcus faecalis</i> T26-B7	313	156	NA	R	S	S
<i>Enterococcus faecalis</i> T34-2	313	156	NA	S	S	S
<i>Enterococcus faecalis</i> T37A4	156	156	NA	R	S	S
<i>Enterococcus faecalis</i> T39-C11	156	156	NA	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i> 8146	19,5	9,8	NA	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i> 8147	19,5	9,8	NA	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 224	39	19,5	NA	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i> T1.1	39	19,5	NA	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i> T25.10	39	19,5	NA	S	S	R
<i>Staphylococcus aureus</i> T25.3	39	19,5	NA	S	S	R
<i>Staphylococcus aureus</i> T25.9	39	19,5	NA	S	S	R
<i>Staphylococcus aureus</i> T26A4	39	19,5	NA	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i> T28.1	19,5	9,8	NA	S	S	R
<i>Staphylococcus aureus</i> T36B1	39	19,5	NA	S	S	R
<i>Staphylococcus aureus</i> T47A12	39	19,5	NA	S	S	R
<i>Staphylococcus aureus</i> T6.7	39	9,8	NA	S	S	R
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5001	39	19,5	NA	S	S	S
<i>Staphylococcus warneri</i> T12A12	78	19,5	NA	S	S	S
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> T26A3	39	19,5	NA	S	S	S
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i> T3.3	78	39	NA	S	S	S
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 08237	39	9,8	NA	S	S	S
<i>Streptococcus agalactiae</i> 13225	39	19,5	NA	S	S	S
<i>Streptococcus agalactiae</i> 13226	39	19,5	NA	S	S	S
<i>Streptococcus agalactiae</i> T25.7	39	19,5	NA	I	S	S
<i>Streptococcus agalactiae</i> T38.2	39	19,5	NA	S	S	S
<i>Streptococcus agalactiae</i> T40A2	39	19,5	NA	S	S	S

Les composés les plus apolaires de l'extrait hydro-alcoolique de cônes femelles semblent responsables de l'activité antibactérienne. En effet, le sous-extrait DCM présente une activité encore plus prononcée que l'extrait brut, avec des CMI à partir de  $9,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Au contraire, l'extrait aqueux est inactif (**Tableau 18**). Les cônes femelles renferment la plupart des composés phénoliques originaux synthétisés par le houblon, comme les chalcones prénylées et les dérivés prénylés d'acylphloroglucinols, certains

étant déjà connus pour leurs propriétés biologiques (Gerhäuser, 2005a ; Zanoli et Zavatti, 2008).

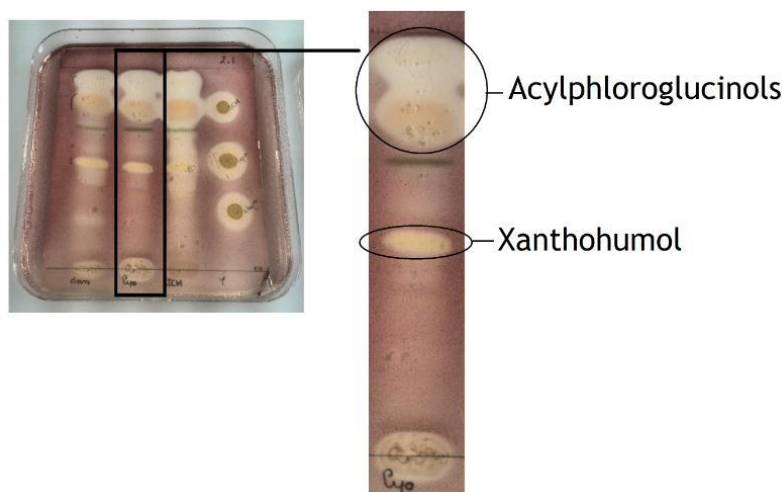
Une différence d'activité entre les espèces bactériennes peut être remarquée. Les staphylocoques et les streptocoques sont globalement plus sensibles au houblon que les entérocoques. Les bactéries résistantes à certains antibiotiques sont également sensibles aux extraits et sous-extraits de cônes. Le potentiel du houblon vis-à-vis des bactéries résistantes aux antibiotiques a également été remarqué par Wendakoon et al. (2012) qui ont évalué l'activité de plusieurs plantes, montrant que le houblon est le plus actif envers les SARM. Nos résultats montrent que parmi toutes les espèces testées, les souches de *S. aureus* sont les plus sensibles avec des CMI de 19,5 à 39  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  pour l'extrait brut et de 9,8 à 19,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  pour le sous-extrait DCM. Ce dernier concentre donc les produits actifs. Des valeurs différentes de CMI peuvent être retrouvées dans la littérature. Abram et al. (2015) ont par exemple des CMI de l'ordre de 2 à 3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  vis-à-vis de *S. aureus* avec un extrait brut éthanolique. Un extrait de houblon obtenu par extraction au  $\text{CO}_2$  supercritique montre des CMI de 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  envers des souches de *S. aureus* (Dumas et al., 2009). Les méthodes d'extraction et les souches bactériennes étant différentes, les données ne sont pas directement comparables.

#### 4.1.2. Identification des composés phénoliques antibactériens

Afin d'avoir une première idée des composés actifs des extraits et sous-extraits de cônes femelles de houblon, des bioautographies d'immersion ont été effectuées sur divers *S. aureus*. Les résultats sur les souches sensibles et résistantes à la méticilline sont les mêmes. À partir de l'extrait brut hydro-alcoolique, trois zones d'inhibition de la croissance bactérienne sont visibles. Elles correspondent aux zones claires sur la **figure 50**.

- La première zone se trouve sur la ligne de dépôt, ce sont les composés les plus polaires de l'extrait brut, qui ne sont pas retrouvés dans le sous-extrait DCM. Le sous-extrait aqueux n'étant pas actif d'après les criblages (**Tableau 18**), nous n'avons pas purifié ces produits. Des analyses supplémentaires nous ont permis de déduire qu'il s'agit probablement de flavonoïdes non prénylés plus classiques, telle que la catéchine qui est connue pour son potentiel antibactérien.
- La deuxième zone se trouve au centre de la plaque CCM. C'est un composé qui apparaît jaune à l'œil nu, il est révélé sous forme de tâche noire à 365 et 254 nm. Par comparaison avec un standard commercial disponible au laboratoire, nous avons identifié le XN.
- La troisième et dernière zone est plus large que les précédentes. Elle semble contenir plusieurs composés, regroupés en deux tâches distinctes qui laissent penser à deux

groupes de produits, les plus apolaires de l'extrait brut. Il s'agit des dérivés prénylés d'acylphloroglucinols.



**Figure 50.** Bioautographie d'immersion des extraits de cônes femelles de houblon avec *S. aureus* T28.1, mettant en évidence l'activité de l'extrait brut hydro-alcoolique ; le système de migration de la CCM est Toluène/AcOEt/Acide formique (73:18:9, v/v).

En confrontant ces résultats avec les données de la littérature, nous avons dirigé la purification vers les chalcones et les dérivés prénylés d'acylphloroglucinols majoritaires, à partir du sous-extrait DCM. Comme expliqué dans le chapitre 3, les six produits majoritaires du sous-extrait DCM ont finalement été obtenus. Leur activité antibactérienne a été évaluée vis-à-vis de quatre souches de *S. aureus* dont certaines sont résistantes à la méticilline. La méthode utilisée a permis de déterminer à la fois la CMI et la concentration minimale bactéricide (CMB). Les résultats sont présentés dans les **tableaux 19 et 20**. Les composés phénoliques sont connus pour leur potentiel contre les staphylocoques. Tous les produits testés montrent une activité envers les souches choisies. Les chalcones semblent plus actives que la plupart des acylphloroglucinols, à l'exception de la lupulone. Les CMB sont beaucoup plus élevées que les CMI, ce qui signifie qu'aux valeurs de CMI les produits inhibent la croissance des bactéries mais ne sont pas biocides.

**Tableau 19.** CMI (en  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) des produits majoritaires purifiés à partir du sous-extrait DCM de cônes femelles de houblon, sur les quatre *S. aureus* sélectionnées (\*SARM) ; XN : xanthohumol, DMX : desméthylxanthohumol

Souches sélectionnées	CMI ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )					
	Chalcones			Acylphloroglucinols		
	XN	DMX	co-Humulone	Humulone	co-Lupulone	Lupulone
<b><i>S. aureus</i> T28.1*</b>	9,8	39	156	78	39	1,2
<b><i>S. aureus</i> T25.10*</b>	9,8	19,5	313	156	78	0,6
<b><i>S. aureus</i> T26A4</b>	9,8	39	313	156	39	0,6
<b><i>S. aureus</i> 08143</b>	19,5	39	313	156	78	1,2

**Tableau 20.** CMB (en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) des produits majoritaires purifiés à partir du sous-extrait DCM de cônes femelles de houblon, sur les quatre *S. aureus* sélectionnées (\*SARM) ; XN : xanthohumol, DMX : desméthylxanthohumol

Souches sélectionnées	CMB ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )					
	Chalcones		Acylphloroglucinols			
	XN	DMX	co-Humulone	Humulone	co-Lupulone	Lupulone
<i>S. aureus</i> T28.1*	156	78	> 313	> 313	78	156
<i>S. aureus</i> T25.10*	> 313	> 313	> 313	> 313	> 313	78
<i>S. aureus</i> T26A4	> 313	> 313	> 313	> 313	313	156
<i>S. aureus</i> 08143	> 313	> 313	> 313	> 313	313	39

L'activité antibactérienne du houblon est principalement attribuée aux dérivés prénylés d'acylphloroglucinols, ou acides amers. Les acides  $\alpha$  (humulone et ses dérivés) sont moins actifs que les acides  $\beta$  (lupulone et ses dérivés). Cette affirmation est en accord avec la littérature. Mizobuchi et Sato (1985) ont déterminé une CMI moyenne de  $6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  pour l'humulone contre  $3,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$  pour la lupulone. Bogdanova et al. (2018) ont quant à eux obtenus des CMI de 15 et  $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivement, pour des produits purifiés à 83,2% pour la lupulone et 87,3% pour l'humulone, vis-à-vis de souches de *S. aureus* sensibles et résistantes à la méticilline. La différence entre ces valeurs est encore plus importante dans notre cas car les acides  $\alpha$  sont assez peu actifs envers les souches testées. Nos résultats montrent une CMI de 78 à  $156 \mu\text{g.mL}^{-1}$  pour l'humulone contre  $0,6$  à  $1,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  pour la lupulone. La différence structurale entre ces deux groupes de molécules est une chaîne prénylée supplémentaire pour les acides  $\beta$ . Il est admis que de par leur interaction avec la membrane, l'activité antibactérienne des acides amers augmente avec le degré d'hydrophobicité et donc le nombre de chaînes prénylées (Simpson et Smith, 1992). Nous pouvons également remarquer une différence d'activité entre la lupulone et la co-lupulone, cette dernière possède un  $\text{CH}_2$  en moins (Fig. 15). En effet, la taille de la chaîne carbonée influence positivement leur activité antibactérienne (Gerhäuser, 2005b).

Parmi les chalcones, le XN montre une activité plus prononcée que le DMX, avec des CMI entre  $9,8$  et  $19,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  contre  $19,5$  à  $39 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivement. Or, la différence structurale entre ces deux molécules est minime. Un groupement méthoxy ( $-\text{OCH}_3$ ) en position 6' sur le XN semble augmenter le potentiel antibactérien de la molécule (Fig. 14). De nombreuses études soulignent l'activité antimicrobienne du XN dans la littérature mais très peu d'entre elles utilisent des souches résistantes à l'exception de deux publications plus récentes. Rozalski et al. (2013) ont déterminé par exemple des CMI de 15 à  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$  sur divers *S. aureus*, tandis que Bogdanova et al. (2018) ont mis en évidence une activité encore plus intense du XN sur des souches de *S. aureus* sensibles et résistantes à la méticilline avec des CMI de 2 et  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivement. L'activité décelée ici est légèrement inférieure à ces dernières valeurs. Si l'on compare l'activité du XN avec l'une des chalcones les plus connues pour son pouvoir



antibactérien, la licochalcone A, qui possède des CMI entre 2 et 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  envers *S. aureus* (Tsukiyama et al., 2002), le potentiel du XN est intéressant. Le DMX montre également une activité antibactérienne vis-à-vis des souches étudiées. Ce dernier est connu pour des activités antioxydantes et apoptotiques vis-à-vis d'une lignée cellulaire de lymphome humain (Diller et al., 2009 ; Teng et al., 2017), ou encore pour un effet antiparasitaire modéré envers *Plasmodium falciparum* (Frölich et al., 2005), mais pas pour son potentiel antibactérien.

Afin d'avoir une idée du spectre d'action des produits, les tests en microplaques ont été étendus à 12 souches (10 staphylocoques et 2 streptocoques) pour le XN et le DMX. Ces tests nous ont permis de conclure à un spectre d'action de ces derniers plutôt large sur les bactéries à Gram positif car tous les staphylocoques et streptocoques testés sont sensible aux produits. Les CMI sont comprises entre 4,9 et 19,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  pour le XN et entre 19,5 et 78  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  pour le DMX. Aucune donnée ne semble disponible dans la littérature concernant l'activité antibactérienne du DMX, contrairement au XN dont les CMI rapportées sont assez variables (Gerhäuser, 2005b ; Zanolli et Zavatti, 2008 ; Rozalski et al., 2013). Bhattacharya et al. (2003) ont déterminé une CMI de 12,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  du XN envers *Streptococcus mutans*. Nos résultats montrent une activité variable du XN vis-à-vis des streptocoques avec une CMI de 4,9  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  sur *S. agalactiae* 13225 et une CMI de 19,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  sur *S. agalactiae* T53A4, qui est un isolat clinique provenant d'une ostéite de pied diabétique (**Tableau 21**).

**Tableau 21.** CMI (en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) des chalcones purifiées vis-à-vis des 12 souches sélectionnées ; XN : xanthohumol, DMX : desméthylxanthohumol, OXA (oxacilline), S  $\leq$  2, R  $>$  2 (Cavallo et al., 2006) ; ND : non déterminé

Souches sélectionnées	CMI ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )		
	XN	DMX	OXA
<b>Staphylocoques</b>			
<i>S. aureus</i> T28.1	9,8	39	R
<i>S. aureus</i> T25.10	9,8	19,5	R
<i>S. aureus</i> T26A4	9,8	39	S
<i>S. aureus</i> 08143	19,5	19,5	S
<i>S. epidermidis</i> T15.1	78	78	ND
<i>S. capitis</i> T21A3	9,8	39	S
<i>S. pettenkoferi</i> T28.2	9,8	78	S
<i>S. warneri</i> T12A12	19,5	78	S
<i>S. saprophyticus</i> 08237	9,8	39	S
<i>S. lugdunensis</i> T47B2	19,5	39	ND
<b>Streptocoques</b>			
<i>S. agalactiae</i> T53A4	19,5	39	ND
<i>S. agalactiae</i> 13225	4,9	39	ND

Parmi les six produits purifiés, trois possèdent un potentiel antibactérien particulièrement intéressant vis-à-vis des souches de *S. aureus*, incluant des souches résistantes à la méticilline : le XN, le DMX et la lupulone. Le XN est aujourd'hui connu pour son pouvoir antimicrobien, beaucoup moins d'études sont disponibles sur le potentiel du DMX et de la lupulone. Ces produits ne sont en revanche, pas exploités pour lutter contre les souches résistantes aux antibiotiques. L'originalité de ma thèse est de comprendre la façon dont agissent ces trois molécules sur des SARM et en particulier sur un isolat clinique résistant. Ces trois produits ont donc été purifiés (cf chapitre 3) pour des expérimentations complémentaires. L'objectif est d'étudier leur potentiel de lutte contre les SARM, à travers l'analyse de plusieurs paramètres : (1) recherche de synergies d'association ; (2) analyse de la bactéricidie ; (3) quantification de l'effet post-antibiotique ; (4) potentiel anti-biofilm sur divers substrats.

## **4.2. Analyse du potentiel du xanthohumol, du desméthylxanthohumol et de la lupulone envers un isolat clinique de *S. aureus* résistant à la méticilline**

### *4.2.1. Recherche de synergies d'association*

Pour lutter contre les souches résistantes aux antibiotiques, l'une des stratégies employées est l'association de plusieurs substances, dont au moins une, est antibactérienne. L'association de molécules d'origine naturelle avec des antibiotiques a déjà montré des résultats prometteurs (Hemaiswarya et al., 2008 ; Mundy et al., 2016). La potentialisation de l'efficacité des traitements antimicrobiens peut se faire via différents mécanismes comme (1) une amélioration de la solubilité ou de la biodisponibilité du principe actif qui permettrait d'augmenter son efficacité ; (2) un effet multi-cibles de chaque composé au niveau du pathogène, s'ils sont tous les deux antimicrobiens ; (3) une annulation de la résistance si la cible du produit ajouté est le mécanisme de résistance bactérien, restaurant ainsi l'activité de l'antibiotique, ce qui constitue le principal objectif des thérapies combinées (Wagner et Ulrich-Merzenich, 2009).

Dans le but d'optimiser l'activité des produits purifiés du houblon, des synergies ont été recherchées par association des produits les plus actifs entre eux et avec des antibiotiques. Parmi les antibiotiques sélectionnés : la ciprofloxacine est notamment prescrite dans le traitement des infections ostéo-articulaires ; la gentamicine est utilisée en monothérapie pour les infections à *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM) mais également en combinaison à d'autres antibiotiques pour les infections à SARM ; l'oxacilline est l'antibiotique de référence pour évaluer la sensibilité de l'isolat clinique *S. aureus* T28.1 ; la rifampicine est utilisée en combinaison avec d'autres antibiotiques comme la vancomycine, particulièrement dans le traitement les infections ostéo-

articulaires impliquant des SARM. Ces tests ont été réalisés au moyen de la méthode de référence : *checkerboard* ou échiquier (Hsieh et al., 1993). Les indices de concentration d'inhibition fractionnaire (FIC pour *fractional inhibitory concentration* en anglais) ainsi calculés (méthodologie de calcul détaillée dans la partie 7.3.1.) permettent de définir le type d'effet de l'association : synergique, additif, indifférent ou antagoniste.

*Remarque*

Dans le but de s'approcher au mieux de la réalité, la variabilité des résultats entre les réplicats nous a amenés à donner un intervalle des indices FIC optimaux obtenus au cours des différents réplicats biologiques.

Le **tableau 22** présente les résultats des associations des produits entre eux. Lorsque le XN est associé avec le DMX ou la lupulone, une augmentation de l'activité a été mise en évidence. Dans le cas de l'association XN - lupulone, la CMI est optimisée d'un facteur deux donc l'effet est additif (FIC = 0,75). La plus intéressante CMI obtenue de la lupulone en présence de XN est de 0,3 µg.mL<sup>-1</sup>, au lieu de 1,2 µg.mL<sup>-1</sup> lorsqu'elle est seule. Au contraire, l'association de la lupulone avec le DMX diminue l'activité des deux produits, la CMI de la lupulone passe alors à 4,8 µg.mL<sup>-1</sup> au lieu de 1,2 µg.mL<sup>-1</sup>. La CMI du DMX reste quant à elle inchangée, l'effet déterminé est antagoniste.

**Tableau 22.** Effets de l'association des produits du houblon les plus actifs entre eux ; les indices FIC permettent de déterminer le type d'effet de l'association comme suit : synergique si FIC < 0,5, additif si 0,5 ≤ FIC ≤ 1, indifférent si 1 < FIC ≤ 4, antagoniste si > 4 ; XN : xanthohumol, DMX : desméthylxanthohumol, LUP : lupulone

Association	Indice FIC	Effet
XN - DMX	0,74 – 1	Additif à synergique
XN - LUP	0,75	Additif
DMX - LUP	5	Antagoniste

Le **tableau 23** présente les effets d'association des produits avec les antibiotiques. Le XN possède un effet intéressant avec tous les antibiotiques testés. Par exemple avec la rifampicine, les deux produits sont jusqu'à 8 fois plus actifs lorsqu'ils sont en mélange, l'association est synergique. Le XN montre également un effet additif à synergique lorsqu'il est associé à la ciprofloxacine, à la gentamicine ou à l'oxacilline. Ces données sont en accord avec la littérature. En effet, Natarajan et al. (2008) ont démontré une synergie d'association entre le XN et la ciprofloxacine, ainsi qu'avec la polymyxine. Il en est de même pour Rozalski et al. (2013) qui ont mis en évidence l'effet synergique d'un mélange de XN et d'oxacilline. Le DMX montre lui aussi des effets intéressants avec la plupart des antibiotiques testés, excepté avec la rifampicine pour laquelle l'association n'a pas d'effet ou est antagoniste. Son action avec la ciprofloxacine peut être indifférente à synergique. L'effet le plus intéressant est observé pour le mélange DMX - gentamicine. Pour l'un des réplicats, l'intensité des deux produits en mélange est

65 fois plus intense que lorsqu'ils sont seuls (FIC = 0,03). Pour les deux autres réplicats, l'augmentation de l'activité est toujours aussi intense pour la ciprofloxacine, mais plutôt de l'ordre de 8 fois pour le DMX. Aucune donnée dans la littérature ne semble disponible sur l'association du DMX avec des antibiotiques. Contrairement au XN et au DMX, les associations d'antibiotiques avec la lupulone semblent moins efficaces. Des effets antagonistes ont été décelés avec la gentamicine et la rifampicine, ce qui signifie que l'activité des deux produits en mélange s'inhibe réciproquement. L'association de la lupulone avec la ciprofloxacine montre un effet additif. La ciprofloxacine est jusqu'à 8 fois plus active lorsqu'elle est en mélange avec la lupulone, l'activité de cette dernière est 2 fois plus intense en association. L'additivité de ce mélange diffère de l'effet synergique trouvé par Natarajan et al. (2008) pour un mélange lupulone - ciprofloxacine. L'association avec l'oxacilline semble avoir un effet variable en fonction des réplicats.

**Tableau 23.** Effets de l'association des produits du houblon avec des antibiotiques sélectionnés ; les indices FIC permettent de déterminer le type d'effet de l'association comme suit : synergique si  $FIC < 0,5$  ; additif si  $0,5 \leq FIC \leq 1$  ; indifférent si  $1 < FIC \leq 4$  ; antagoniste si  $FIC > 4$  ; XN : xanthohumol, DMX : desméthylxanthohumol, LUP : lupulone, CIP : ciprofloxacine, GEN : gentamicine, OXA : oxacilline, RIF : rifampicine

Association	Indice FIC	Effet
CIP – XN	0,49 – 1	Additif à synergique
CIP – DMX	0,38 – 1,5	Indifférent à synergique
CIP – LUP	0,63 – 1	Additif

Association	Indice FIC	Effet
GEN – XN	0,14 – 1	Additif à synergique
GEN – DMX	0,03 – 0,28	Synergique
GEN – LUP	9	Antagoniste

Association	Indice FIC	Effet
OXA – XN	0,28 – 0,75	Additif à synergique
OXA – DMX	0,5 – 0,76	Additif
OXA – LUP	0,19 – 1,25	Indifférent à synergique

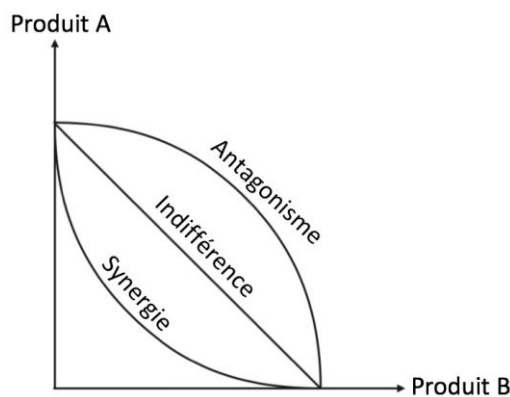
Association	Indice FIC	Effet
RIF – XN	0,25 – 0,75	Additif à synergique
RIF – DMX	1 – 5	Antagoniste à indifférent
RIF – LUP	2,2 – 6	Antagoniste à indifférent

Les résultats sont particulièrement intéressants pour le XN et la lupulone avec l'oxacilline. En effet, *S. aureus* T28.1 est résistant à cet antibiotique lorsqu'il est seul (CMI  $\geq 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Le XN ou la lupulone permettent de contourner la résistance de l'isolat clinique à l'oxacilline. La CMI de l'oxacilline atteint par exemple  $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  lorsqu'elle est mélangée au XN à une concentration de  $4,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Cette association permet également d'optimiser l'activité du XN qui est 4 fois plus intense. La lupulone est quant à elle jusqu'à 15 fois plus efficace en présence d'oxacilline à  $2 \text{mg.mL}^{-1}$  : la plus petite CMI obtenue était de  $0,08 \mu\text{g.mL}^{-1}$  au lieu de  $1,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Le DMX montre un effet additif avec l'oxacilline ( $0,5 \leq FIC \leq 0,76$ ) qui ne permet pas de contourner la résistance à l'antibiotique.

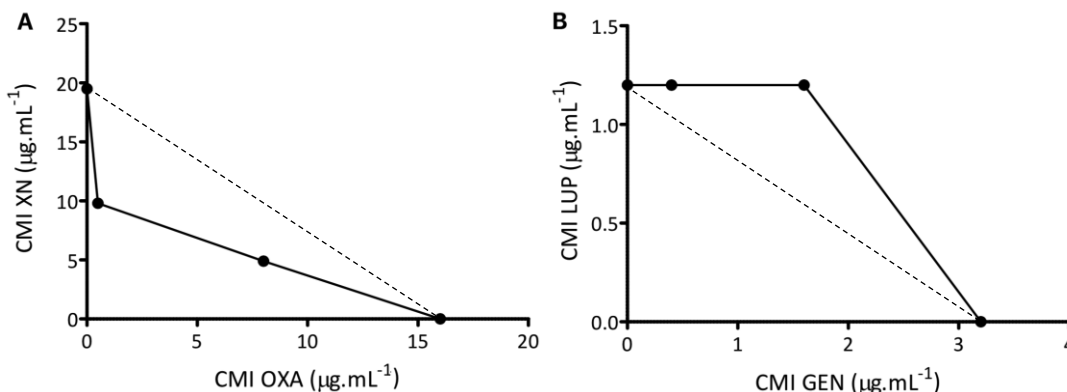
Il a récemment été démontré que le XN et la lupulone pouvaient avoir un effet positif en association avec certains antibiotiques vis-à-vis d'autres bactéries à Gram positif, mais aussi étonnamment envers de souches à Gram négatif. C'est le cas avec la tobramycine, la ciprofloxacine et la polymyxine sur des souches de *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus salivarius*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, et également vis-à-vis de certaines souches comme *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens* (Natarajan et al., 2008). Rozalski et al. (2013) ont également mis en évidence une synergie du XN avec l'oxacilline sur une souche de *S. aureus* sensible à la méticilline, alors qu'il n'y avait pas d'effet synergique sur une souche de SARM.

**Remarque**

Les résultats des tests en échiquier ont été volontairement présentés sous forme de tableaux indiquant les intervalles d'indices FIC déterminés. Une autre manière, plus visuelle, d'interpréter les résultats est cependant possible. Il s'agit de créer des isobogrammes dans lesquels, pour chaque condition, les CMI des produits A et B sont positionnés sur un graphique. La forme de la courbe obtenue reflète le type d'effet de l'association (Fig. 51). Voici quelques exemples avec les associations « produits de houblon - antibiotiques présentés précédemment » (Fig. 52).



**Figure 51.** Isobogramme montrant les interactions possibles entre deux produits en mélange (Wagner et Ulrich-Merzenich, 2009)



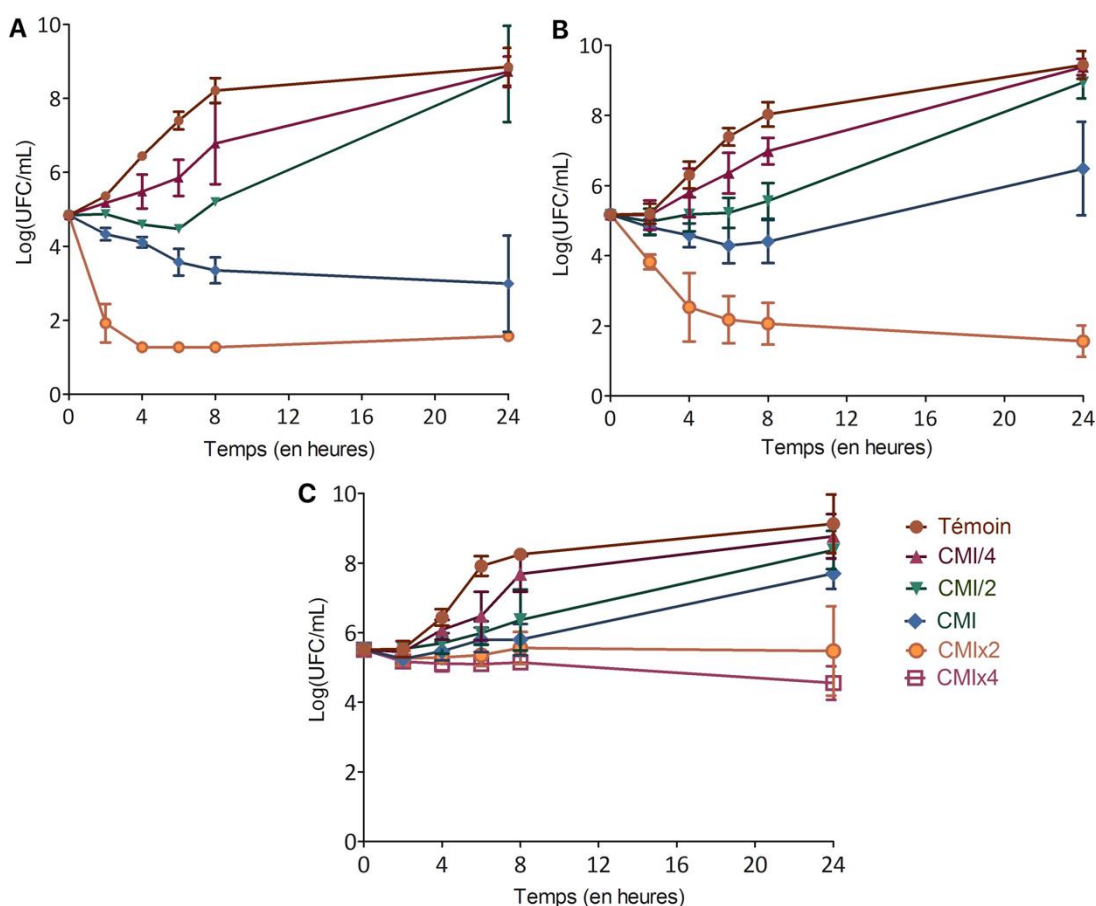
**Figure 52.** Exemples d'isobogrammes montrant (A) un effet synergique entre le xanthohumol (XN) et l'oxacilline (OXA) correspondant à un indice FIC de 0,28 et (B) un effet antagoniste entre la lupulone (LUP) et la gentamicine (GEN) pour un indice FIC de 9 ; la droite en pointillés montre le cas où la relation serait indifférente.

Les résultats obtenus ici sont intéressants car en cas de toxicité des molécules, la dose pourrait être diminuée s'ils sont associés entre eux ou avec certains antibiotiques.

#### 4.2.2. Analyse des courbes de croissance

Lorsqu'un produit est antimicrobien, il peut soit, inhiber la croissance du microorganisme, il est bactériostatique ; soit entrainer sa mort, il peut alors être bactéricide. La bactéricidie est définie précisément par une diminution de 3 log UFC/mL en 24 heures pour les antibiotiques, et une diminution 5 log UFC/mL en quelques minutes pour les antiseptiques. Les courbes de croissance permettent d'étudier ces paramètres. Elles évaluent la concentration d'une population bactérienne, à plusieurs intervalles, pendant 24 heures de culture, lorsque celle-ci est en contact avec différentes concentrations en produit actif (Zwietering et al., 1990).

Les courbes présentées en **figure 53** montrent une grande variabilité des effets de chaque produit à la CMI mais également à la CMIx2 et aux concentrations sub-inhibitrices.



**Figure 53.** Courbes de croissance du xanthohumol (A), du desméthylxanthohumol (B) et de la lupulone (C) sur *S. aureus* T28.1 ; le témoin utilisé ici est le témoin DMSO (diméthylsulfoxyde).

Le XN est le produit qui induit une diminution de la population bactérienne de manière plus drastique, en comparaison avec le DMX et la lupulone. En effet, dès la

CMI/2, la croissance est ralentie et la population bactérienne chute pendant les premières heures de culture, avant de reprendre sa croissance. À la CMI, le XN induit un déclin de 2 log UFC/mL après 24 heures de culture. Il peut être qualifié de bactéricide à la CMIx2 car il diminue de plus de 4 log UFC/mL la population bactérienne, en 4 heures. Cette dernière passe alors rapidement sous la limite de détection fixée à 1 log UFC/mL. Ce seuil est lié à un détail pratique de l'expérimentation. En effet, les dénombrements sont effectués sur 100 µL de l'inoculum total (10 mL). Si cet aliquot ne contient pas de bactéries, cela ne signifie pas que l'inoculum dans son ensemble en est dépourvu. La limite de détection ainsi de 1 log UFC/mL permet de ne pas exclure la présence de bactéries dans l'inoculum total. Le DMX semble avoir un effet biocide inférieur par rapport au XN. Le groupement méthoxy (OCH<sub>3</sub>) présent en position 6' sur le XN pourrait donc contribuer à l'effet bactéricide. Le DMX montre plutôt un effet inhibiteur de croissance, comme c'est le cas pendant les premières heures de culture à la CMI/2 ; à la CMI il induit un déclin de 1 log UFC/mL de la population bactérienne au cours des 6 premières heures de culture, mais la croissance repart ensuite. Comme le XN, le DMX devient bactéricide à la CMIx2. Le temps nécessaire pour remplir cette condition est légèrement plus long, la concentration bactérienne atteint le seuil de détection à 24 heures de culture. La lupulone est le produit le plus actif des trois composés sélectionnés, elle possède en revanche un faible potentiel biocide aux concentrations inhibitrices : elle est bactériostatique à la CMIx2 ; un léger déclin de la population bactérienne est visible à la CMIx4 mais celui-ci ne remplit pas les conditions de bactéricidie.

#### Remarque

Certains résultats pour la lupulone peuvent apparaître contradictoires.

La CMI déterminée en microplaques était de 1,2 µg.mL<sup>-1</sup> envers *S. aureus* T28.1. Sur ce même isolat clinique, les courbes montrent une croissance bactérienne jusqu'à 7 log UFC/mL après 24 heures de culture à la CMI. D'un point de vue pratique, la CMI est la plus faible concentration de produit n'entraînant pas de croissance visible à l'œil nu, après 24 heures de culture. Il se trouve que l'augmentation de 1 log UFC/mL par rapport à l'inoculum initial de 6 log UFC/mL, n'entraîne pas de trouble visible à l'œil nu, il s'agit donc bien de la CMI.

#### 4.2.3. Quantification de l'effet post-antibiotique

Cette méthode permet de voir si après inactivation d'un produit antibactérien, celui-ci a toujours un effet sur la bactérie. Lorsqu'une population bactérienne se trouve dans un environnement favorable, elle va commencer sa croissance rapidement. Après avoir été en contact avec un produit antibactérien, il se peut que celle-ci reste inhibée un

moment et que sa croissance ne reprenne qu'après un temps de latence : c'est l'effet post-antibiotique (Craig, 1991 ; MacKenzie et Gould, 1993). Une suspension bactérienne est d'abord mise en contact avec chacun des produits, à plusieurs concentrations, pendant 2 heures. Après traitement, le produit est inactivé. Une courbe de croissance est ensuite réalisée, puis par comparaison avec le témoin, un temps de latence est calculé pour chaque concentration de produit (méthodologie de calcul détaillée dans la partie 9.3.3.). Les données présentées dans le **tableau 24** montrent les temps de latence maximums déterminés au sein des trois réplicats réalisés.

Pour ce paramètre, les chalcones se démarquent de la lupulone. Elles entraînent une latence de croissance pendant plusieurs heures après leur inactivation, même en concentration sub-inhibitrice. Le XN montre un effet dépendant de la dose, il démarre à 1h34 de latence après exposition à une dose équivalente à la CMI/2 et peut aller jusqu'à 3h29 de latence à la CMIx4. Le DMX possède un effet plus régulier avec 2h à 2h40 de retard de croissance engendré pour toutes les concentrations testées. L'effet post-antibiotique de la lupulone est également présent, mais celui-ci est faible par rapport aux deux chalcones. Il est de moins de 30 minutes en concentration sub-inhibitrice et passe en moyenne à 50 minutes à la CMI et au-dessus.

**Tableau 24.** Temps de latence maximums observés sur une population de *S. aureus* T28.1 après 2 heures de traitement avec le xanthohumol (XN), le desméthylxanthohumol (DMX) ou la lupulone, en comparaison avec le témoin DMSO

	CMI/2	CMI	CMIx2	CMIx4
<b>XN</b>	1h34	2h23	2h05	3h29
<b>DMX</b>	2h10	2h10	2h32	2h40
<b>Lupulone</b>	26 minutes	53 minutes	54 minutes	47 minutes

Ces données sont intéressantes car elles donnent une idée de la durée entre les prises à préconiser pour une molécule donnée permettant un traitement optimal. Il est admis que la plupart des antimicrobiens, qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique, engendrent un effet post-antibiotique contre les cocci à Gram positif. Les bacilles à Gram négatif sont généralement moins sensibles à ce type d'effet (Spivey, 1992).

#### 4.2.4. Mise en évidence de l'effet anti-biofilm

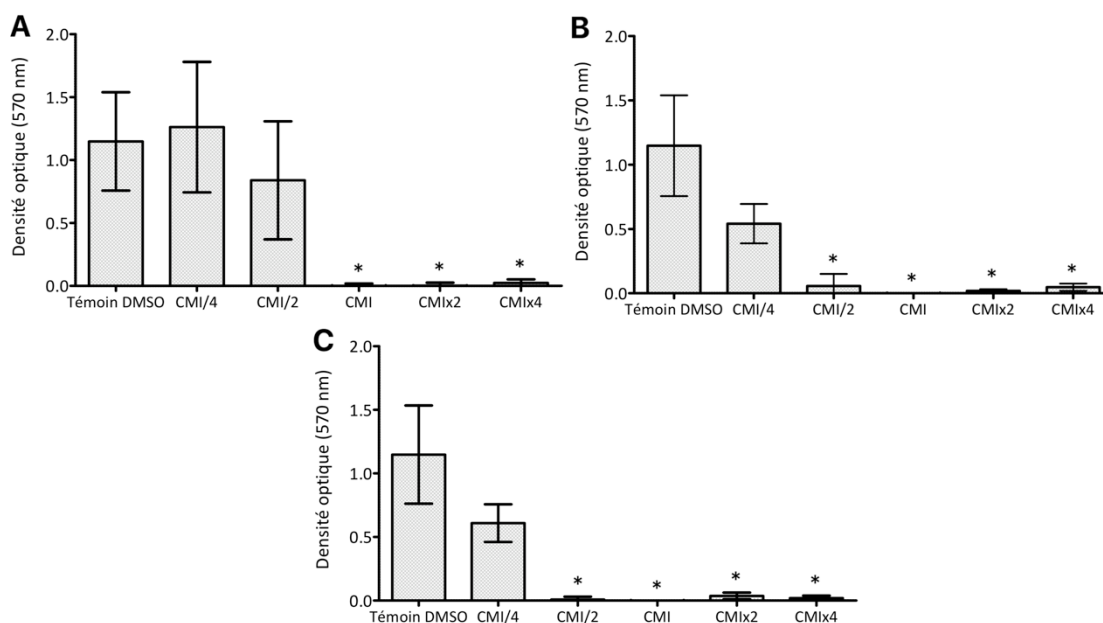
Les biofilms contribuent à la résistance bactérienne aux antibiotiques. Ils forment une enveloppe de protection aux produits antimicrobiens, la présence de bactéries dont le métabolisme est ralenti au sein de ces communautés, contribue également à limiter leur vulnérabilité (Stoodley et al., 2002 ; Lewis, 2008). Les biofilms peuvent se développer sur les surfaces biotiques et abiotiques. Ils constituent un problème pour le traitement des infections en médecine, mais également dans les chaînes de production des industries pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires, par exemple pour le nettoyage et la désinfection des machines. Il s'agit donc d'un paramètre important dans



la lutte contre les souches pathogènes, d'autant plus lorsque celles-ci développent des résistances aux antibiotiques. On estime aujourd'hui que 60% des infections impliquent un biofilm. Les staphylocoques, et surtout *S. aureus*, font partie des bactéries formant les biofilms les plus denses et sont donc difficiles à combattre (Mack et al., 2004).

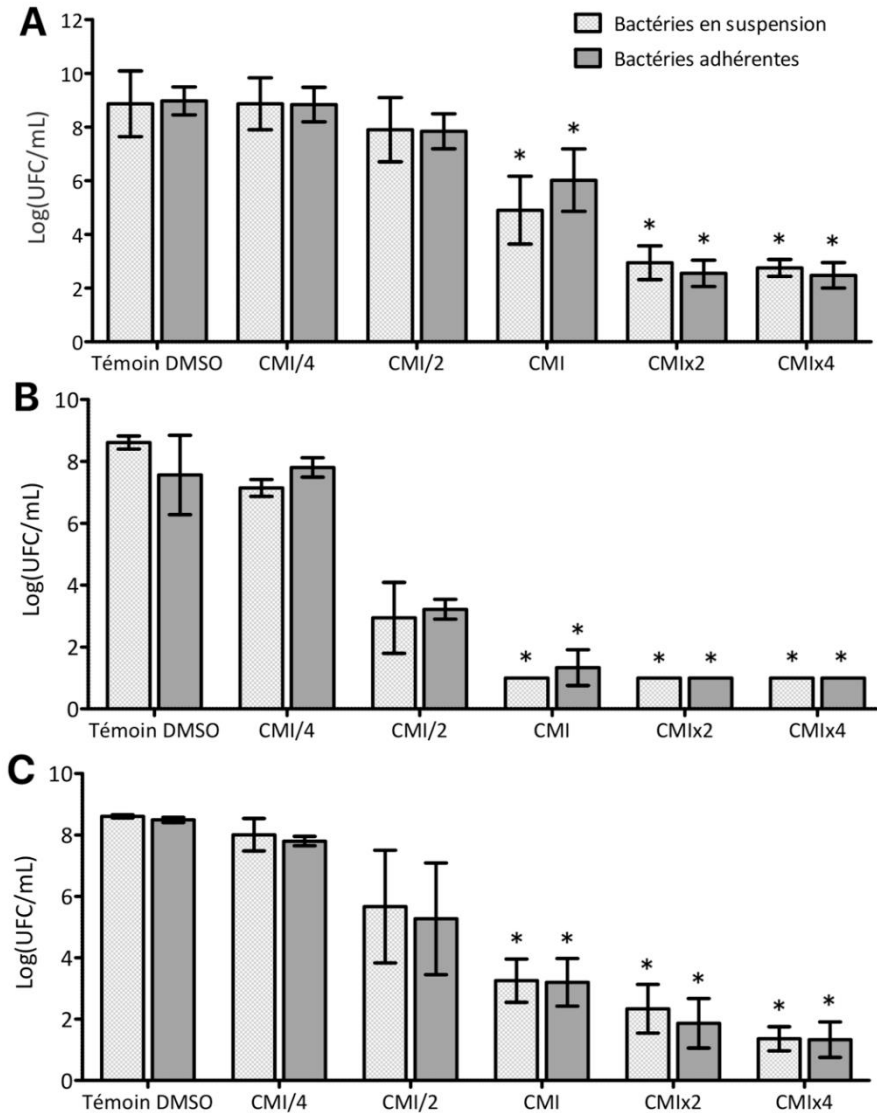
Le potentiel anti-biofilm des produits sélectionnés du houblon a été évalué de différentes manières (1) plusieurs surfaces ont été utilisées : surface inerte et substitut osseux ; (2) plusieurs effets ont été étudiés : impact sur la formation du biofilm et impact après formation du biofilm, donc plutôt sur sa destruction.

Les trois produits montrent un effet inhibiteur de la formation de biofilm sur surface inerte, avec un effet en concentrations sub-inhibitrices pour le DMX et la lupulone (**Fig. 54**). Le XN inhibe presque totalement la formation du biofilm de *S. aureus* T28.1 à partir de la CMI, ce qui semble corrélérer avec le déclin de la population bactérienne observé sur les courbes de croissance (**Fig. 53A**). Par comparaison, Rozalski et al. (2013) ont également mis en évidence l'activité anti-biofilm sur surface inerte à la CMI d'un extrait de houblon enrichi en XN à hauteur de 74,8% ; ainsi que de la molécule pré-purifiée à hauteur de 86,5%, sur une souche de *S. aureus*. Ces valeurs sont légèrement inférieures à celles obtenues ici, envers l'isolat clinique de SARM T28.1. Le DMX et la lupulone montrent un effet encore plus intéressant. Ils inhibent la formation du biofilm quasiment totalement en concentration sub-inhibitrice (CMI/2). Contrairement au XN, celui-ci n'est probablement pas corrélé à l'activité biocide des produits. Ces résultats signifient que si ce type d'effet est recherché, la dose pourrait être diminuée, le produit gardera alors son efficacité.



**Figure 54.** Effet inhibiteur de production de biofilm sur surface inerte du xanthohumol (A), du desméthylxanthohumol (B) et de la lupulone (C) sur *S. aureus* T28.1 ; les conditions marquées par une étoile montrent une différence significative par rapport au témoin avec un risque  $\alpha$  de 5% après les tests de Kruskal-Wallis et de Dunn.

La même tendance a été retrouvée sur le substrat naturel de la souche modèle *S. aureus* T28.1 : les disques de substitut osseux (**Fig. 55**). Avec ce substrat, le XN inhibe la formation du biofilm à environ 30% à la CMI et 70,5% à la CMIx2. Il est à nouveau moins efficace que le DMX et la lupulone qui entraînent une diminution du nombre de cellules adhérentes dès la CMI/2 et de manière plus intense à la CMI avec 82,4% et 62,3% d'inhibition, respectivement. Même si ce potentiel est moins important sur disques de substituts osseux, il reste intéressant au regard des faibles concentrations efficaces, surtout pour la lupulone qui possède une CMI très faible (1,2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

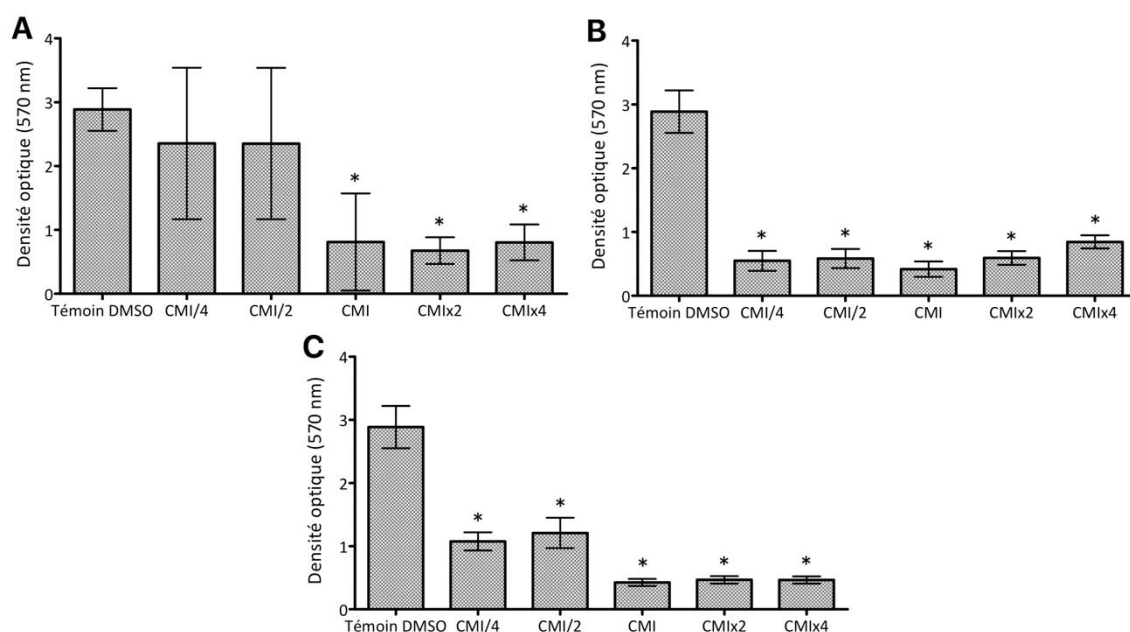


**Figure 55.** Effet inhibiteur de la formation du biofilm de *S. aureus* T28.1 sur disques de substituts osseux du xanthohumol (A), du desméthylxanthohumol (B) et de la lupulone (C) ; les conditions marquées avec une étoile montrent une différence significative par rapport au témoin avec un risque  $\alpha$  de 5% après les tests de Kruskal-Wallis et de Dunn (A) ou ANOVA et test de Tukey (B, C) ; le seuil de détection de cette méthode est de 1 log UFC/mL.

Nos résultats montrent également que les trois produits sont capables de détruire le biofilm de *S. aureus* T28.1 après sa formation (**Fig. 56**). Cela signifie également que le biofilm n'empêche pas les produits d'agir. À nouveau, le XN garde son potentiel à la CMI

avec 74% de destruction du biofilm. Cet effet ne semble pas dépendant de la dose car il est similaire à la CMIx2 et à la CMIx4. Le DMX et la lupulone semblent encore plus efficaces dans ces conditions, ils détruisent le biofilm dès la CMI/4 à 81% et 62% respectivement. Peu de différences sont visibles pour les concentrations supérieures, le maximum d'inhibition observée est de 85%. Contrairement au XN, cet effet ne semble pas corrélé à l'activité biocide des produits.

Bogdanova et al. (2018) ont également étudié le potentiel anti-biofilm de certains produits du houblon envers *S. aureus*. Bien qu'ils aient déterminé une activité antibactérienne plus intéressante (valeurs de CMI plus faibles que celles que nous obtenons), le potentiel anti-biofilm semble bien inférieur. Il est important de préciser que la pureté des produits testés dans cette étude (XN à 85%, humulone à 83,2% et lupulone à 87,3%) est inférieure à celle que nous avons imposée pour nos produits. Parmi les trois produits testés dans leur étude : le XN, l'humulone et la lupulone, c'est l'acide  $\beta$  qui se montre le plus efficace avec plus de 90% d'inhibition à partir de 30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  sur la souche de SARM testée. À titre comparatif, ils ont mis en évidence 30,7% d'inhibition du biofilm à 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ce qui reste bien inférieur à nos résultats (85% à 1,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Ces auteurs ont également démontré l'activité anti-biofilm des produits du houblon contre d'autres espèces de staphylocoques, comme *S. epidermidis* et *S. capitis* (Bogdanova et al., 2018).



**Figure 56.** Effet destructeur de biofilm sur surface inerte du xanthohumol (A), du desméthylxanthohumol (B) et de la lupulone (C) sur *S. aureus* T28.1 ; les conditions marquées par une étoile montrent une différence significative par rapport au témoin avec un risque  $\alpha$  de 5% après ANOVA et le test de Tukey.

**Remarque**

La comparaison des valeurs obtenues ici avec les données de la littérature montre une importante variabilité, pouvant par exemple s'expliquer par la différence de pureté des produits testés. Le fait de travailler avec du vivant entraîne une variabilité supplémentaire difficilement maîtrisable. De plus, les souches et les méthodes utilisées étant différentes, les résultats ne sont donc pas directement comparables.

### 4.3. Cytotoxicité des extraits, sous-extraits et produits actifs

Après avoir mis en évidence les propriétés antibactériennes de l'extrait brut, du sous-extrait DCM, ainsi que des produits purifiés des cônes du houblon, et avant de pouvoir envisager des applications chez l'Homme, il est important d'évaluer leur cytotoxicité. Ces tests ont été effectués dans différents laboratoires selon la disponibilité des lignées cellulaires de fibroblastes sains (WI-38), d'hépatocarcinome (HepG2) et d'ostéosarcome (MG-63). Dans chacun des cas, les  $CI_{50}$  ont été déterminées (**Tableau 25**).

La toxicité de l'extrait brut et du sous-extrait DCM de cônes femelles est globalement plus importante que l'activité antimicrobienne. En effet, les CMI envers les divers pathogènes étudiés sont supérieures aux  $CI_{50}$  obtenues sur les lignées cellulaires. L'extrait brut et le sous-extrait DCM induiraient donc plus de 50% de mort cellulaire aux doses actives. Une exception a été constatée : sur les ostéoblastes, la CMI du sous-extrait DCM envers certains staphylocoques ( $9,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) est inférieure à la  $CI_{50}$  ( $21,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). La dose active est donc moins toxique.

**Tableau 25.** Résultats des tests de cytotoxicité montrant les  $CI_{50}$  (en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) des extraits, sous-extraits et des produits purifiés actifs du houblon sur fibroblastes humains (WI-38), hépatocytes (Hep-G2) et ostéoblastes humains (MG-63) après 72h d'exposition pour WI-38 et 48h pour Hep-G2 et MG-63 ; la camptothécine est utilisée comme témoin positif ;  $CI_{50}$  = concentration inhibant 50% de la viabilité cellulaire, EC : écart-type standard

	WI-38		Hep-G2		MG-63	
	$CI_{50}$	EC	$CI_{50}$	EC	$CI_{50}$	EC
<b>Extrait brut hydro-alcoolique</b>	7,61	0,06	6,85	2,52	31,42	8,14
<b>Sous-extrait DCM</b>	5,16	1,02	6,54	2,10	21,07	0,41
<b>XN</b>	6,95	0,51	2,50	0,80	10,39	2,58
<b>DMX</b>	60,71	2,53	22,41	2,88	39,53	3,26
<b>Lupulone</b>	1,13	0,04	1,22	0,46	4,33	0,45
<b>Camptothécine</b>	0,06	0,01	0,37	0,19	4,42	1,50

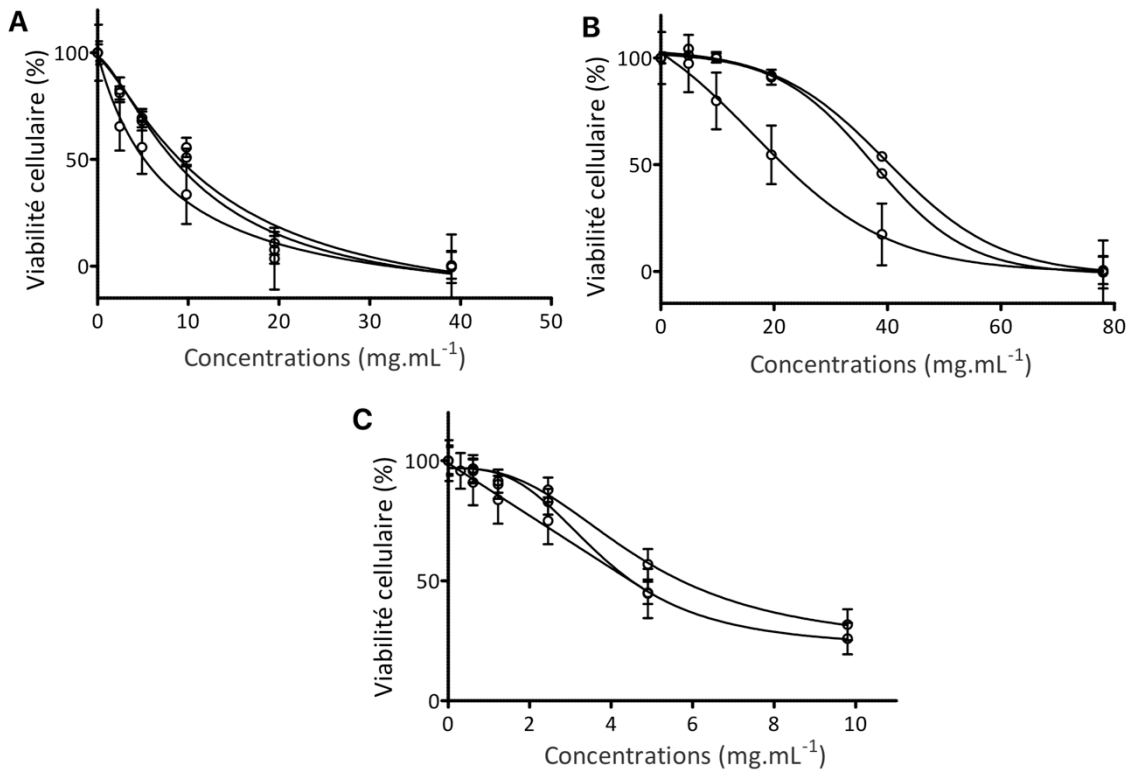
Parmi les trois produits sélectionnés et pour toutes les lignées étudiées, le DMX est le moins toxique (**Tableau 25**). Cependant, son activité modérée envers les bactéries,

CMI de 19,5 à 39  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  pour des souches de *S. aureus*, le rend toxique sur les hépatocytes (HepG2) et ostéoblastes (MG-63) mais pas sur les fibroblastes (WI-38).

Le XN est quant à lui, toxique aux doses actives sur toutes les lignées étudiées (**Tableau 25**). Les  $\text{Cl}_{50}$  varient de 2,5 à 10,39  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  alors que la CMI envers *S. aureus* T28.1 est de 9,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Plusieurs études traitent de la cytotoxicité de ce produit dans la littérature. Il est admis que sa toxicité sur cellules saines est moindre par rapport à son impact sur cellules cancéreuses (Ho et al., 2008 ; Dorn et al., 2010; Yong et al., 2015). Ho et al. (2008) ont par exemple déterminé des  $\text{Cl}_{50}$  de 38 et 59  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  pour des cellules d'hépatocarcinome et une  $\text{Cl}_{50}$  de 75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  sur des hépatocytes sains, après 4 heures d'exposition. Dorn et al. (2010) ont également déterminé des  $\text{Cl}_{50}$  de 8,9  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  pour des hépatocytes cancéreux (HepG2 et Huh7) et des  $\text{Cl}_{50}$  supérieures à 35  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  sur hépatocytes sains, après 48 heures de traitement. Yong et al. (2015) ont déterminé une  $\text{Cl}_{50}$  d'environ 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  pour le XN sur des cellules pulmonaires cancéreuses (A549). Ces valeurs sont, dans la plupart des cas, plus élevées que les  $\text{Cl}_{50}$  déterminées ici : de 2,5 à 10,39  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; le XN serait donc moins toxique si on se fie aux données de la littérature. Nos valeurs n'ont en revanche, pas montré de différence de toxicité sur cellules saines ou cancéreuses. Sur cellules, le XN pourrait être toxique à certaines doses en induisant l'apoptose par activation d'un facteur pré-apoptotique, la caspase 3 ; ou par le biais d'une diminution du potentiel de membrane mitochondrial (Zenger et al., 2015). Le XN pourrait également inhiber la croissance cellulaire et induire l'apoptose de cellules hépatiques cancéreuses en agissant au niveau de la voie de signalisation impliquant le NF- $\kappa$ B et la protéine p53 (Zhao et al., 2016). Le XN a même fait l'objet d'études *in vivo* sur des souris, des rats et des études cliniques chez l'Homme (Dorn et al., 2010). Ces études ont à chaque fois montré l'innocuité de la molécule aux doses testées (détails dans la partie 2.5.1.).

En comparaison avec le XN, la cytotoxicité des acylphloroglucinols a été peu étudiée. Les acides  $\alpha$  seraient moins toxiques que les acides  $\beta$ . Farag et Wessjohann (2013) ont déterminé des  $\text{Cl}_{50}$  de 13,2 et 15,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  pour des dérivés de l'humulone, envers des lignées cancéreuses de prostate (PC3) et de colon (HT29) contre 2,4 et 8,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivement, pour les acides  $\beta$ . Une attention particulière a été portée à la lupulone. Son activité antibactérienne très prononcée, la rend non toxique aux doses actives. Par exemple sur les ostéoblastes MG-63, aucune mort cellulaire n'a été constatée à 1,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (CMI envers *S. aureus* T28.1, **Fig. 57**). De plus, aux doses anti-biofilm (0,6 voire 0,3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) plus de 80% de viabilité est constatée sur Hep-G2 (données non montrées). À titre comparatif, Mouratidis et al. (2013) ont déterminé des  $\text{Cl}_{50}$  de 3,7 et 4,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  envers des cellules cancéreuses de prostate (PC-3 et DU-145), ce qui est proche de nos résultats. Tyrrell et al. (2012) ont montré une toxicité légèrement plus faible avec des  $\text{Cl}_{50}$  de 3,7 à 16,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  envers des lignées cellulaires cancéreuses du sein (MCF-7 et MDA-MB-231). Une  $\text{Cl}_{50}$  d'environ 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a été déterminée pour un mélange

d'acides  $\alpha$  et  $\beta$  vis-à-vis de cellules Caco-2 (Machado et al., 2017). Dans toutes ces études, les valeurs de  $CI_{50}$  sont bien supérieures à l'activité antibactérienne décelée ici.



**Figure 57.** Courbes de viabilité cellulaire d'ostéoblastes (MG-63) montrant l'effet de différentes concentrations en xanthohumol (A), desméthylxanthohumol (B) et lupulone (C) ; les trois courbes représentent les trois réplicats biologiques.

#### Remarque

Le temps de traitement varie parfois en fonction des tests, WI-38 sont restés 72 heures en contact avec les produits, contrairement à 48 heures pour Hep-G2 et MG-63. De ce fait, il se peut que la toxicité envers WI-38 soit un peu surestimée par rapport aux deux autres lignées.

#### 4.4. Conclusion et perspectives

Le potentiel antibactérien des cônes femelles de houblon vis-à-vis des bactéries à Gram positif a dans un premier temps été confirmé. L'activité a ensuite été orientée vers les composés apolaires du sous-extrait DCM. Les six composés phénoliques prénylés majoritaires purifiés à partir de ce dernier, des chalcones et des dérivés d'acylphloroglucinols, ont montré une activité antibactérienne élevée envers des souches de *S. aureus*, qu'elles soient sensibles ou résistantes à la méticilline. Les trois

produits les plus actifs : le XN, le DMX et la lupulone, ont été sélectionnés pour des expérimentations complémentaires.

Dans le but d'évaluer le potentiel de ces composés envers un isolat clinique de SARM, provenant d'une infection osseuse, *S. aureus* T28.1, plusieurs paramètres ont été étudiés. D'une manière générale, les chalcones sont davantage bactéricides que la lupulone ; bien que celle-ci soit la plus active, elle entraîne un ralentissement de la croissance bactérienne mais n'est pas biocide. La lupulone possède également un effet post-antibiotique faible en comparaison avec le XN et le DMX. Dans le cadre d'un traitement anti-infectieux, elle devrait donc probablement être prescrite à intervalles plus rapprochés. Les trois produits montrent un effet inhibiteur et destructeur de biofilm, à la fois sur surface inerte et sur le substrat réel du modèle d'étude, un substitut osseux. Contrairement au XN dont l'efficacité anti-biofilm est décelée à partir de la CMI et semble corrélée à l'activité biocide ; le DMX et la lupulone sont efficaces dès les concentrations sub-inhibitrices (CMI/2 voire CMI/4), cet effet serait donc indépendant de la bactéricidie. Le XN, le DMX et la lupulone présentent donc des avantages qui diffèrent selon l'objectif souhaité. D'après ces analyses effectuées *in vitro*, ils constituent de bons candidats dans la lutte contre les SARM. De plus, les effets synergiques et additifs de ces produits en association avec certains antibiotiques laissent penser qu'ils agissent différemment des antibiotiques connus. Leur utilisation en combinaison pourrait être une alternative pour le traitement des infections impliquant des SARM. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication soumise dans *Phytotherapy Research*<sup>1</sup>.

D'un point de vue fondamental, les mécanismes d'action responsables de l'activité antibactérienne de ces composés sont inconnus. L'identification de la cible précise et du mécanisme permettant de contourner la résistance aux antibiotiques est un objectif futur. Pour cela, des mutants résistants à nos produits pourraient être créés. Leur séquençage permettrait, par comparaison avec des souches sensibles, d'émettre des hypothèses sur la cible des composés étudiés. En effet, la différence de structure avec les antibiotiques utilisés aujourd'hui et les effets synergiques décelés nous amènent à penser que le mode d'action sera différent des antimicrobiens connus.

D'un point de vue applicatif, une réflexion est à mener sur le mode d'administration optimal de ces composés. Leur large panel d'action vis-à-vis des bactéries à Gram positif est un atout considérable. Dans ce contexte, des analyses complémentaires sont nécessaires pour envisager concrètement une application dans le cadre du traitement

---

<sup>1</sup> Bocquet L, Sahpaz S, Bonneau N, Beaufay C, Mahieux S, Samaillie J, Roumy V, Bordage S, Hennebelle T, Chai F, Quetin-Leclercq J, Neut C et Rivière C. « Phenolic compounds from *Humulus lupulus* L. as natural anti-bacterial products: new weapons in the fight against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* ». *Phytotherapy Research*, soumise.

d'une infection. Les données de biotransformation explicitées dans la littérature tendent plutôt à une mauvaise biodisponibilité des composés phénoliques prénylés du houblon, lors d'une ingestion par voie orale. De plus, les tests de cytotoxicité effectués montrent une toxicité hépatique, même si ces données ne sont pas en accord avec la littérature (Weiskirchen et al., 2015). Seule la lupulone montre une toxicité relativement faible sur cellules hépatiques aux doses actives. Cependant, étant peu biodisponible, ces composés n'arriveraient pas sous leur forme initiale au foie. Il serait alors intéressant d'étudier les produits de transformation retrouvés dans le sang, afin de contrôler que leur activité antibactérienne soit préservée et d'évaluer leur cytotoxicité.

Parmi les trois lignées cellulaires testées, les ostéoblastes semblent être les moins sensibles aux extraits et produits de houblon. Une application osseuse pourrait donc être envisagée. De plus, la souche bactérienne sélectionnée pour les analyses complémentaires provient d'une ostéite chez un patient diabétique. Les infections du pied diabétique affectent un pied ulcéré sur deux et dans de nombreux cas, conduisent à des complications graves pouvant mener à l'amputation (Lipsky et al., 2012). La prévalence des SARM est souvent associée (Nicodème et al., 2015). Le traitement de ces infections peut être effectué par antibiothérapie parentérale ou locale, le traitement local est souvent préféré car les nécroses tissulaires sont mal irriguées, ce qui empêche un apport d'antibiotiques par voie sanguine. L'application locale d'antibactériens se développe de plus en plus et a déjà montré des résultats satisfaisants (Lipsky et Hoey, 2009). L'antibiothérapie topique présente l'avantage de pouvoir appliquer des concentrations élevées d'antimicrobiens directement sur le site de l'infection, sans être confronté aux troubles systémiques associés. Il serait néanmoins nécessaire de contrôler que les composés ainsi appliqués, ne passent pas dans la circulation sanguine. Les infections du pied diabétique génèrent de nombreux problèmes en termes de diagnostics et de soins thérapeutiques, en particulier pour le traitement des infections impliquant des souches résistantes aux antibiotiques. La formation de biofilms persistants est un frein supplémentaire. Le potentiel anti-biofilm des candidats étudiés ici, à la fois sur surface inerte et sur un substitut synthétique osseux, pourrait faire émerger une nouvelle perspective pour traiter ces infections. Dans ce contexte, la lupulone se démarque des autres composés. Sa CMI envers les SARM varie entre 0,6 et 1,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ; elle est efficace contre le biofilm bactérien à des concentrations encore inférieures : 0,3 et 0,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Ces doses sont très faibles et de ce fait, non toxiques pour l'organisme. Dans l'objectif d'approfondir ces perspectives d'application, une collaboration avec le Dr Nicolas Blanchemain (U1008, Controlled Drug Delivery Systems and Biomaterials, Université de Lille) a été initiée.

Dans le but d'élargir les cibles microbiennes potentielles du houblon, des essais antiparasitaires ont également été réalisés sur *Trypanosoma brucei brucei*, en



collaboration avec le Dr Claire Beaufay du laboratoire de pharmacognosie de l'Université Catholique de Louvain (Belgique), dirigé par le Pr Joëlle Quetin-Leclercq.

## Chapitre 5.

### Activité antifongique du houblon vis-à-vis de *Z. tritici*

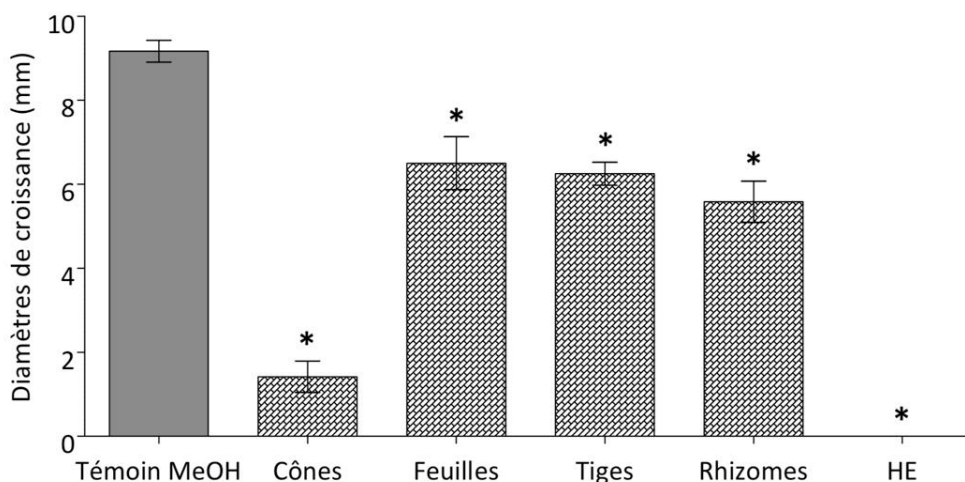
---

Le potentiel antifongique du houblon est connu depuis de nombreuses années (Mizobuchi et Sato, 1985). Il a principalement été évalué envers des champignons pathogènes de l'Homme ; très peu d'études sont disponibles sur les phytopathogènes. Comme toute activité biologique, l'activité antifongique varie selon l'organisme considéré. Des études ont par exemple montré un important potentiel des acylphloroglucinols contre des souches de *Penicillium* et d'*Aspergillus* (Van Cleemput et al., 2009). D'autres ont montré que certains champignons, comme *Tinea versicolor*, qui est impliqué dans les infections de la peau, sont capables de dégrader les acides amers (Huszczka et al., 2008). Aucune étude n'a encore été faite sur le potentiel antifongique du houblon vis-à-vis de *Z. tritici*, responsable de la septoriose du blé. Ces tests ont été effectués en collaboration avec le Dr Ali Siah (EA 7394, ICV) à l'Institut Supérieur d'Agriculture de Lille.

#### 5.1. Criblage des extraits des différentes parties de la plante

Le criblage de chacune des parties du houblon montre une activité antifongique intéressante de l'extrait hydro-alcoolique de cônes femelles ainsi que de leur huile essentielle, envers *Z. tritici* T01193 (**Fig. 58**). L'huile essentielle de cônes inhibe totalement la croissance fongique à  $1,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ , tandis que l'extrait hydro-alcoolique entraîne une diminution de 89%. Le test d'une gamme de concentrations en chacun de ces deux échantillons a permis de déterminer la  $CI_{50}$ , qui est de  $0,73 \text{ mg.mL}^{-1}$  pour l'extrait hydro-alcoolique de cônes et de  $0,36 \text{ mg.mL}^{-1}$  pour l'huile essentielle (**Tableau 26**). L'huile essentielle est donc plus active que l'extrait brut, ce qui n'est pas en accord avec Langezaal et al. (1992). Toutefois, dans leur étude, les auteurs ont testé un extrait chloroformique donc plus apolaire que notre extrait brut hydro-éthanolique. Comme expliqué dans les parties précédentes, le potentiel antimicrobien des cônes de houblon est bien documenté. Dans la littérature, les bactéries à Gram positif apparaissent néanmoins plus sensibles au houblon que les champignons (Bocquet et al., 2018a).

Les autres parties de la plante ne montrent pas par contre d'activité antifongique. Comme évoqué dans la synthèse bibliographique, les feuilles, les cônes et les rhizomes ne sont que très peu étudiées. Seules les feuilles ont déjà montré un potentiel antibactérien, plus faible par rapport à celui des cônes. Aucun effet antifongique de ces parties n'a en revanche été démontré (Abram et al., 2015).



**Figure 58.** Moyennes des diamètres de colonies (en mm) de *Z. tritici* T01193 en présence d'extraits des différentes parties de houblon à 1,25 mg.mL<sup>-1</sup> après 10 jours de culture à 21°C ; les conditions marquées par une étoile montrent une différence significative par rapport au témoin MeOH avec un risque  $\alpha$  de 5% après les tests ANOVA et de Tukey ; HE : huile essentielle

Les résultats du criblage des sous-extraits aqueux et DCM montrent que l'activité est dirigée vers les composés les plus apolaires de l'extrait brut (**Tableau 26**). Le sous-extrait DCM présente une CI<sub>50</sub> plus intéressante que l'extrait brut, les composés actifs y sont plus concentrés. Comme expliqué précédemment, le sous-extrait DCM se compose principalement de chalcones prénylées et de dérivés d'acylphloroglucinols, dont certains se sont avérés être antibactériens (chapitre 4) et sont connus pour leurs nombreuses activités biologiques (Langezaal et al., 1992 ; Buckwold et al., 2004 ; Zanoli et Zavatti, 2008 ; Abram et al., 2015). Parmi eux, les deux chalcones majoritaires, le XN et le DMX, ainsi que les principaux acylphloroglucinols, la *co*-humulone, l'humulone, la *co*-lupulone et la lupulone, purifiés précédemment, ont été testés envers ce champignon. L'activité antifongique de standards commerciaux qui constituent les composés majoritaires de l'huile essentielle, le  $\beta$ -myrcène, le *trans*-caryophyllène et l' $\alpha$ -humulène a également été évaluée.

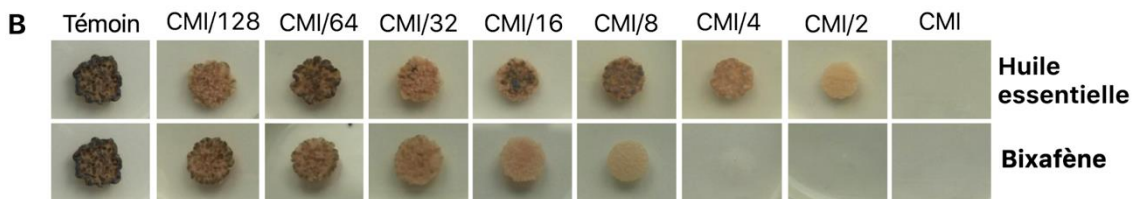
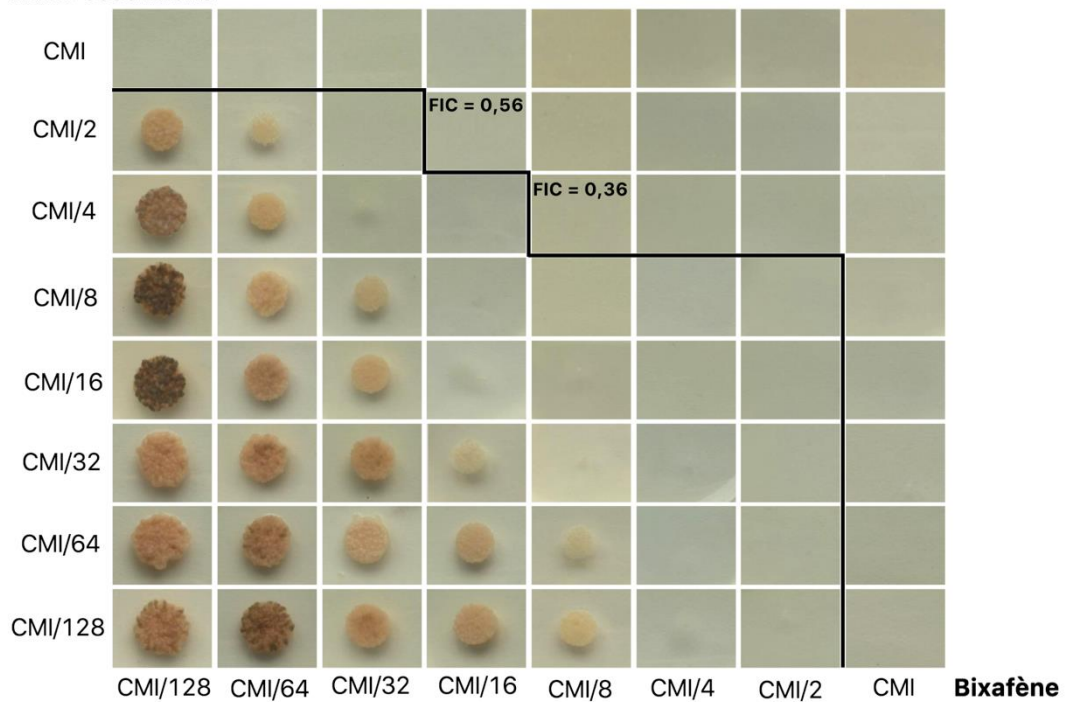
**Tableau 26.** CMI et CI<sub>50</sub> des extraits, sous-extraits et de l'huile essentielle de cônes femelles envers *Z. tritici* T02596

Extraits ou sous extraits de cônes femelles	CMI (mg.mL <sup>-1</sup> )	CI <sub>50</sub>
Extrait brut hydro-alcoolique	NA	0,73
Huile essentielle	0,63	0,36
Sous-extrait DCM	NA	0,53
Sous-extrait aqueux	NA	NA
Bixafène	1,25x10 <sup>-3</sup>	0,33x10 <sup>-3</sup>

En plus de l'apparition de souches résistantes aux fongicides de synthèse, la toxicité de ces derniers est très controversée. L'une des stratégies employées pour diminuer leur dose et de les combiner avec d'autres molécules, notamment des produits d'origine naturelle qui seraient moins toxiques ou plus sélectifs. Dans ce contexte, l'association

de l'huile essentielle avec le bixafène (témoin fongicide) entraîne un effet additif à synergique ( $0,36 \leq \text{FIC} \leq 0,56$ , **Fig. 59**). Les conditions optimales induisant l'indice FIC le plus faible sont un mélange de l'huile essentielle à la CMI/4 et du bixafène à CMI/8. Le bixafène peut donc être jusqu'à 8 fois plus actif lorsqu'il est combiné avec l'huile essentielle de houblon. L'huile essentielle peut, quant à elle, être 4 fois plus efficace lorsqu'elle est en mélange avec le bixafène. Le fait de combiner des fongicides conventionnels avec des produits d'origine naturelle a déjà montré une certaine efficacité (Pyun et Shin, 2006).

**A Huile essentielle**



**Figure 59.** Échiquier montrant l'effet positif de l'association huile essentielle – bixafène (A) sur le diamètre des colonies de *Z. tritici* T02596, en comparaison avec les produits seuls (B) ; la zone à gauche du trait noir montre les boîtes sur lesquelles il y a présence du champignon (ce qui n'est pas toujours évident sur les photos) ; la zone à droite du trait noir montre les associations actives donc l'inhibition de la croissance fongique ; les deux photos avec les indices FIC constituent les combinaisons de concentrations les plus efficaces ; si l'indice FIC < 0,5 alors l'association est synergique, elle est additive si  $0,5 \leq \text{FIC} \leq 1$ .

**5.2. Identification des produits actifs**

Au sein du sous-extrait DCM, l'activité semble répartie entre les chalcones et les acylphloroglucinols (**Tableau 27**). Parmi les chalcones, seul le DMX est actif. Il semblerait que ce soit la première fois qu'une activité antifongique soit associée à ce composé. Le

XN n'est pas actif. Il a pourtant déjà montré des activités antifongiques envers *Trichophyton spp.* (Gerhäuser, 2005a).

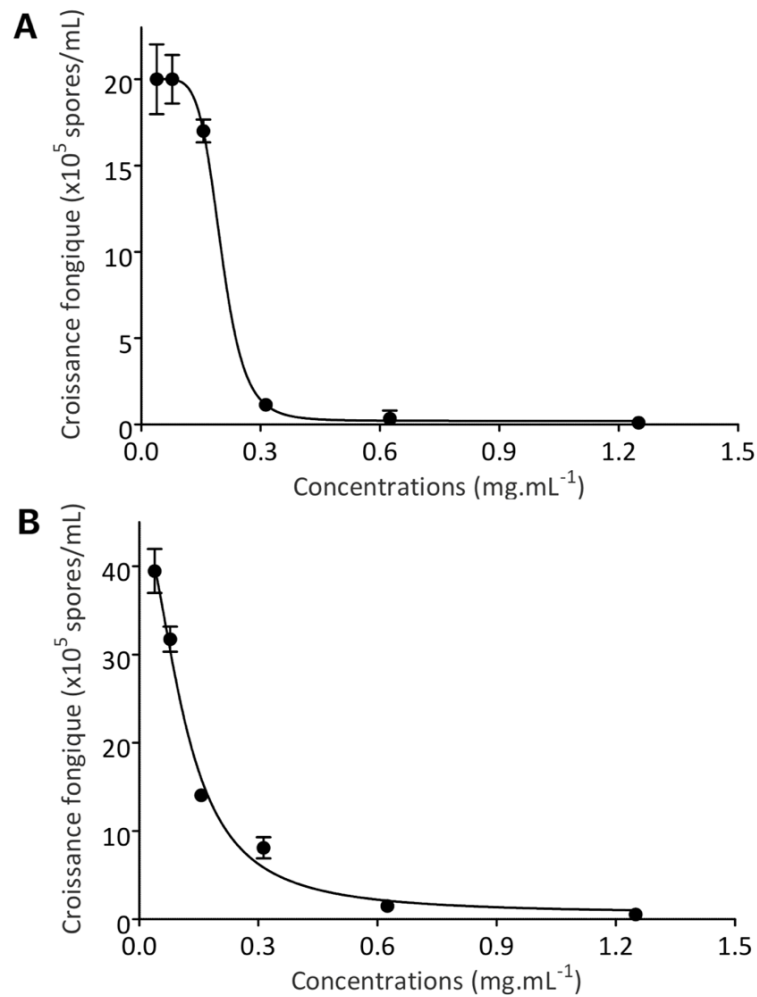
Concernant les dérivés d'acylphloroglucinols, seule la CMI de la *co*-humulone a été déterminée. L'humulone ainsi que les acides  $\beta$  sont nettement moins actifs. Il a déjà été montré que les dérivés de l'humulone sont plus actifs que les dérivés de la lupulone vis-à-vis de pathogènes fongiques comme *Trichophyton sp.* et *Mucor sp.*, mais ils sont moins efficaces contre des souches de *S. aureus* (Mizobuchi et Sato, 1985). Contrairement à ce qui avait été annoncé pour l'activité antibactérienne, la longueur de la chaîne carbonée et l'hydrophobicité de ces composés ne sont pas un critère de l'activité antifongique.

**Tableau 27.** CMI et  $CI_{50}$  des produits purifiés des cônes femelles de houblon envers *Z. tritici* T02596

Composés purifiés des cônes femelles		CMI (mg.mL <sup>-1</sup> )	CI <sub>50</sub>
<b>Chalcones</b>	XN	NA	NA
	DMX	0,63	0,2
<b>Dérivés d'acylphloroglucinols</b>	Humulone	NA	0,6
	<i>co</i> -Humulone	0,63	0,11
	Lupulone	NA	0,66
	<i>co</i> -Lupulone	NA	0,74
<b>Fongicide de synthèse</b>	Bixafène	1,25x10 <sup>-3</sup>	0,33x10 <sup>-3</sup>

Le DMX et la *co*-humulone possèdent la même CMI et présentent des  $CI_{50}$  proches. Cependant, la **figure 60** suggère un effet fongicide des deux produits. La différence d'activité se trouve au niveau des faibles doses (< 0,3 mg.mL<sup>-1</sup>). Le DMX semble plus actif en dessous de 0,3 mg.mL<sup>-1</sup>. La *co*-humulone est donc légèrement moins active que le DMX aux très faibles doses.

Étonnamment, malgré l'importante activité de l'huile essentielle de cônes femelles, aucun de ses constituants majoritaires n'est actif :  $\beta$ -myrcène, *trans*-caryophyllène et  $\alpha$ -humulène. Aucune CMI n'a été déterminée, qu'ils soient testés indépendamment, ou en association dans les proportions de l'huile essentielle. L'activité de l'huile essentielle est donc probablement liée à un ou plusieurs composés plus minoritaires.



**Figure 60.** Effet de plusieurs concentrations en desméthylxanthohumol (A) et en *co*-humulone (A) sur une population de *Z. tritici* T02596

### 5.3. Conclusion et perspectives

L'activité antifongique envers ce phytopathogène est à nouveau localisée au niveau des cônes. Les composés responsables de l'activité sont des composés phénoliques prénylés et certains composés de l'huile essentielle. Contrairement à l'activité antibactérienne, seuls deux produits actifs ont été identifiés : le DMX et la *co*-humulone avec des  $CI_{50}$  de 0,2 et 0,11 mg.mL<sup>-1</sup> respectivement. Cette activité est modérée. Au regard de leur teneur dans les cônes, les tests *in planta* n'ont pas été envisagés. Malgré l'activité très intéressante de l'huile essentielle envers *Z. tritici*, aucun composé actif n'a été identifié, celle-ci étant probablement liée à des composés minoritaires. En revanche, l'association de cette dernière avec des antifongiques de synthèse constitue une perspective prometteuse dans la lutte contre ce pathogène. Dans ce contexte, des études complémentaires sont nécessaires, notamment pour évaluer le temps d'action et la stabilité de l'huile essentielle. Des systèmes, tel que l'encapsulation ou l'utilisation de cyclodextrines peuvent aider à stabiliser les huiles essentielles pour prolonger leur effet antimicrobien (Marques, 2010).

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication acceptée dans *Industrial Crops and Products*<sup>2</sup>.

Des essais visant à évaluer le potentiel antifongique du houblon envers d'autres phytopathogènes sont en cours dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Jérôme Muchembled et le Dr Caroline Deweer (EA 7394, ICV) : *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* et *Phytophthora infestans*

---

<sup>2</sup> Bocquet L, Rivière C, Dermont C, Samaillie J, Hilbert JL, Halama P, Siah A et Sahpaz S. 2018. « Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* ». *Industrial Crops and Products* 122: 290-297.

# **Troisième Partie**

## **Matériel et méthodes**



## Chapitre 6.

### Phytochimie : extraction, purification et caractérisation

---

#### 6.1. Préparation des extraits, sous-extraits et huiles essentielles des parties de houblon

##### 6.1.1. Matériel végétal

Les pieds femelles de houblon (cultivar Nugget) sont collectés à la ferme Beck de Bailleul (59, Hauts-de-France) mi-septembre de chaque année. Il s'agit de la période où l'agriculteur récolte les pieds de houblon, les cônes sont donc à maturité. Plusieurs pieds sont récupérés chaque année, les différentes parties de la plante sont séparées (cônes, feuilles et tiges). Les rhizomes sont disponibles au mois d'avril, avant les premières levées. Le cultivar Nugget a été sélectionné car il s'agit d'un cultivar produit dans la région Hauts-de-France. De plus, suite à une étude comparative de trois cultivars présents à la ferme Beck (Magnum, Challenger et Nugget). Celle-ci a montré que le cultivar Nugget est davantage riche en composés phénoliques prénylés et particulièrement en XN, molécule ciblée au début de l'étude.

Un pied mâle sauvage a également été collecté par le Dr Céline Rivière en bordure de forêt à Birieux dans l'Ain (01) à la fin de l'été 2015.

Après 10 jours de séchage à température ambiante, chaque partie est broyée puis stockée à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

##### 6.1.2. Réalisation des extraits et sous-extraits

Chaque échantillon de poudre a fait l'objet d'une extraction solide-liquide (S/L) avec un mélange EtOH/H<sub>2</sub>O (9:1, v/v) (**Fig. 22**). Ce mélange a été choisi pour solubiliser une large gamme de composés phénoliques. Sauf mention contraire, tous les solvants utilisés proviennent de VWR® (France). Plusieurs sessions de macérations successives (3 x 2 heures et 1 x 16 heures) sont réalisées sous agitation et à l'abri de la lumière. Entre chaque session, une filtration permet de récupérer le filtrat. Le marc est ensuite repris dans le même solvant pour la macération suivante. À la fin des quatre sessions, les filtrats sont regroupés et le solvant est évaporé grâce à un évaporateur rotatif (Heidolph™, Allemagne).

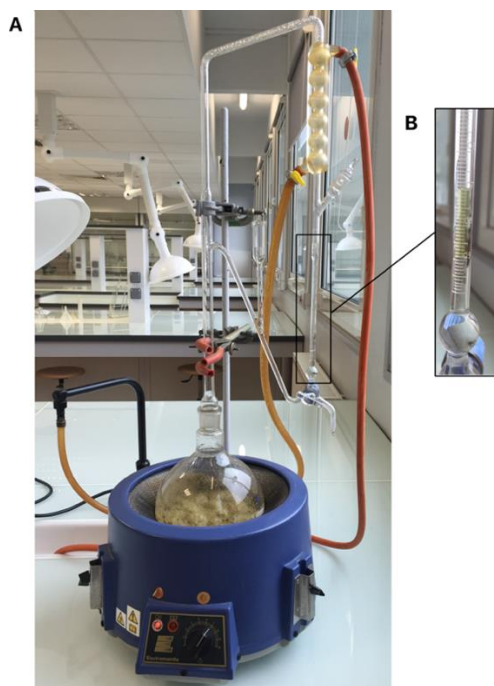
Les sous-extraits sont obtenus par fractionnement liquide-liquide (L/L). L'extrait brut hydro-alcoolique est solubilisé dans de l'eau distillée, la même quantité de DCM est ensuite ajoutée (**Fig. 22**). La non-miscibilité de deux solvants entraîne la répartition des molécules de l'extrait selon leur polarité, dans les phases aqueuse ou organique. La phase aqueuse est reprise par le DCM trois à quatre fois, jusqu'à épuisement. Les traces

d'eau présentes dans la phase organique sont éliminées par ajout de sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) puis le tout est filtré. Le DCM est ensuite évaporé jusqu'à obtenir un sous-extrait sec enrichi en composés phénoliques prénylés. La phase aqueuse est, quant à elle, congelée puis lyophilisée grâce à un lyophilisateur à ballons (Telstar Cryodos™, Espagne).

Le DCM est un solvant classé cancérigène, mutagène et reprotoxique (CMR). Nous avons essayé de limiter son utilisation. Dans une optique de chimie verte, un essai de fractionnement de l'extrait brut de cônes sur résine d'Amberlite XAD7HP (Sigma Aldrich®, USA) a été réalisé. Il s'agit d'une résine macroporeuse non ionisée et peu hydrophile (Paleos, 1969). Pour cela, une colonne en verre de 4 cm de diamètre avec un fritté poreux a été utilisée. Des billes de verre et du coton de verre sont d'abord placés dans le fond de la colonne. L'Amberlite est ensuite ajouté jusqu'à atteindre 20 cm de hauteur, un tassage rapide avec de l'eau est effectué. L'extrait préalablement repris dans de l'eau distillée (200 mL) est déposé en tête de colonne. L'élution se passe sans utilisation de pression et en deux temps. D'abord, 5 L d'eau permettent d'éluer les composés qui ne resteraient pas accrochés à la résine, comme les sucres et les molécules non aromatiques. Ensuite, plusieurs litres de MeOH emmènent les molécules aromatiques retenues sur la colonne. La partie aqueuse est ensuite lyophilisée, la phase organique est évaporée pour obtenir des sous-extraits secs.

### 6.1.3. Préparation des huiles essentielles

L'huile essentielle est obtenue par hydro-distillation de poudre préalablement mélangée à de l'eau, par le biais d'un appareil de Clevenger (**Fig. 61A**).



**Figure 61.** Appareil de Clevenger (A) utilisé pour distiller l'huile essentielle de cônes de houblon (B)

Le chauffe ballon est réglé au thermostat 8 jusqu'à ébullition, puis il est diminué au thermostat 6 pour le reste de l'extraction. La montée en température permet de libérer les composés volatils, qui seront ensuite condensés par le biais d'un réfrigérant. L'huile essentielle, plus ou moins dense que l'eau selon les cas, est alors collectée dans un tube gradué (**Fig. 61B**). Elle est récupérée à la fin de l'hydro-distillation par un robinet. Des essais ont été effectués avec les cônes, les feuilles et les tiges. La durée permettant un rendement optimal a été fixée à 4 heures.

## 6.2. Caractérisation des extraits, sous-extraits et huiles essentielles

### 6.2.1. Caractérisation par CCM

La CCM est une technique de chromatographie solide-liquide où la phase stationnaire est, dans notre cas, une plaque d'aluminium recouverte de silice avec un pigment fluorescent F254 (Macherey-Nagel™, Allemagne). La phase mobile ou éluant, qui est liquide, est un mélange de solvants. Le système principalement utilisé ici est adapté à la séparation des composés de l'extrait brut hydro-alcoolique de cônes femelles : Toluène/AcOEt/Acide formique (73:18:9, v/v). Un second système, mis au point pour le développement d'une méthode CPC permettant de purifier la lupulone a également été utilisé : Heptane/n-Propanol/Acide formique (90:15:0,5, v/v). Le mélange de solvants migre par capillarité le long de la phase stationnaire, emportant avec lui les molécules de l'extrait qui sont séparées selon leur affinité avec les phases mobile et stationnaire. La révélation de la plaque peut ensuite se faire de différentes manières. Une lecture sous lampe UV à 254 et 365 nm est d'abord effectuée, puis un révélateur chimique non spécifique (anisaldéhyde sulfurique) est pulvérisé. Après chauffage, plusieurs spots apparaissent, mettant en évidence l'éventuelle présence de composés n'absorbant pas à l'UV.

### 6.2.2. Caractérisation par CLHP-UV

La CLHP est également une technique de chromatographie solide-liquide. L'une des différences avec la CCM réside dans le fait que la phase mobile est pompée pour être injectée dans le système où la phase stationnaire est une colonne de silice compactée pouvant être de nature polaire ou apolaire. L'analyse se déroule sous haute pression, elle peut être qualitative et quantitative en fonction des objectifs. La détection UV permet d'obtenir un chromatogramme où chaque pic représente, en théorie, une molécule détectée à une longueur d'onde donnée.

La chaîne analytique CLHP-UV du laboratoire est une chaîne Shimadzu® équipée de 2 pompes LC-10AS, d'un détecteur UV à barrettes de diodes SPD-M20A et d'un système de contrôle SCL-10A. La phase stationnaire est une colonne VisionHT C18 HL (5 µm, 250

mm x 4,6 mm, Grace™, France) précédée d'une pré-colonne C18 HL (7,5 mm x 4,6 mm) de la même marque. Il s'agit d'une phase inverse. La phase mobile est composée de deux solvants (A) eau ultra pure (Millipore Integral 5 Milli-Q, Merck™, Allemagne) + 0,1% d'acide formique (Carlo ERBA Reagents™, Italie) ; (B) Acétonitrile (ACN) 100%.

Les longueurs d'onde employées pour la détection sont principalement : 254 nm (une des longueurs d'onde maximales d'absorption des acylphloroglucinols) et 370 nm (une des longueurs d'onde maximales d'absorption des chalcones prénylées). Pour les analyses, les extraits bruts sont préalablement solubilisés dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O (5:5, v/v) ou dans le MeOH selon leur solubilité, de manière à obtenir une concentration à 10 mg.mL<sup>-1</sup>, puis ils sont filtrés sur membrane PTFE 0,45 µm. Pour chaque analyse, 20 µL sont injectés par un injecteur automatique SIL-10AP. La méthode est adaptée aux cônes femelles de houblon, elle permet de séparer de manière efficace les composés phénoliques (**Tableau 28**). Elle s'effectue en gradient binaire avec un débit de 1 mL/min.

**Tableau 28.** Gradient de la méthode CLHP-UV optimisé pour l'extrait hydro-alcoolique de cônes femelles de houblon

Temps (min)	0	8	10	12	22	25	40	45	55
Pourcentage d'ACN (%)	10	20	25	27,8	27,8	75	75	100	100

Les sous-extraits aqueux sont solubilisés dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O (5:5, v/v), alors que les sous-extraits DCM sont solubilisés dans le MeOH. Une méthode a été adaptée à ces derniers (**Tableau 29**).

**Tableau 29.** Méthode CLHP-UV adaptée au sous-extrait DCM de cônes femelles de houblon

Temps (min)	0	5	30	35	45
Pourcentage d'ACN (%)	10	75	75	100	100

### 6.2.3. Dosage des produits par CLUHP-UV

Dans le cadre du stage de Justine Jacquin (stage de fin de cycle ingénieur de l'ENSAIA, Nancy, 2017-2018), le dosage des composés prénylés majoritaires du houblon dans les extraits bruts des diverses parties de la plante et les sous-extraits d'intérêt, a été réalisé avec l'aide du Dr Natacha Bonneau.

Ce dosage a été effectué par CLUHP-UV. L'appareil du laboratoire provient de chez Waters® (gamme Acquity). Il est équipé de deux pompes indépendantes, d'un injecteur automatique, d'un contrôleur, d'un détecteur UV à barrettes de diodes (DAD) ainsi que d'un spectromètre de masse ayant pour source d'ionisation l'ESI et pour analyseur un quadripôle. La détection UV a été choisie pour la quantification car avec le quadripôle, un manque de reproductibilité et de linéarité des gammes a été constaté. Comme pour la CLHP, la phase stationnaire est une phase inverse, il s'agit d'une colonne Waters® Acquity C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm) reliée à un filtre en ligne de 0,2 µm. La phase mobile est composée de deux solvants (A) eau ultra pure (Millipore Integral 5 Milli-Q, Merck™,

Allemagne) + 0,1% d'acide formique (Carlo ERBA Reagents™, Italie) ; (B) Acétonitrile (ACN) 100%. Une méthode a été adaptée pour l'analyse des extraits de houblon par CLUHP-UV (**Tableau 30**). Le débit est de 0,3 mL/min.

**Tableau 30.** Méthode adaptée en CLUHP-UV pour l'analyse des extraits et sous-extraits du houblon

Temps (min)	0	1	3	5	7	9,5
Pourcentage d'ACN (%)	50	50	75	75	100	100

Les produits utilisés pour ce dosage ont été purifiés comme expliqué dans la partie 6.3. Seule la lupulone commerciale (Toronto Research Chemicals™, Canada) a parfois été employée car obtenue en de trop faibles quantités par purification et déjà utilisée pour les tests biologiques. La pureté minimale exigée est de 95% (CLHP-UV 250-800 nm). Les composés sont solubilisés et dilués dans le MeOH. Les longueurs d'ondes utilisées sont 370 nm pour le XN, 330 nm pour l'humulone et la lupulone, celle-ci étant plus spécifique aux acylphloroglucinols que 254 nm. Le dosage a été effectué sur des solutions de chaque extrait brut et des sous-extraits préparées dans le MeOH et filtrées sur des filtres de 0,2 µm : à 100 µg.mL<sup>-1</sup> pour les extraits de cônes, dans le but de ne pas retrouver des valeurs hors des gammes étalons, car ils sont très concentrés en composés à doser ; à 1 mg.mL<sup>-1</sup> pour les extraits de feuilles, de tiges et de rhizomes.

Avant d'effectuer le dosage, des gammes étalons propres à chaque composé sont réalisées. Plusieurs paramètres doivent être validés, nous nous sommes appuyés sur les recommandations de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) (Thompson et al., 2002) et de l'Agence Européenne du Médicament (European Medicines Agency, 2015).

- **La linéarité** : chaque gamme étalon comporte suffisamment de points (5 ou plus si la gamme est étendue). Elle veille à englober les différents teneurs en produits dans les extraits et sous-extraits à doser. La courbe de calibration est réalisée par régression linéaire, en rapportant les aires sous courbes des produits en fonction de la concentration associée (n=3). Le coefficient de corrélation (R<sup>2</sup>) obtenu doit être proche de 1.
- **La déviation** : Pour chaque dilution, la différence entre la concentration théorique recalculée à partir de la droite de calibration, et celle obtenue suite aux analyses par CLUHP-UV, doit être inférieure à 15% pour chacun des points et 20% pour la LOQ. En effet, la LOQ étant une concentration particulièrement faible, elle est davantage sujette aux variations.
- **Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ)** : elles sont propres au composé analysé. Ces valeurs représentent la concentration pour laquelle les rapports signal/bruit sont de 3:1 pour la LOD, et de 10:1 pour la LOQ. La LOQ est la

première concentration de chaque gamme étalon. Si dans un extrait, la teneur en produit est inférieure à cette limite, il n'est pas quantifiable.

Après avoir déterminé et validé les gammes étalons, d'autres paramètres permettent d'évaluer la fiabilité de la méthode de dosage.

- **La sélectivité** : l'analyse d'un blanc MeOH (injection du solvant dans lequel est solubilisé l'extrait à doser) permet de montrer l'absence d'interférences au temps de rétention des produits d'intérêt, qui pourraient fausser les aires sous courbes à partir desquelles les concentrations sont calculées. Des blancs peuvent également être placés entre l'analyse des divers extraits, pour s'assurer de l'absence de contaminations croisées.
- **La précision** : la précision de la méthode est évaluée par deux paramètres : au sein d'une même session d'analyses avec trois injections de trois solutions mères différentes, c'est la variabilité intra-jour ou répétabilité ; entre plusieurs sessions indépendantes sur trois jours consécutifs, c'est la variabilité inter-jour ou fidélité. Elles ne doivent pas excéder 15%. Ces paramètres sont exprimés par le biais d'un coefficient de variation (CV en %) qui est déterminé à partir de la variance. La variance est le carré de l'écart type ( $\sigma^2$ ). Elle montre la dispersion d'une variable par rapport à la moyenne. Ici, la moyenne ( $\bar{x}$ ) de l'échantillon est considérée. Plusieurs types de variances sont déterminées :
  - En faisant la moyenne des variances obtenues suite à chacun des 3 jours de dosage, c'est le « Within Mean Square » (WMS). À partir de ce paramètre, il est possible de calculer le CV traduisant la répétabilité :

$$CV (\%) = \left( \frac{\sqrt{WMS}}{\bar{x}} \right) \times 100$$

Où  $\bar{x}$  est la moyenne de l'ensemble des données obtenues (n=9) ;

- En réalisant la moyenne  $\pm$  l'écart-type des moyennes obtenues suite aux 3 jours de dosage. La variance de l'écart type ainsi calculée, rapportée au nombre d'échantillons par série (n = 3) constitue le « Between Mean Square » (BMS). À partir de ce paramètre et par l'équation suivante, on obtient la variance inter-jour :  $\sigma_R^2 = (BMS - WMS)/\text{nombre d'échantillons par série}$ , qui permet de déterminer le CV traduisant la fidélité comme suit :

$$CV (\%) = \left( \frac{\sqrt{\sigma_R^2}}{\bar{x}} \right) \times 100$$

Où  $\bar{x}$  est la moyenne de l'ensemble des données obtenues (n=9).

#### 6.2.4. Caractérisation de l'huile essentielle par CPG-SM

L'huile essentielle a été caractérisée par CPG-SM à l'aide de Dr Charles Dermont (ISA, Lille). Seuls les composés présents en quantité supérieure à 1% ont été recherchés. L'appareil de CPG utilisé est un Varian CP-3800 (LabX™) muni d'une colonne capillaire VF-1ms (30 m x 0,25 mm) et couplé à un SM Varian Saturn 200 (LabX™). Le gradient de température est le suivant : 40°C (5 minutes), puis augmentation à 200°C à 2°C/minute (5 minutes), enfin 250°C (10 minutes). L'huile essentielle a préalablement été solubilisée à 1% dans de l'hexane, et 1 µL a été injecté à 250°C avec un split 50:50 en utilisant l'hélium en gaz vecteur. Des alcanes (C7, C10, C11, C12, C14, C15) ont été analysés avec la même méthode dans le but de déterminer les indices de Kovats des composés majoritaires (Girard, 1996).

### 6.3. Purification des composés phénoliques prénylés majoritaires des cônes femelles à partir du sous-extrait DCM

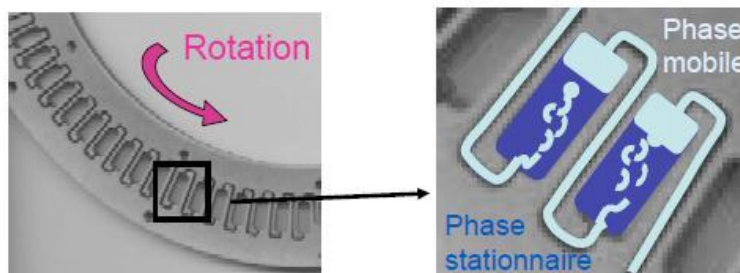
Les chalcones et les acylphloroglucinols majoritaires du sous-extrait DCM de cônes femelles de houblon ont été purifiés, par deux techniques de chromatographie : la CPC et la CLHP préparative. L'échantillon est d'abord fractionné grâce à une méthode CPC mise au point pour purifier le XN, séparant ainsi les acylphloroglucinols des chalcones. La CLHP préparative a ensuite permis de purifier le DMX préalablement isolé dans une fraction enrichie par CPC, et de séparer les principaux acylphloroglucinols de la fraction enrichie correspondante, également obtenue suite à la purification du XN par CPC.

#### 6.3.1. Purification du xanthohumol par CPC

##### Principe de la CPC

La CPC est une technique de chromatographie où les phases mobile et stationnaire sont liquides. Elle s'appuie sur le principe de la CCC qui ne comporte pas non plus de support solide (Ito, 1987). Dans la CPC la phase mobile traverse la phase stationnaire accompagnée par une force centrifuge constante, rendant la séparation plus rapide et plus efficace (Kedzierski et al., 2014). L'appareillage de la CPC est muni d'un rotor composé de nombreuses cellules reliées entre elles, remplies par la phase stationnaire (**Fig. 62**). Cette dernière est maintenue immobile grâce à la force centrifuge induite par la rotation de l'appareil. La phase mobile qui transporte l'extrait, percole à travers la phase stationnaire, permettant ainsi aux différentes molécules de se séparer selon leur affinité avec les deux phases. Il existe deux types de pompage de la phase mobile selon le mode d'utilisation de la CPC. Si la phase mobile est la moins dense, elle doit être injectée dans le sens opposé à la force centrifuge. On parle alors de mode ascendant.

Si au contraire c'est la phase la plus dense qui est utilisée comme phase mobile, elle est injectée dans le sens de la force centrifuge. On parle alors de mode descendant.



**Figure 62.** Schématisation d'un rotor de CPC montrant les cellules reliées les unes aux autres et contenant les deux phases du système (Péchat, 2011)

Cette technique permet d'isoler une vaste gamme de polarité de composés, elle est notamment très utilisée pour purifier des produits d'origine naturelle (Kedzierski et al., 2014). L'absence de support solide permet d'éviter le phénomène d'adsorption irréversible et donc la perte de rendement (Ito, 2005). Le choix du système de solvant composant les deux phases est très vaste. De plus, la consommation de solvants au cours de l'analyse est plus faible en comparaison avec des techniques utilisant une phase stationnaire solide (Kedzierski et al., 2014).

### Optimisation des paramètres d'isolement

Des analyses préliminaires de mise au point de la méthode CPC sont indispensables pour la réussite de la purification. Le système de solvants constituant les deux phases est un élément fondamental, il est spécifiquement choisi en fonction du composé à purifier. Il se compose la plupart du temps de trois à quatre solvants. Il doit se séparer en deux phases distinctes en moins de 20 secondes, et ne doit pas former d'émulsion lors de l'ajout de l'échantillon à purifier (Ito, 2005). Une fois ces deux conditions remplies, le système est optimisé en fonction de la molécule à purifier (**Fig. 63**). Pour se faire, les phases supérieure et inférieure du système sont mélangées à l'extrait. Les molécules de l'échantillon se répartissent alors selon leur affinité entre les deux phases. Chaque phase est ensuite analysée indépendamment par CCM et/ou CLHP. L'analyse CCM est uniquement qualitative et permet de voir si le composé d'intérêt se répartit dans une des deux phases ou dans les deux phases. L'analyse par CLHP est quant à elle quantitative, l'aire sous la courbe du produit d'intérêt dans chaque phase permet de calculer un  $K_d$ .

$$K_d = \frac{\text{Aire sous la courbe du composé d'intérêt dans la phase stationnaire}}{\text{Aire sous la courbe du composé d'intérêt dans la phase mobile}}$$

L'objectif est d'obtenir un  $K_d$  proche de 1, c'est à dire que le composé d'intérêt doit avoir autant d'affinité pour la phase supérieure que pour la phase inférieure. Dans le cas où cette condition est respectée, le composé sera séparé des autres molécules de



l'extrait et élué à un volume de rétention égal à la capacité de la colonne (Ito, 2005). Dans le cadre de la purification du XN, plusieurs systèmes ont été évalués en se basant sur la littérature et les systèmes couramment utilisés en CPC.

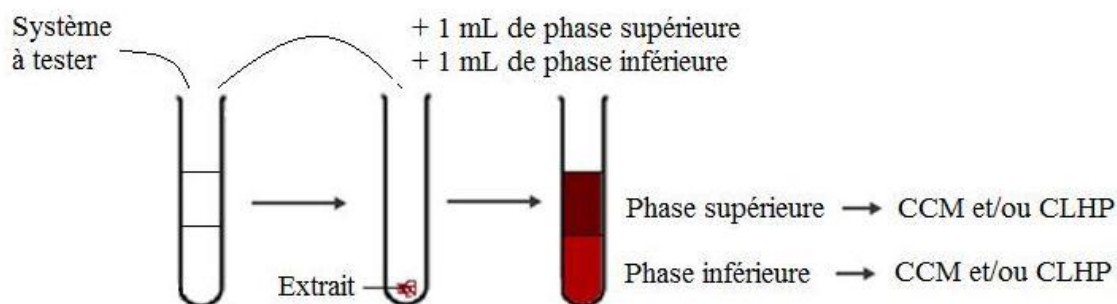


Figure 63. Protocole permettant la sélection du système de solvant optimal en CPC

### Mode opératoire et instrumentation du laboratoire

La chaîne CPC du laboratoire de pharmacognosie (EA 7394, ICV) se présente comme le montre la **figure 64**.

Les phases stationnaire et mobile sont pompées par des pompes Shimadzu® LC-20AP. L'appareil CPC Armen instruments® est muni d'un rotor dans lequel aura lieu le fractionnement de l'échantillon. Les cellules composant ce dernier sont, dans un premier temps, chargées de phase stationnaire à 30 mL/min et 500 rotations par minute (rpm). Le volume du rotor étant de 250 mL, il faut passer un peu plus de solvant. La phase mobile est ensuite ajoutée à 8 mL/min et 1600 rpm, jusqu'à équilibration du système. Une fois le système équilibré, l'échantillon (maximum 2 g) contenant le produit à isoler est injecté. Il est préalablement solubilisé dans 10 mL d'un mélange phase stationnaire/phase mobile (5:5, v/v) puis filtré sur membrane PTFE 0,45 µm. L'élution dure 60 min. Elle est suivie d'une extrusion (récupération de la phase stationnaire) de 15 min à 30 mL/min et 1600 rpm permettant de récupérer les produits qui seraient restés accrochés à la phase stationnaire. Le rinçage s'effectue à 500 rpm et 30 mL/min avec un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (5:5, v/v). En sortie de chaîne se trouve un détecteur à barrette de diodes Shimadzu® SPD-M20A. Un contrôleur CBM-20A permet de faire le lien entre la chaîne et l'ordinateur. Enfin, les fractions et le produit purifié sont récupérées dans un collecteur automatique Gilson® FC204. Chaque tube collecté est ensuite analysé en CCM ; les fractions identiques sont regroupées. Les fractions intéressantes ainsi que le produit purifié sont analysés de manière plus précise par CLHP-UV, et éventuellement par RMN et SM. La pureté d'un produit purifié est estimée par CLHP-UV entre 250 et 800 nm.

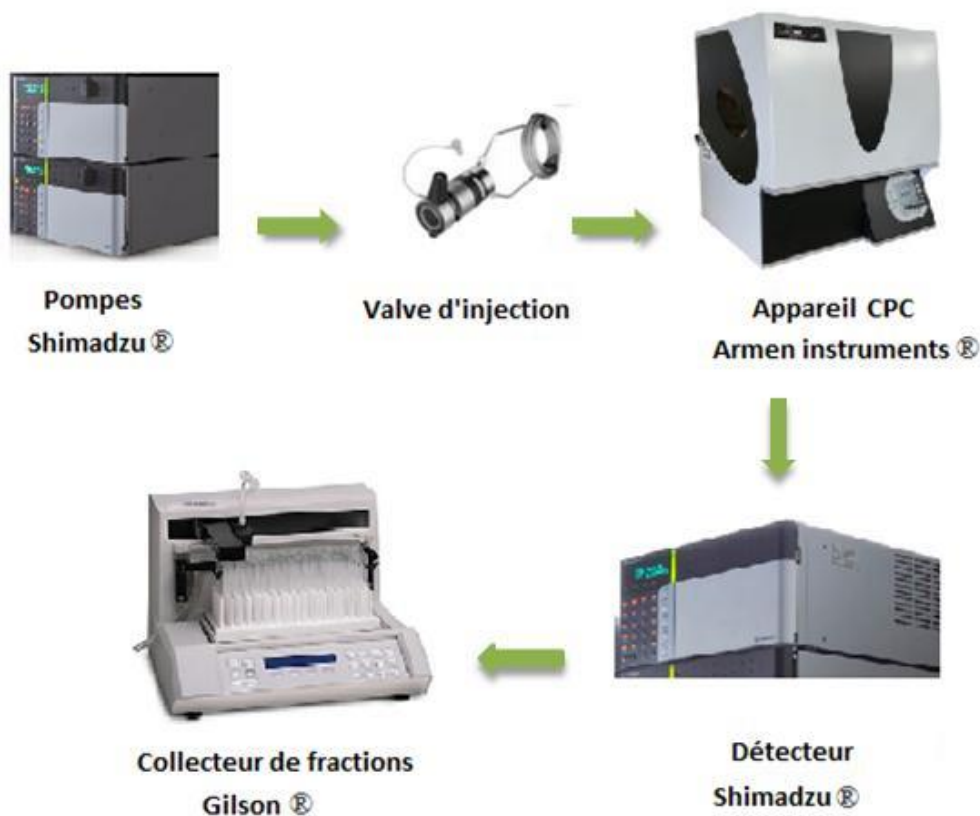


Figure 64. Organisation de la chaîne CPC du laboratoire de pharmacognosie (EA 7394, ICV)

*Remarque – Mise au point*

Grâce au programme Alibiotech dans le cadre d'un CPER, un rotor CPC d'un litre a été acquis par le laboratoire. Les dernières sessions de purification ont été effectuées avec cet appareil. Les conditions associées sont les suivantes : chargement de la phase stationnaire à 50 mL/min et 500 rpm, élution à 30 mL/min et 1 200 rpm, extrusion à 50 mL/min et 1200 rpm et rinçage à 500 rpm et 30 mL/min. En théorie, plusieurs dizaines de grammes d'extraits peuvent être injectés sur ce type de rotor. Cependant, la boucle d'injection associée étant une boucle de 10 mL (comme pour le rotor de 250 mL), la limite de solubilité s'est avérée être un facteur limitant. Un maximum de 8 g a pu être injecté dans l'appareil. L'extrait étant plutôt apolaire, il est préalablement solubilisé dans un peu plus de phase organique que de phase aqueuse (3:1, v/v).

**6.3.2. Purification du desméthylxanthohumol et des acylphloroglucinols par CLHP préparative**

Dans le processus de purification, la CLHP préparative n'a été utilisée qu'en deuxième étape, après fractionnement du sous-extrait DCM par CPC et purification du XN. Le principe de la technique est identique à celui de la CLHP analytique. La différence

réside dans la taille de la colonne, qui possède un diamètre plus important permettant d'injecter une plus grande quantité d'extrait, et de récupérer le(s) produit(s) purifié(s) en sortie de colonne. La chaîne CLHP préparative est munie des mêmes pompes, du même détecteur et du même contrôleur que la chaîne CPC. La colonne utilisée est comme pour l'analytique, une phase inverse VisionHT C18 HL (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 22 mm, Grace<sup>TM</sup>, France). Les fractions sont collectées à la main, puis séchées et analysées par CCM et/ou CLHP analytique.

Les solvants composant la phase mobile sont également l'ACN et l'eau ultra pure avec 0,1% d'acide formique. Le gradient employé est différent selon le composé à purifier (**Tableaux 31A et 31B**). Le DMX étant élué au niveau du plateau à 75% d'ACN, ce plateau est plus long dans la méthode A. Les acylphloroglucinols sortent à la fin du plateau à 75% d'ACN pour certains et à 100% d'ACN pour d'autres, ce dernier plateau est donc allongé sur la méthode B.

**Tableau 31.** Gradients de CLHP préparative adaptés à la purification du DMX (A) et des acylphloroglucinols (B)

<b>A</b>	<b>Temps (min)</b>	0	5	24	29	34
	<b>Pourcentage d'ACN (%)</b>	10	75	75	100	100
<b>B</b>	<b>Temps (min)</b>	0	5	20	25	40
	<b>Pourcentage d'ACN (%)</b>	10	75	75	100	100

Dans les deux cas, les fractions sont solubilisées dans le MeOH. Dans le but d'optimiser la séparation des produits parfois proches les uns des autres, les concentrations maximales des solutions sont de 70 mg.mL<sup>-1</sup> (500  $\mu\text{L}$  sont injectés) et le débit est fixé à 12 mL/min.

## 6.4. Axes d'amélioration du processus de purification

Certains composés prénylés plus minoritaires du houblon, purifiés en plusieurs étapes (CPC puis CLHP préparative), demandent de longues sessions de purification pour obtenir les quantités nécessaires aux analyses biologiques. C'est notamment le cas du DMX et de la lupulone, qui sont de très bons candidats antibactériens ; c'est pourquoi plusieurs pistes pour améliorer leur processus de purification ont été explorées.

### 6.4.1. Cas du desméthylxanthohumol

#### La colonne de silice

Cette méthode a été testée en remplacement de la CLHP préparative, en deuxième étape donc, sur la fraction enrichie en DMX issue de la CPC avec le système Arizona P. L'objectif étant de voir si celle-ci permet de mieux séparer le DMX, notamment du produit qui est élué très proche en CLHP (**Fig. 33**).

Une mise au point en CCM est nécessaire pour déterminer la phase mobile optimale. Un mélange DCM/MeOH (95:5, v/v) mène à un Rf de 0,3 pour le DMX tout en étant bien séparé des autres composés de la fraction. Le DCM 100% a été choisi comme point de départ pour l'élution, avec une augmentation progressive de la proportion de MeOH (**Tableau 32**) jusqu'à atteindre 5%, pour récupérer le DMX. Concernant la phase stationnaire, la silice fine 60 (0,040 - 0,063 mm, Merck™, Allemagne) est d'abord préparée, un minimum de 60 fois la quantité d'extrait à purifier sont pesés [ $m(\text{silice}) = 60 \times 0,128 = 7,7 \text{ g}$ ] puis mélangés au DCM. Le mélange est ensuite homogénéisé et passé quelques minutes aux ultrasons pour enlever les bulles d'air, avant d'être coulé dans la colonne pour atteindre 12 cm de hauteur. Une colonne en verre de 2 cm de diamètre et de 30 cm de hauteur a été utilisée. Après avoir rempli la colonne avec la silice, celle-ci est tassée avec un peu de pression. Elle est ainsi prête.

Un dépôt liquide a été effectué : 128 mg de la fraction enrichie en DMX obtenue en sortie de CPC sont solubilisés dans 300  $\mu\text{L}$  de DCM et déposés à la surface de la colonne. Après imprégnation dans la silice, du sable de Fontainebleau (au moins 1 cm) est ajouté sur le dépôt, pour le protéger des mouvements induits par les ajouts de solvants.

L'élution a été effectuée sous pression à environ 100 mbar. Le débit est légèrement fluctuant en fonction des variations de pression. Les fractions sont collectées toutes les 5 à 10 minutes. L'élution est suivie par CCM des diverses fractions obtenues, le gradient est ajusté en fonction des composés élués, pour finalement se faire de la manière suivante (**Tableau 32**) :

**Tableau 32.** Gradient de la colonne de silice effectué pour la purification du DMX à partir de la fraction enrichie en DMX obtenue en sortie de CPC

Solvants	Proportions (v/v)	Volumes élués dans la colonne (en mL)
DCM/MeOH	(100:0)	500
DCM/MeOH	(99,5:0,5)	500
DCM/MeOH	(99:1)	400
DCM/MeOH	(98:2)	400
DCM/MeOH	(96:4)	100
DCM/MeOH	(0:100)	Rinçage

### Mise au point d'une méthode CPC spécifique au DMX

Un essai de mise au point de système CPC pour purifier le DMX a été effectué. Deux solutions ont été envisagées : garder deux étapes en réalisant une seconde CPC à partir de la fraction enrichie obtenue en sortie de la première CPC (Arizona P) ; ou passer à une seule étape en réalisant la CPC avec la méthode adaptée au DMX directement sur le sous-extrait DCM de cônes. Dans les deux cas, la mise au point a été effectuée sur la fraction enrichie, car le DMX étant minoritaire, il n'est pas détectable en CCM avec le

sous-extrait DCM. Plusieurs systèmes ont été testés, le meilleur a été sélectionné pour un essai avec les deux méthodes. Les résultats sont présentés dans la partie 3.3.1.

#### 6.4.2. Cas de la lupulone

Des essais de mise au point ont également été réalisés pour purifier la lupulone par CPC. À nouveau, deux solutions sont possibles : garder deux étapes en réalisant une seconde CPC à partir de la fraction enrichie obtenue en sortie de la première CPC (Arizona P) ; ou passer à une seule étape en réalisant la CPC avec la méthode adaptée à la lupulone directement sur le sous-extrait DCM de cônes. La mise au point du système a également été effectuée sur la fraction enrichie en acylphloroglucinols. Les résultats sont présentés dans la partie 3.3.2.

### 6.5. Éluclidation structurale des produits par CL-SM et RMN

Après purification des produits, ces derniers sont analysés par HR-SM et RMN.

Les analyses HR-SM ont été effectuées au Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses (CUMA) de la Faculté de Pharmacie (Université de Lille). Les produits sont d'abord solubilisés dans du MeOH, une goutte de DCM peut être ajoutée pour aider à solubiliser les produits les plus apolaires. L'analyse est effectuée sur un spectromètre de masse (ThermoFisher Scientific™ Exactive, USA) de type Orbitrap avec comme mode d'ionisation l'électro-nébulisation ou électrospray (ESI). La gamme  $m/z$  utilisée va de 100 à 1000.

Les analyses RMN sont effectuées au Laboratoire d'Application de Résonance Magnétique Nucléaire (LARMN) de la Faculté de Pharmacie (Université de Lille). Les molécules sont préalablement solubilisées dans un solvant deutéré : le MeOD pour les chalcones et le  $CDCl_3$  pour les acylphloroglucinols. Les analyses mono- et bi-dimensionnelles sont réalisées sur un spectromètre RMN DPX-500 à 500 MHz (Bruker®) avec des sondes 5 mm : TXI pour les analyses  $^1H$  et les 2D, et BBO pour les spectres  $^{13}C$ . Les analyses classiquement effectuées dans notre cas sont :

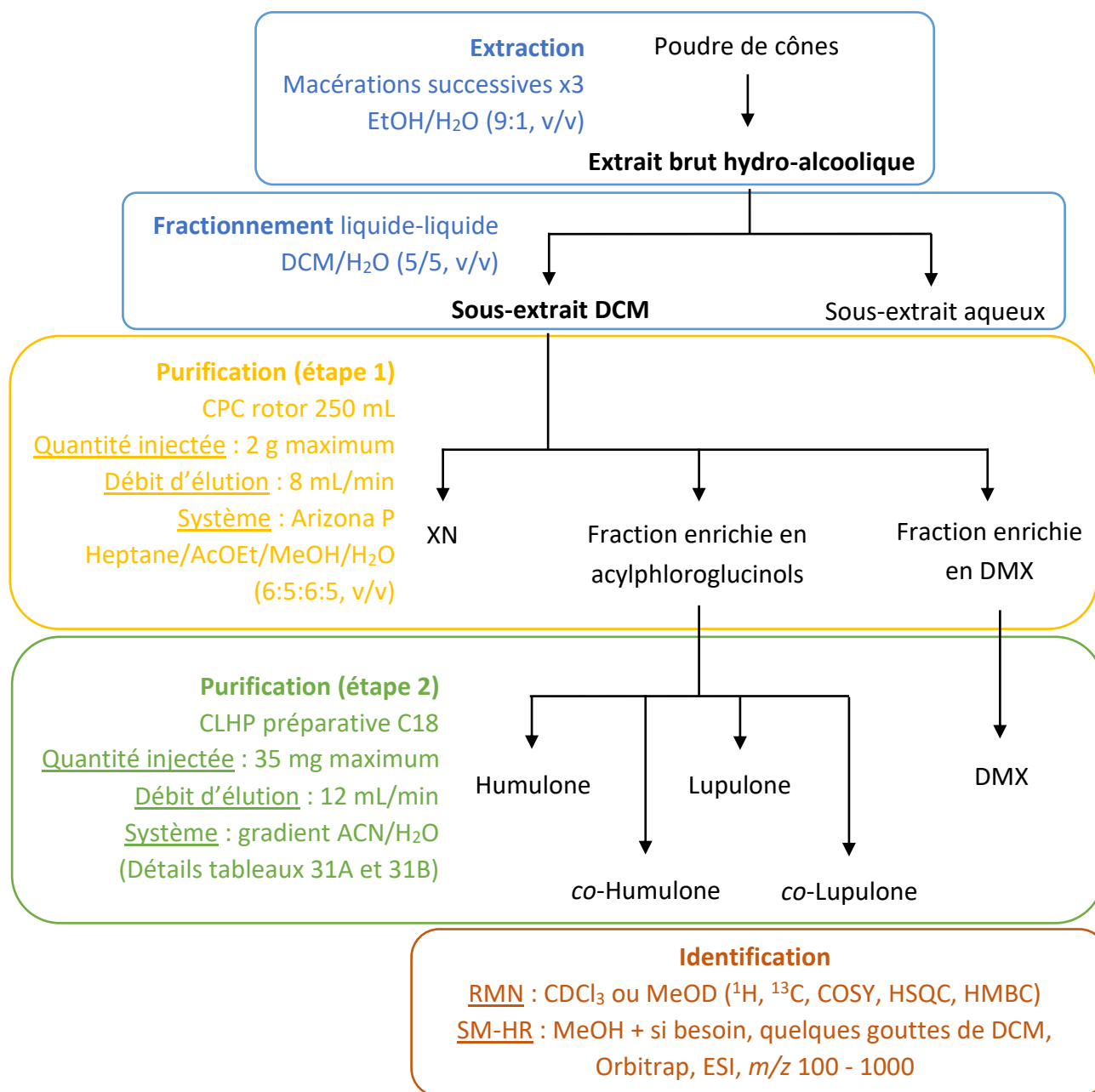
**Les spectres à une dimension** : Le spectre proton  $^1H$  vise à étudier les déplacements chimiques des protons (plus ou moins déblindés selon leur environnement) de la molécule. Le spectre carbone  $^{13}C$  est basé sur le même principe avec les atomes de carbone.

**Les spectres bidimensionnels** : Le « COrrélation SpectroscopY » (COSY) regarde les corrélations entre protons voisins. L'« Heteronuclear Single Quantum Correlation » (HSQC) fournit les corrélations du carbone auquel chaque proton est attaché. L'« Heteronuclear Multiple-Bond Correlation » (HMBC) permet de corrélérer les protons avec leurs hétéro-atomes voisins jusqu'à trois liaisons covalentes.

Des expérimentations complémentaires (HSCQ-TOCSY, NOESY...) sont parfois nécessaires pour une identification structurale complète, mais cela n'a pas été le cas concernant notre étude.

## 6.6. Méthodologie de purification des composés phénoliques prénylés

Le schéma ci-dessous montre le processus de purification optimal, sélectionné pour être utilisé en routine au cours de la thèse, il résume les caractéristiques techniques de chaque étape.



**Figure 65.** Synthèse du processus de purification des composés phénoliques prénylés du houblon, rassemblant les diverses techniques et paramètres utilisés. Pour avoir un ordre d'idée des rendements à chaque étape, consulter la **figure 36**. Les pourcentages de pureté obtenus sont présentés dans la **figure 43**. XN : xanthohumol, DMX : desméthylxanthohumol

## 6.7. Autres voies d'obtention des métabolites d'intérêt

Les tests antimicrobiens ont montré que les composés d'intérêt se trouvent dans les cônes femelles du houblon, parties déjà exploitées par l'industrie brassicole. Pour valoriser ces résultats, d'autres sources de ces métabolites ont été investiguées :

- Les sous-produits d'origine brassicole
- Les biotechnologies végétales

### 6.7.1. Recherche des composés d'intérêt dans des sous-produits d'origine brassicole contenant du houblon, analyses par CLHP-UV

Des pistes ont été creusées auprès de brasseurs de la région Haut-de-France, pour récupérer les sous-produits contenant du houblon. L'objectif étant de les analyser pour voir si on peut y retrouver les produits actifs.

Les cassures des brasseries Page 24 et Saint Sylvestre (3Monts) ont été récupérées. Elles se présentent sous l'aspect d'une bouille végétale. Les échantillons ont d'abord été congelés puis lyophilisés grâce à un lyophilisateur à ballons (Telstar Cryodos®). Les poudres obtenues ont subi le même type d'extraction et de fractionnement que les parties de houblon (partie 6.1.2.). Les extraits et sous extraits obtenus ont été analysés par CLHP-UV de la même manière que les extraits de houblon (partie 6.2.2.). Aucun produit n'a été purifié de ces sous-produits, les analyses effectuées étaient uniquement qualitatives, par comparaison des profils chromatographiques.

### 6.7.2. Production des métabolites d'intérêt par le biais des biotechnologies végétales

Plusieurs essais de production des composés phénoliques prénylés du houblon ont été réalisés par le biais des biotechnologies végétales : cultures de vitro-plants, induction de « chevelus racinaires », production de cals et suspensions cellulaires. Ces expérimentations ayant été réalisées par le Dr Caroline Rambaud, Audrey Etienne et Andréa Escobar Utiel (EA 7394, ICV) dans le cadre d'un projet annexe, la partie technique sera peu détaillée ici.

#### La culture de vitro-plants

La multiplication *in vitro* du houblon a été effectuée par culture de fragments nodaux sur milieu Murashige et Skoog (MS) auquel 6 g.L<sup>-1</sup> d'agar ont été ajoutés, ainsi que divers éléments nutritifs et vitamines. Des hormones de croissance, telles que l'acide naphthalène-acétique ou l'acide 2,4-dichlorophénoxy-acétique, ont également été utilisées. La température de la chambre de culture est fixée à 24°C le jour et 20°C la nuit, avec une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. Après 2 mois

de culture environ, les feuilles, les tiges et les rhizomes sont placés dans l'azote liquide puis lyophilisés. Chaque échantillon a ensuite été extrait comme les autres parties de houblon (partie 6.1.2.) et a été analysé par CLHP-UV ou CLUHP-UV (partie 6.2.2.).

#### **Induction de « chevelus racinaires »**

Des essais de transformation par *Agrobacterium rhizogenes* ont été réalisés à partir de diverses parties de vitro-plants blessées ou de graines, par injection ou infection sous vide. Les parties obtenues sont ensuite cultivées sur un milieu MS enrichi en glucose à 30 g.L<sup>-1</sup>. D'autres types de milieux ont également été testés, avec ou sans hormones végétales (acide indole 3-acétique ou acide naphthalène-acétique), dans le but de trouver l'environnement de croissance optimal. La biomasse obtenue n'étant pas significative, ces parties n'ont pas été analysées par CLUHP-UV.

#### **Production de cals et suspensions cellulaires**

La callogenèse a été effectuée à partir de vitro-plants préalablement incisés au scalpel. Plusieurs parties de feuilles et des nœuds ont été mis en culture sur milieu MS avec agar, également additionné de divers éléments nutritifs, de vitamines et d'hormones de croissance. La température de la chambre de culture et la photopériode est la même que celle utilisée pour la culture de vitro-plants. Il en est de même de l'extraction et de l'analyse de cette matière.

À partir de cals de houblon issus de feuilles ou de tiges de vitro-plants, placés en culture en milieu MS liquide, des cultures de cellules en suspension ont été obtenues. Elles sont en cours de multiplication, des analyses en CLUHP-UV seront ensuite réalisées.



## Chapitre 7.

# Activité antibactérienne du houblon envers des pathogènes humains

---

L'activité antibactérienne des parties femelles de houblon a d'abord été évaluée sur un panel varié de souches pathogènes de l'Homme (liste présentée dans le **tableau 17**). Ce premier criblage a permis de mettre en évidence l'activité des cônes femelles envers les bactéries à Gram positif. Les sous-extraits de cônes ont ensuite été testés sur un second panel regroupant des bactéries à Gram positif, dont certaines présentent des résistances à un ou plusieurs antibiotiques (liste présentée dans le **tableau 18**). La sensibilité de ces dernières a été évaluée vis-à-vis de plusieurs antibiotiques de référence : la vancomycine pour les souches à Gram positif, la gentamicine pour les souches à Gram négatif et l'amoxicilline, représentant les pénicillines. La sensibilité des souches de *Candida* a été évaluée envers trois antifongiques de référence : l'amphotéricine B, le fluconazole et le voriconazole. Les composés majoritaires du sous-extrait le plus actif ont été purifiés et testés vis-à-vis de souches sélectionnées. La sélection des souches s'est basée sur la connaissance de leur profil de résistance et de leurs facteurs de virulence. Enfin, des expérimentations complémentaires avec les produits les plus intéressants ont été effectuées sur un isolat clinique de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) : *S. aureus* T28.1.

### 7.1. Conditions de culture et préparation des souches

Les souches bactériennes utilisées en routine sont cultivées en tube dans un milieu Brain Heart (BH) liquide et sont repiquées tous les mois. Lorsqu'une manipulation est prévue, les souches concernées sont repiquées la veille sur milieu Mueller-Hinton Agar (MHA) en pente (MHB Oxoid™, Angleterre ; Bacto™ Agar, France) afin d'obtenir une culture fraîche. Après 24 heures de croissance à 37°C, elles sont diluées dans du Ringer cystéiné (RC) (Merck™, Allemagne) afin de préparer une suspension de l'ordre de 10<sup>5</sup> UFC/mL (**Fig. 66**). Cette concentration peut être ajustée selon les besoins des manipulations.

#### Remarque

Le manque de pression de sélection lié à l'absence de l'antibiotique dans le tube de culture et/ou les repiquages récurrents ont conduit à une perte de la résistance de *S. aureus* T28.1 à la méticilline. Cette dernière, utilisée en routine pendant les deux dernières années de thèse, était donc reprise dans le stock (au congélateur) au moins une fois par an. Sa sensibilité à l'oxacilline était contrôlée régulièrement.

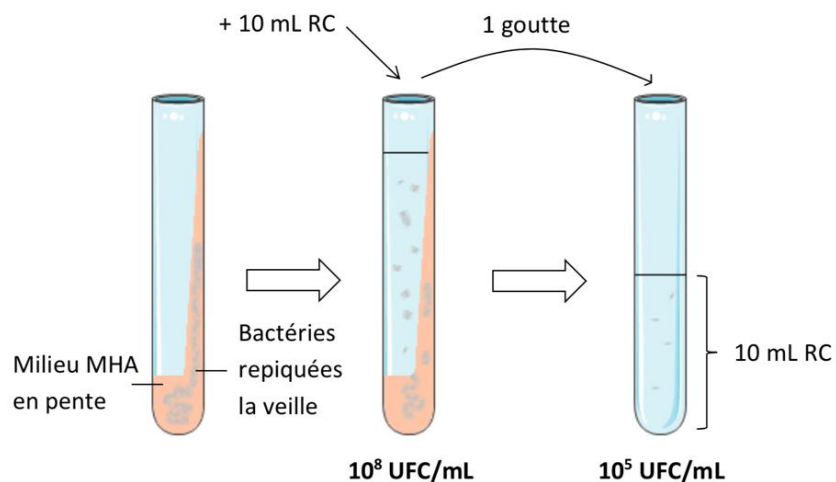


Figure 66. Préparation d'un inoculum bactérien à  $10^5$  UFC/mL ; RC : Ringer cystéiné

## 7.2. De l'analyse de l'activité antibactérienne des extraits et sous-extraits de houblon, à l'identification des composés actifs

### 7.2.1. Activité des divers extraits et sous-extraits

Les extraits hydro-alcooliques de cônes, de feuilles, de tiges et de rhizomes sont préalablement solubilisés dans du MeOH afin d'obtenir une gamme de dilution en série, au demi allant de 25 à  $0,195 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Ces solutions sont ensuite diluées dans le milieu de culture MHA à hauteur de 5%, puis le mélange est coulé en boîte de Pétri. Les concentrations finales en extraits sont 1,25 ; 0,625 ; 0,313 ; 0,156 ; 0,039 ; 0,0195 ;  $0,0098 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Un témoin MeOH a permis de montrer l'absence d'effet du solvant sur la croissance bactérienne avec ces proportions. Un inoculateur à têtes multiples ou appareil de Steers (Mast Laboratory™, Angleterre, **Fig. 67**) est ensuite utilisé pour ensemercer 36 souches par boîte de Pétri, avec des suspensions bactériennes à  $10^5$  UFC/mL. Après 24 heures de culture à  $37^\circ\text{C}$ , la lecture est réalisée en observant la présence ou l'absence de colonie à la surface de la gélose. La CMI est la plus faible concentration d'extrait inhibant la croissance bactérienne.

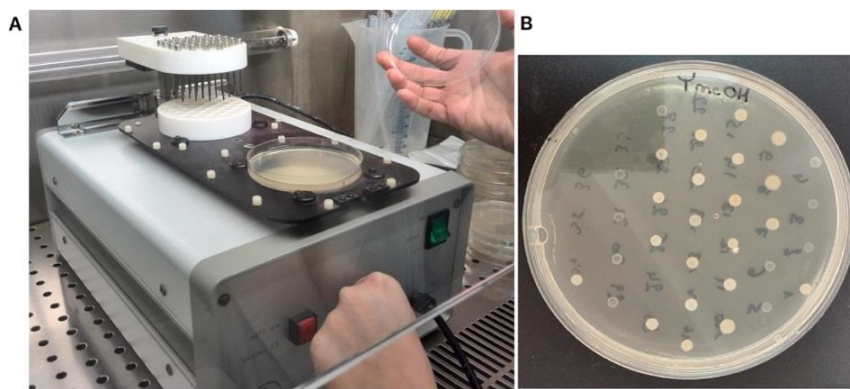


Figure 67. (A) Inoculateur à têtes multiples ou appareil de Steers, utilisé pour les criblages antibactériens (B) Boîte de Pétri ensemençée avec 36 souches après 24 heures de culture à  $37^\circ\text{C}$

### 7.2.2. Identification des composés phénoliques actifs

Après avoir identifié la partie de la plante la plus active, les sous-extraits aqueux et DCM de cônes ont été testés au moyen de l'appareil de Steers, de la même manière, permettant ainsi de diriger l'activité vers le sous-extrait apolaire.

Une seconde méthode appelée bioautographie d'immersion a permis de donner une idée des composés actifs. Il s'agit d'une technique couplant une CCM à un test antibactérien. Elle est couramment utilisée pour cibler les composés actifs au sein d'un extrait végétal (Choma et Grzelak, 2011 ; Dewanjee et al., 2015). Une CCM est, dans un premier temps, réalisée afin de séparer les composés de l'extrait ou du sous-extrait à tester. La plaque de silice doit ensuite être séchée, elle est placée sous vide plusieurs heures afin d'éliminer les traces de solvant qui pourraient empêcher la croissance bactérienne. Les témoins positifs sont les extraits actifs déposés après migration. Une fois la plaque CCM prête, elle est placée dans une boîte de Pétri carrée. Le milieu de culture MHA est préalablement mélangé à la suspension bactérienne à  $10^4$  UFC/mL. Le mélange est directement coulé sur la plaque (**Fig. 68**). Après prise en masse, la boîte est mise en culture à 37°C pendant 24 heures. La lecture se fait par pulvérisation d'une solution d'iodonitrotétrazolium (INT) à  $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  sur la gélose. La boîte est ensuite incubée quelques minutes à 56°C pour accélérer la réaction. L'INT est ainsi transformé en un composé rouge par une déshydrogénase en présence de bactéries. L'inhibition de la croissance par les composés actifs est visible grâce à la présence de zones claires sur la gélose. Cette méthode permet d'orienter la purification des produits antibactériens.



**Figure 68.** Bioautographie d'immersion avant incubation ; les zones entourées en rouge montrent les témoins positifs, ou extraits actifs déposés sur la CCM après migration.

### 7.2.3. Activité antibactérienne des produits purifiés

L'évaluation du potentiel antibactérien des produits purifiés à partir du sous-extrait DCM de cônes femelles se fait par une méthode de micro-dilution en milieu liquide et en microplaques 96 puits (Nest, Grosseron<sup>TM</sup>, France). Cette méthode permet à la fois de déterminer la CMI, mais aussi la CMB, qui est la plus faible concentration biocide de produit. En effet, la CMI inhibe la croissance bactérienne mais elle n'est pas forcément biocide. Le protocole utilisé est inspiré de celui d'Abedini et al. (2013) avec quelques modifications.

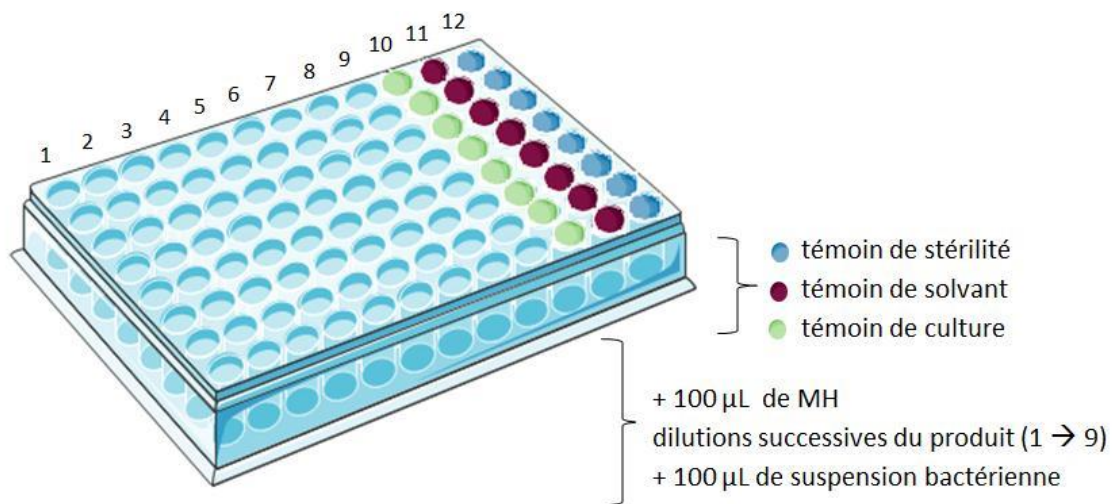
Dans un premier temps, 100  $\mu\text{L}$  de milieu MH sont déposés dans chaque puit de la microplaque (y compris les témoins, **Fig. 69**). La molécule à tester est préalablement solubilisée dans du DMSO (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, USA) afin de préparer une solution mère à 1,25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Puis 100  $\mu\text{L}$  de cette solution sont déposés dans le puit 1, des dilutions successives au demi sont réalisées jusqu'au puit 9 de manière à avoir un volume final de 100  $\mu\text{L}$  dans chaque puit. La concentration en solvant est donc décroissante au fil de la gamme. Après avoir évalué la sensibilité de la souche au DMSO, un seuil de lecture correspondant au puit numéro 3 a été fixé ( $\leq 5\%$  de solvant). Pour finir, 100  $\mu\text{L}$  de suspension bactérienne à  $10^5$  UFC/mL sont ajoutés aux puits 1 à 11. La colonne 12 étant le témoin de stérilité, 100  $\mu\text{L}$  de milieu MH y sont rajoutés. Le volume est ainsi de 200  $\mu\text{L}$  dans chaque puit, les concentrations finales sont les suivantes : 313 ; 156 ; 78 ; 39 ; 19,5 ; 9,8 ; 4,9 ; 2,4 ; 1,2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Cette gamme peut être poursuivie si les produits sont très actifs (cas de la lupulone).

#### *Remarque – Mise au point*

Le protocole décrit ici n'a pas été un premier choix. La méthode initialement choisie était : 180  $\mu\text{L}$  de milieu MH, 10  $\mu\text{L}$  de produit dans le MeOH ou le DMSO et 10  $\mu\text{L}$  de suspension bactérienne à  $10^5$  UFC/mL par puit. Celle-ci permettait une concentration en solvant égale dans tous les puits (5%). Cependant, le criblage de l'activité des produits impliquait de commencer la gamme à une concentration élevée, des problèmes de solubilité ont alors été rencontrés. C'est pourquoi la méthode d'Abedini et al. (2013), qui ajoute plus de solvants dans les premières concentrations, a finalement été conservée.

Pour déterminer la CMI des produits purifiés, le DMSO a été préféré. D'une part, il s'est avéré moins toxique que le MeOH pour les bactéries en milieu liquide. D'autre part, il solubilise mieux les produits les plus apolaires qui ont été purifiés.

Les puits 10 à 12 sont les témoins : le témoin de culture est composé du milieu de culture et des bactéries ; le témoin de solvant comporte le milieu MH, les bactéries et 5% de DMSO (seuil de lecture sur la plaque) ; le témoin de stérilité ne contient que le milieu de culture.



**Figure 69.** Protocole du test en microplaque permettant d'évaluer l'activité antibactérienne des produits purifiés des cônes femelles de houblon

La lecture de la CMI et la méthode permettant de déterminer la CMB se font après 24 heures de culture à 37°C sous agitation à 60 rpm. A l'œil nu, la croissance bactérienne se manifeste par un trouble. La CMI est déterminée en partant de la gauche, là où la concentration est la plus forte, c'est le dernier puit sans trouble visible. La détermination de la CMB se fait en étalant 100 µL des concentrations sub-inhibitrices sur une boîte de Pétri contenant du MHA. La lecture se fait après 24 heures à 37°C. La CMB correspond à la plus faible concentration inhibant totalement la croissance bactérienne après réensemencement sur milieu MHA. Elle peut être différente de la CMI. Après avoir réalisé cette partie de la manipulation, la CMI est confirmée par ajout d'INT dans chaque puit. Cette étape tue les bactéries, il est donc important de faire la méthode CMB avant la révélation à l'INT.

### 7.3. Analyses approfondies avec le xanthohumol, le desméthylxanthohumol et la lupulone sur l'isolat clinique *S. aureus* T28.1 résistant à la méticilline

*S. aureus* T28.1 a été choisi pour réaliser les expérimentations présentées ci-après. Il s'agit d'un isolat clinique de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) dont les facteurs de virulence sont connus. Il provient d'un prélèvement pathologique d'ostéite du pied diabétique (Senneville et al., 2014). Les produits les plus actifs ont été sélectionnés pour ces manipulations : le XN, le DMX et la lupulone.

### 7.3.1. Potentialisation de l'activité par recherche de synergies d'association

L'activité des composés actifs peut être potentialisée en associant les produits entre eux ou avec des antibiotiques (Hemaiswarya et al., 2008). Les antibiotiques ont été sélectionnés sur la base d'un premier criblage par E-tests (BioMérieux™, France). Ce sont des bandelettes présentant des concentrations décroissantes d'antibiotiques, permettant de déterminer, avec facilité, la CMI d'une souche à un antibiotique. Plusieurs E-tests peuvent être regroupés sur une même boîte, le criblage est donc rapide (**Fig. 70**). Les antibiotiques sélectionnés pour les tests de synergies couvrent plusieurs familles et peuvent être prescrits dans le traitement des infections osseuses ou d'autres infections impliquant des *S. aureus*. La recherche de synergies a été effectuée par la méthode de référence, qui est l'échiquier ou *checkerboard* (Hsieh et al., 1993).

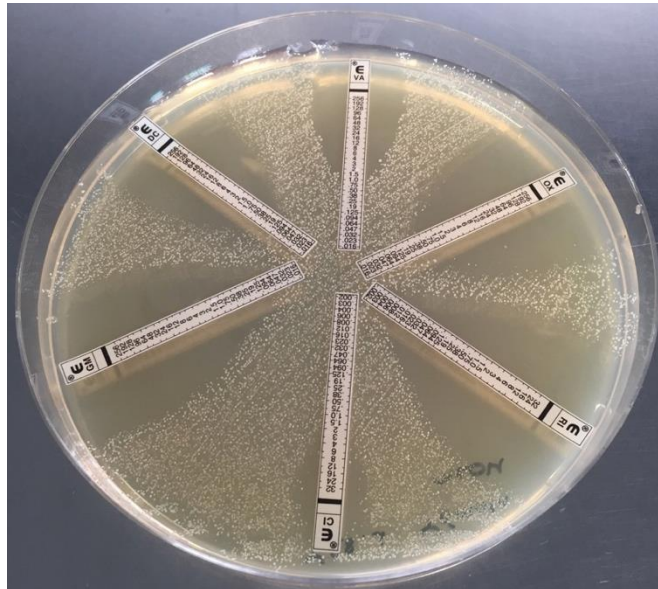


Figure 70. Grande boîte de Pétri montrant les E-tests et une culture bactérienne

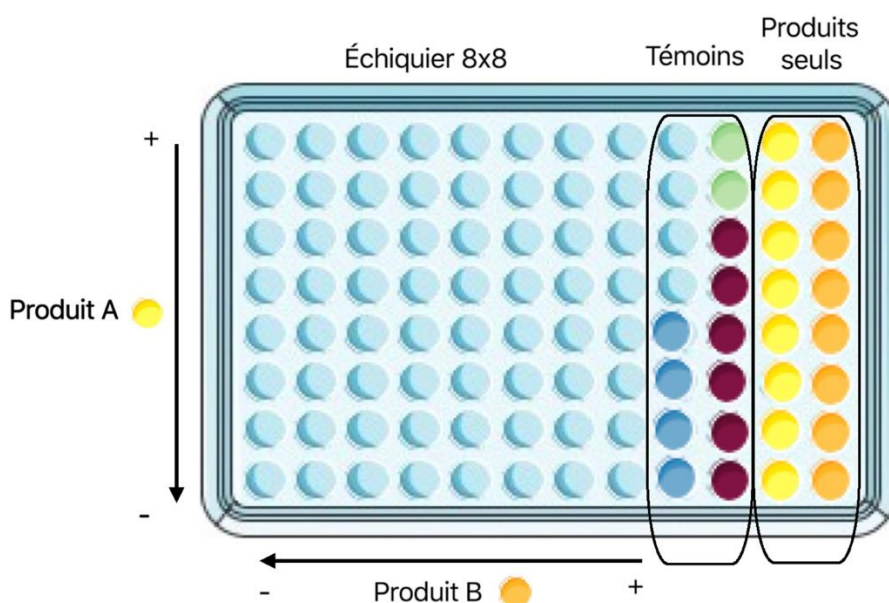
Le test de l'échiquier a été effectué en microplaques 96 puits, en utilisant un échiquier de 8x8 puits. Il s'agit d'évaluer la CMI de deux produits seuls, puis ensemble avec différentes combinaisons de concentrations afin de déterminer l'association la plus efficace. La **figure 71** montre le schéma de la plaque utilisé. Deux protocoles sont distinguables en fonction de l'association produit-produit ou produit-antibiotique. En effet, la concentration maximale en DMSO doit être de 5% dans chaque puit. Les produits purifiés du houblon étant apolaires, ils sont solubilisés dans le DMSO, alors que les antibiotiques sont solubilisés dans l'eau avec un peu d'acide chlorhydrique si nécessaire. Les deux protocoles sont les suivants :

- **Association produit-produit** : 110  $\mu$ L de milieu MH sont d'abord distribués dans les puits. Puis 5  $\mu$ L de chaque produit préalablement solubilisé dans le DMSO sont ajoutés à l'échiquier de manière à avoir des concentrations finales allant de CMI/16

à CMIx8. Pour finir, les puits sont ensemencés par 80 µL de suspension bactérienne à 10<sup>5</sup> UFC/mL.

- **Association produit-antibiotique** : 100 µL de milieu MH sont d’abord distribués dans les puits. Sont ensuite ajoutés 10 µL de produit dans le DMSO et 10 µL de l’antibiotique dans l’eau, aux mêmes concentrations que le protocole ci-dessus. Les puits sont également ensemencés avec 80 µL de suspension bactérienne à 10<sup>5</sup> UFC/mL.

Dans les deux cas, le volume final atteint 200 µL dans chaque puit. Les plaques sont incubées 24 heures à 37°C sous agitation à 60 rpm.



**Figure 71.** Schéma de la plaque pour le test de l’échiquier ou *checkerboard* ; les témoins incluent le témoin de culture (vert), le témoin DMSO (violet) et le témoin de stérilité (bleu).

La lecture des résultats se fait d’abord à l’œil nu, à la fois pour les CMI des produits seuls et en combinaison. L’échiquier peut être lu dans les deux sens : CMI du produit A en fonction du produit B (sens des lignes) et CMI du produit B en fonction du produit A (sens des colonnes). La méthode de détermination des CMB est ensuite réalisée comme expliqué dans la partie 7.2.3. Les CMI sont confirmées par ajout d’INT dans chaque puit. Les données obtenues permettent de calculer un indice FIC à partir de la formule suivante :

Soit le produit A un antibiotique et le produit B un produit purifié du houblon,

$$FIC = \frac{CMI\ A\ avec\ B}{CMI\ A\ seul} + \frac{CMI\ B\ avec\ A}{CMI\ B\ seul}$$

Si l’indice FIC est inférieur à 0,5, les deux produits agissent en synergie ; s’il est compris entre 0,75 et 1, les deux produits ont un effet additif ; s’il est compris entre 1 et 2, l’effet est indifférent ; enfin, s’il est supérieur à 2, alors les produits sont antagonistes.

*Remarque*

Il existe plusieurs manières d'interpréter les résultats d'un échiquier : (1) établir la moyenne des indices FIC de chaque condition ; (2) ne prendre en compte que les lignes et les colonnes entièrement sans culture ; (3) déterminer l'association optimale, donc le plus faible indice FIC ; (4) sans utilisation de l'indice FIC, la synergie est définie par l'absence de culture dans les puits contenant les concentrations correspondant à CMI/4 et CMIx2 de chaque produit. Il a été montré que le pourcentage de chance de trouver des associations synergiques varie selon la méthode choisie (Bonapace et al., 2002).

L'objectif étant de déterminer l'association optimale de produits, les indices FIC qui montrent l'activité la plus importante ont été calculés (méthodes 3). Les tests ayant été réalisés en triplicatas, des intervalles sont donnés.

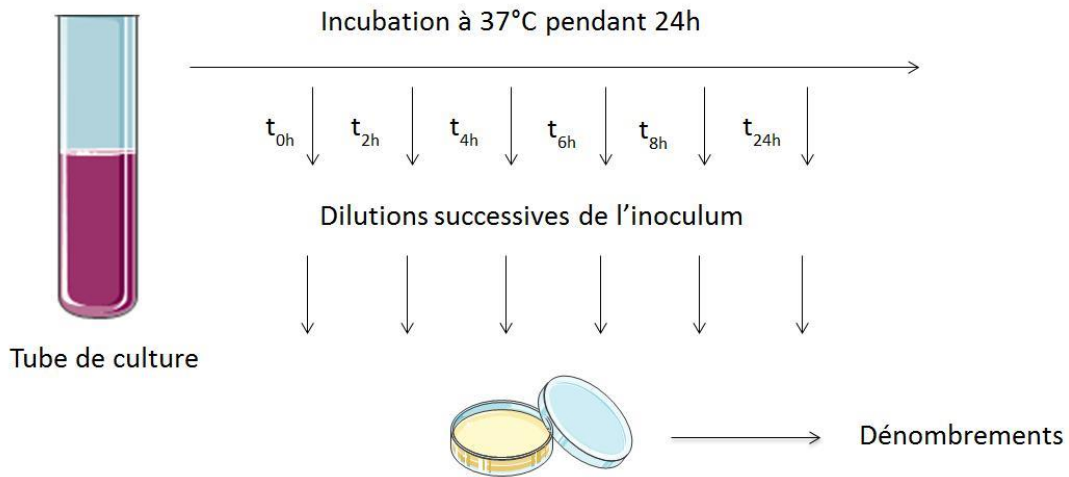
**7.3.2. Analyse des courbes de croissance**

La courbe de croissance permet d'évaluer l'effet d'un composé actif sur une population bactérienne en croissance pendant 24 heures.

Le protocole est inspiré de celui utilisé par Abedini et al. (2013) avec quelques modifications. Le produit est préalablement solubilisé dans du DMSO de manière à obtenir une solution mère 20 fois plus concentrée que la concentration désirée dans le tube de culture. Des dilutions successives au demi sont ensuite réalisées afin d'obtenir une gamme correspondante en tube, à CMIx4, CMIx2, CMI, CMI/2 et CMI/4. Pour chaque concentration, 500  $\mu\text{L}$  de cette solution sont mélangés à 8,5 mL de milieu BH. Puis 1 mL de suspension bactérienne à  $10^5$  UFC/mL est ajouté. Le volume final du tube de culture est de 10 mL. La concentration en solvant n'excède pas 5%. Chaque tube est ensuite incubé à 37°C pendant 24 heures.

Au cours des 24 heures d'incubation, des dénombrements sont effectués à des temps précis (**Fig. 72**) : 100  $\mu\text{L}$  de l'inoculum sont prélevés, une gamme de dilutions de cet échantillon est ensuite réalisée dans du RC puis 100  $\mu\text{L}$  de chaque dilution sont étalés sur une boîte de MHA. L'objectif étant d'obtenir au moins une dilution avec un nombre de colonies comptable, après 24 heures d'incubation des boîtes à 37°C. On peut ainsi estimer la concentration en bactéries dans le tube de culture à chaque temps. L'effet du produit pour les différentes concentrations est comparé à un témoin DMSO. Lors des dénombrements, seule une petite partie de l'inoculum est prélevé : 100  $\mu\text{L}$  qui sont placés dans 0,9 mL de RC. Or, s'il n'y a pas de bactéries dans cet aliquot, cela ne veut pas dire qu'il n'y en a pas dans la totalité de l'inoculum (10 mL). Le seuil de détection est donc de 1 log UFC/mL.





**Figure 72.** Protocole de la courbe de croissance, six dénombrements sont effectués au cours des 24 heures d'incubation

### 7.3.3. Quantification de l'effet post-antibiotique

Lorsqu'une population bactérienne est mise en culture en conditions favorables, sa croissance démarre rapidement. Lorsque celle-ci a été en contact avec un produit antibactérien, il se peut que la reprise de sa croissance tarde ; c'est l'effet post-antibiotique. Il est souvent utilisé dans les études de pharmacodynamie (MacKenzie et Gould, 1993).

Dans un premier temps, le tube de traitement est préparé de la même manière que le tube de culture pour la courbe de croissance. La souche est mise en contact avec le produit actif dans un tube contenant 8,5 mL de milieu BH, 500  $\mu$ L de produit préalablement solubilisé dans le DMSO et 1 mL de suspension bactérienne. La différence est que la souche est repiquée la veille en milieu BH et non MHA en pente comme pour les autres manipulations et elle n'est pas diluée pour le traitement. Le tube de culture est donc ensemencé avec 1 mL de cette suspension concentrée à  $10^8$  UFC/mL. Les concentrations en produits testées sont CMIx4, CMIx2, CMI et CMI/2. Le tube de traitement est ensuite incubé à 37°C pendant 2 heures afin que le produit agisse.

Après 2 heures de mise en contact avec le produit à plusieurs concentrations, celui-ci est inactivé au moyen d'une dilution au 1 000<sup>ème</sup> dans un nouveau tube de BH (**Fig. 73**). Le tube témoin est dilué de la même manière à titre comparatif. Le tube de culture ainsi obtenu constitue celui sur lequel seront effectués les dénombrements. Il est donc incubé à 37°C pendant 24 heures. Les dénombrements sont effectués de la même manière que pour la courbe de croissance, les comptages également. Le seuil de détection est de 1 log UFC/mL, comme pour la courbe de croissance.

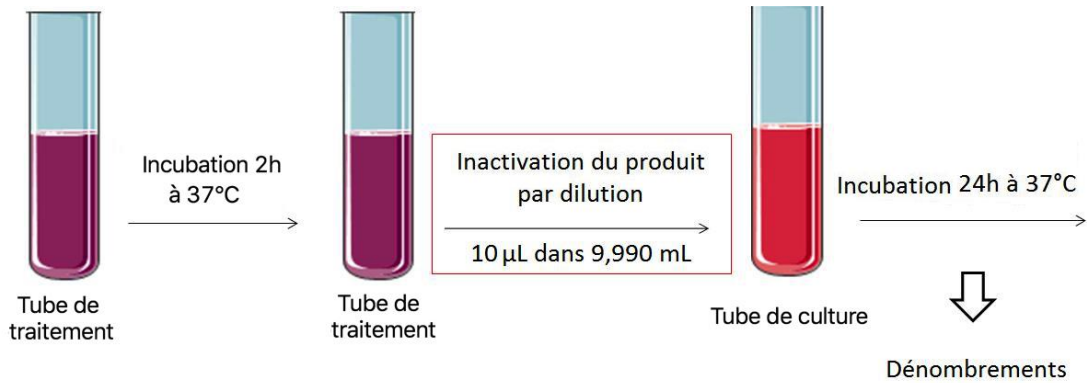


Figure 73. Protocole de l'effet post-antibiotique montrant le prétraitement et l'inactivation du produit

L'effet post-antibiotique dans chaque condition est estimé par comparaison avec le témoin DMSO grâce à l'équation suivante :

$$\text{Effet post - antibiotique} = T - C,$$

où T est le temps nécessaire à l'inoculum bactérien ayant été en contact avec le produit pour croître d'1  $\log_{10}$  et C est le temps correspondant pour le témoin. La méthode de détermination graphique de ces paramètres est montrée dans la **figure 74**.

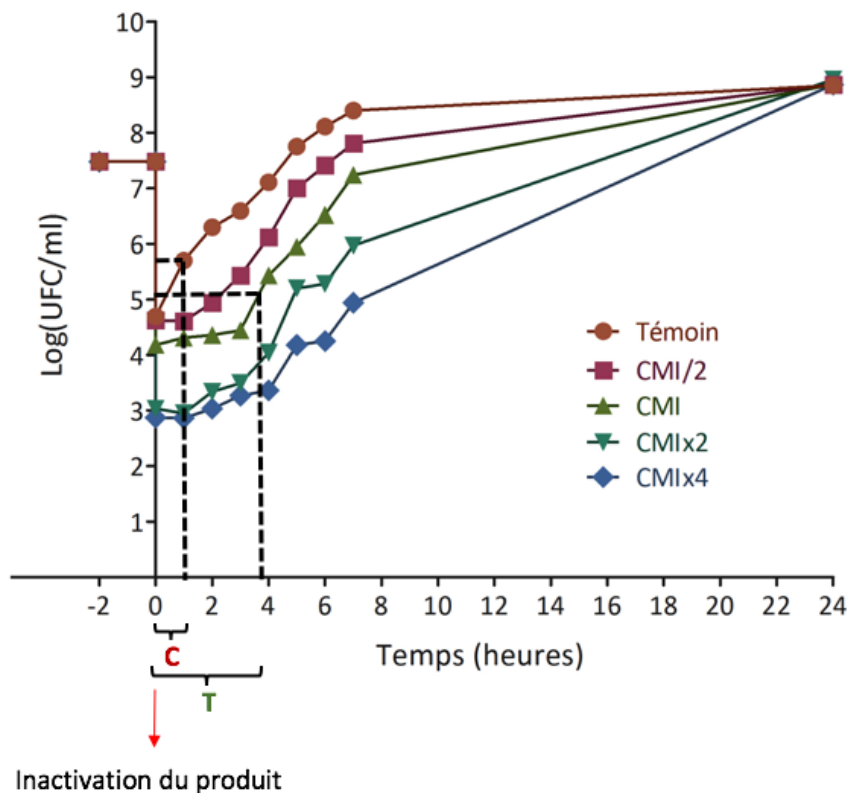


Figure 74. Détermination graphique des paramètres C et T pour le calcul de l'effet post-antibiotique

#### 7.3.4. Mise en évidence de l'effet anti-biofilm

Pour ces expérimentations, la souche utilisée doit être productrice de biofilms. *S. aureus* T28.1 a préalablement été caractérisée par des puces à ADN. Elle exprime les

gènes codant pour les enzymes nécessaires à la synthèse de la capsule polysaccharidique (capH5, capJ5, capK5) ainsi que les protéines d'adhésion (icaA, icaC, icaD) nécessaires à l'adhérence des bactéries entre elles. Les analyses par puces à ADN ont été effectuées avant mon arrivé au laboratoire (résultats non présentés ici et non publiés).

L'effet anti-biofilm a été évalué de deux manières, d'abord sur surface inerte puis sur un substitut du substrat réel de la souche modèle, des disques de substituts osseux. Pour rappel, *S. aureus* T28.1 provient d'une ostéite de pied diabétique.

### Effet anti-biofilm sur surface inerte

La surface inerte est représentée par le fond plat des microplaques 96 puits (**Fig. 75**). Un milieu de culture BH enrichi en glucose est utilisé pour ces tests. Il a déjà été démontré que l'augmentation de la quantité de glucose dans l'environnement entraîne une augmentation de la production de biofilms bactériens chez les staphylocoques (Waldrop et al., 2014). Pour évaluer le potentiel des produits à inhiber la formation du biofilm bactérien, le milieu enrichi est dans un premier temps ajouté à chaque puit à raison de 180  $\mu$ L, puis 10  $\mu$ L de produit préalablement solubilisé dans le DMSO et 10  $\mu$ L de suspension bactérienne à  $10^5$  UFC/mL sont ajoutés. Les concentrations testées vont de CMIx4 à CMI/4. Après 24 heures de culture à 37°C, les puits sont vidés en faisant attention à ne pas abimer le tapis bactérien formé dans le fond des puits. Chaque puit est ensuite lavé 3 fois avec du tampon phosphate salin afin d'enlever les bactéries n'ayant pas adhéré. Les plaques sont ensuite séchées afin de fixer les bactéries adhérentes, puis 150  $\mu$ L de d'une solution de cristal violet à 20 mg/mL dans le MeOH, sont ajoutés à chaque puit. Après 15 minutes de contact, la solution est enlevée et la plaque est rincée à l'eau pour enlever l'excédent. Pour finir, le cristal violet étant resté fixé au peptidoglycane des bactéries adhérentes dans le fond des puits est solubilisé avec 150  $\mu$ L d'EtOH. La densité optique (DO) est ensuite lue à 570 nm.

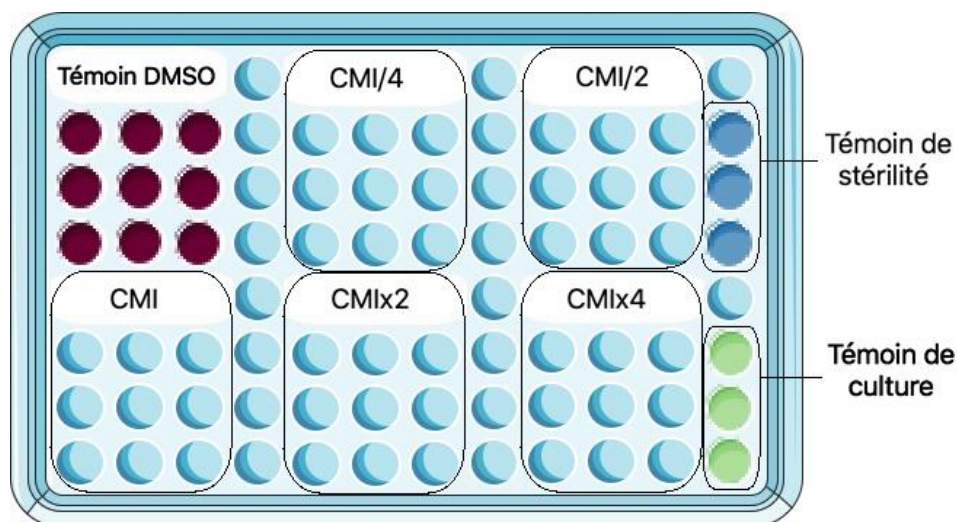


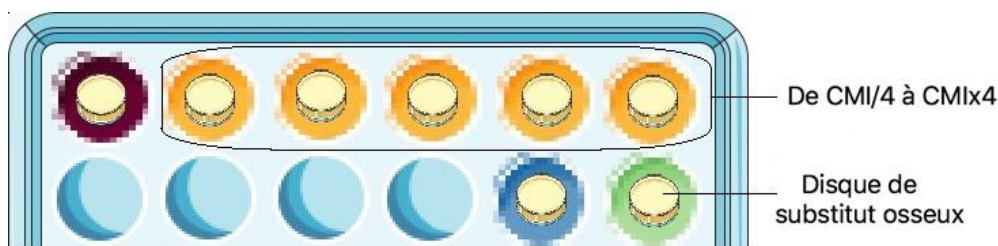
Figure 75. Schéma de la plaque des tests anti-biofilm sur surface inerte

Pour évaluer le potentiel des produits à détruire le biofilm bactérien, une première culture permettant de produire le biofilm est réalisée en ajoutant 190  $\mu\text{L}$  de BH enrichi en glucose à chaque puit, ainsi que 10  $\mu\text{L}$  de suspension bactérienne à  $10^5$  UFC/mL. Après 24 heures de culture à  $37^\circ\text{C}$ , les puits sont vidés en faisant attention à ne pas abîmer le tapis bactérien. Le traitement avec les produits actifs et la révélation sont ensuite réalisés de la même manière que précédemment.

### Effet anti-biofilm sur disques de substituts osseux

Les disques de substituts osseux utilisés sont constitués de céramique  $\beta$ -Tricalcium Phosphate (Cerasorb, Curasan<sup>TM</sup>, Allemagne). Ce matériau est de composition similaire à la phase minérale de l'os, qui constitue les deux tiers de la masse osseuse chez l'homme et lui confère sa dureté et sa résistance. L'utilisation de disques commerciaux permet une meilleure reproductibilité entre les conditions et entre les tests, car la porosité, le diamètre et l'épaisseur des disques sont toujours identiques. Ces tests ont été effectués en plaques 24 puits (**Fig. 76**).

Les disques sont d'abord déposés dans le fond de chaque puit, en conditions stériles. Ensuite, 1,8 mL de BH, 100  $\mu\text{L}$  de produit préalablement solubilisé dans le DMSO et 100  $\mu\text{L}$  de suspension bactérienne à  $10^5$  UFC/mL sont ajoutés. Les concentrations testées vont de CMI/4 à CMIx4.

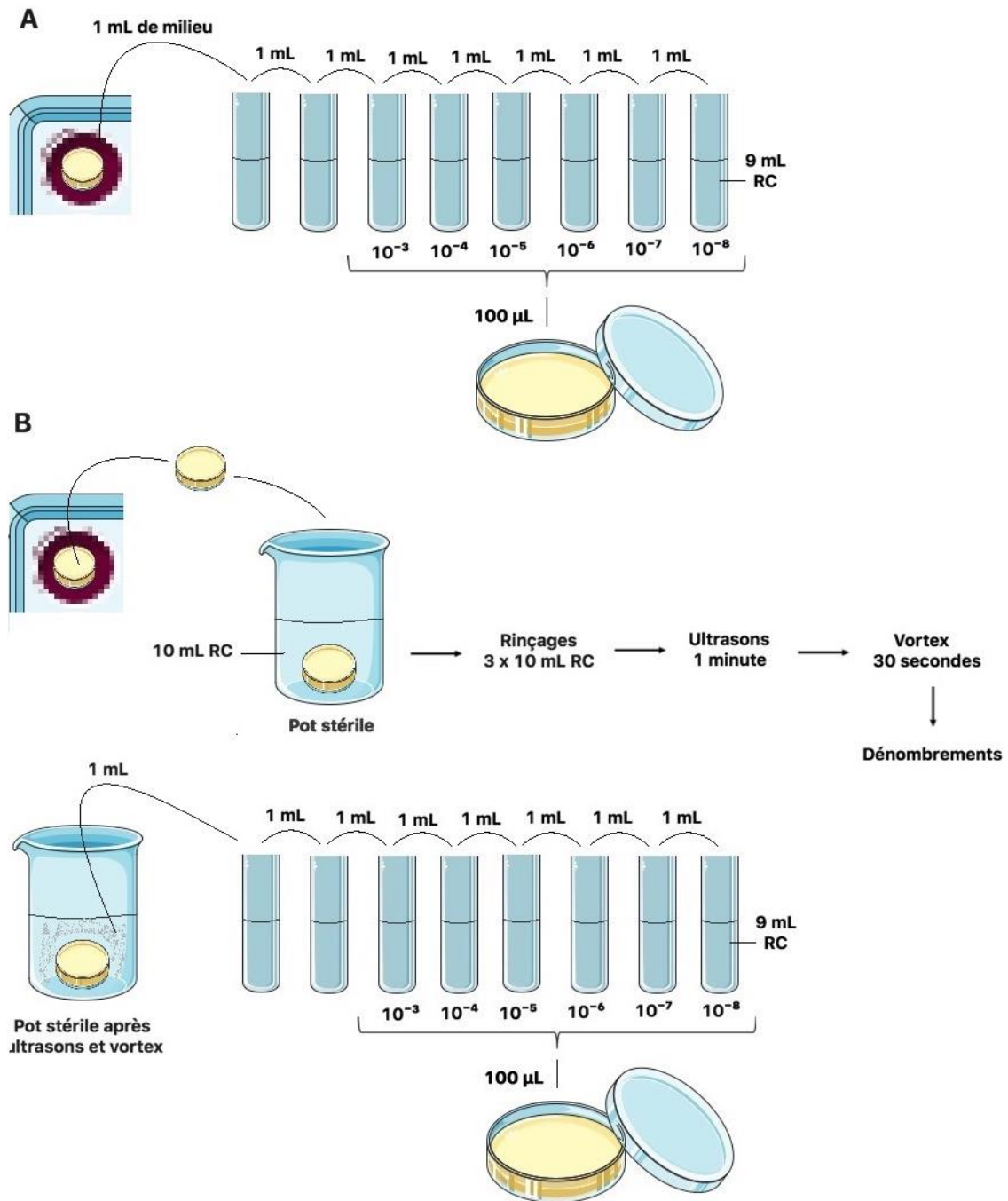


**Figure 76.** Schéma de la plaque des tests anti-biofilm sur disques de substitut osseux ; les témoins incluent le témoin de culture (vert), le témoin DMSO (violet) et le témoin de stérilité (bleu).

Après avoir incubé la plaque 24 heures à  $37^\circ\text{C}$ , des dénombrements sont réalisés sur les bactéries en suspension ainsi que sur les bactéries ayant adhéré au disque, pour chaque condition. Le protocole est détaillé dans la **figure 77**.

- Pour dénombrer les bactéries en suspension dans chaque puit, 1 mL d'inoculum est prélevé pour chaque condition, et plus ou moins dilué dans du RC selon l'intensité du trouble, 100  $\mu\text{L}$  de chaque dilution sont ensuite étalés sur boîte de MHA (**Fig. 77A**).
- Pour dénombrer les bactéries adhérentes aux disques, ces derniers sont placés en pot stérile puis rincés 3 fois avec 10 mL de RC. Le pot est ensuite passé aux ultrasons puis vortexé dans le but de décoller les bactéries pour que celles-ci se retrouvent en suspension. La solution de RC contenant les bactéries est ensuite dénombrée pour chaque condition, comme expliqué ci-dessus (**Fig. 77B**).

Les boîtes de dénombrements sont incubées 24 heures à 37°C avant les comptages.



**Figure 77.** Protocole de dénombrement des bactéries en suspension (A) et ayant adhéré aux disques (B) après le test anti-biofilm sur disques de substituts osseux

*Remarque – Mise au point*

Le BH enrichi en glucose n'a pas pu être utilisé avec les disques de substituts osseux, car l'acidification du milieu causée par la métabolisation du glucose par les bactéries entraînait la décomposition des disques, qui devenaient alors difficiles à récupérer entièrement.

## 7.4. Évaluation de la cytotoxicité des extraits et produits actifs

La cytotoxicité des extraits, sous-extraits et produits actifs purifiés du houblon, a été évaluée sur trois lignées cellulaires humaines. Ces tests ont été effectués dans des laboratoires différents, en fonction des disponibilités des lignées. Les protocoles présentent donc quelques différences (**Tableau 33**).

- Fibroblastes pulmonaires (WI-38) : tests réalisés par le Dr Claire Beaufay, laboratoire de pharmacognosie dirigé par le Pr Joëlle Quetin-Leclercq, Université Catholique de Louvain (Belgique) ;
- Lignée d'hépatomes (Hep-G2) : tests réalisés avec l'aide du Dr Sébastien Anthérieu du laboratoire de toxicologie de la Faculté de Pharmacie de Lille (EA 4483, IMPECS) et du Dr Vincent Roumy du laboratoire de pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Lille (EA 7394, ICV) ;
- Lignée d'ostéosarcomes (MG-63) : tests effectués par le Dr Feng Chai au pôle recherche de la Faculté de Médecine de l'Université de Lille et CHU de Lille (INSERM 1008).

Les expérimentations sont réalisées en microplaques 96 puits à fond plat. Dans tous les cas, le déroulement du test est le même. Une première plaque est mise en culture avec les cellules pour que celles-ci adhèrent au fond des puits. Lorsqu'elles arrivent à environ 80% de confluence, les puits sont vidés en faisant attention à ne pas abîmer le tapis cellulaire. Le milieu est alors remplacé par un milieu de culture contenant l'extrait ou le produit à tester : c'est le traitement. Pour chaque test, un témoin montrant l'innocuité du solvant est effectué. Un témoin positif avec un composé d'origine naturel connu pour sa cytotoxicité, comme la camptothécine ou l'étoposide (Sigma Aldrich®, USA) est également réalisé.

### *Remarque*

Pour des questions de praticité et pour diminuer le risque d'abîmer les tapis cellulaires, les dilutions permettant d'obtenir les concentrations finales en extraits ou produits à tester sont effectuées dans une première plaque (sans cellules) avec une pipette automatique multicanaux. 100 µL de chaque condition sont ensuite transférés dans la plaque avec les cellules pour effectuer le traitement.

Après 48 à 72h de traitement, les puits sont à nouveau vidés. Le milieu est alors remplacé par un révélateur de viabilité cellulaire. Le sel de tétrazolium (MTT) a été utilisé pour les lignées WI-38 et HepG2. Pendant la réaction, le MTT est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes, en un composé violet appelé formazan. La lecture de la densité optique est ensuite réalisée. Pour les tests avec la lignée MG-63, c'est l'Alamar Blue qui a été utilisé pour révéler la viabilité cellulaire. Ce

dernier est un colorant bleu, lui-même faiblement fluorescent. Il peut être réduit en résorufine par les cellules vivantes, un composé très rouge et fluorescent. On effectue ensuite une mesure de fluorescence. On obtient ainsi un pourcentage de viabilité cellulaire en comparaison avec le témoin, grâce à l'équation suivante :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{A_T}{A_{NT}} \times 100,$$

où  $A_T$  est l'absorbance des cellules traitées à une concentration donnée et  $A_{NT}$  l'absorbance des cellules du témoin.

Le traitement des données et les calculs de  $CI_{50}$  des extraits et des produits ont été déterminés par régression non linéaire, par le biais du logiciel GraphPad Prism 5. L'indice de sélectivité, qui est le rapport de la dose cytotoxique sur la dose active, n'a pas pu être calculé car il est nécessaire d'avoir les  $CI_{50}$  pour les activités antibactériennes, qui n'ont pas été déterminées.

**Tableau 33.** Tableau comparatif des protocoles permettant d'évaluer la cytotoxicité des extraits et produits actifs, DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium, MEM : Minimum Essential Media, SVF : Sérum de veau foetal, Alamar blue (Gibco™, ThermoFisher Scientific™, USA), MTT : sel de tétrazolium (Sigma Aldrich®, USA).

Lignée cellulaire	WI-38	Hep-G2	MG-63
Milieu de culture	DMEM + 10% SVF + pénicilline- streptomycine 100 UI/mL à 100 µg.mL <sup>-1</sup>	DMEM + 10% SVF + pénicilline- streptomycine 100 UI/mL à 100 µg.mL <sup>-1</sup>	MEM + 10% SVF + 40 µg.mL <sup>-1</sup> gentamicine
Ensemencement de la plaque avant traitement	5 000 cellules par puit 24h avant traitement	4 000 cellules 48h avant traitement ou 2 500 cellules 72h avant traitement	3 000 cellules 48h avant traitement
Solution mère d'extrait /de produit	125x dans DMSO	500x dans DMSO	500x dans DMSO
Pourcentage final de solvant dans le milieu	0,8%	0,2%	0,2%
Durée du traitement	72 heures à 37°C et 5% CO <sub>2</sub>	48 heures à 37°C et 5% CO <sub>2</sub>	48 heures à 37°C et 5% CO <sub>2</sub>
Révéléateur et durée de la réaction	DMEM + 3 mg.mL <sup>-1</sup> MTT Incubation de 45 minutes à 37°C	DMEM + 0,5 mg.mL <sup>-1</sup> MTT Incubation pendant 1h30 à 37°C	MEM + 10% Alamar Blue Incubation 3h à 37°C
Lecture	DO à 570 et 620 nm dans le DMSO	DO à 550 nm dans le DMSO	Fluorescence excitation à 530 nm émission à 590 nm

## Chapitre 8.

### Activité antifongique du houblon vis-à-vis de *Z. tritici*

---

Le potentiel du houblon comme bio-fongicide a été évalué vis-à-vis de plusieurs champignons phytopathogènes. Les expérimentations ont été réalisées grâce à l'aide du Dr Ali Siah et du Pr Patrice Halama, à l'Institut Supérieur d'Agriculture de Lille (EA 7394, ICV).

La même méthode de fractionnement bioguidé a été effectuée. L'objectif étant d'étudier l'effet des diverses parties de la plante en testant dans un premier temps les extraits bruts. Si l'activité d'un extrait s'avère intéressante, les sous-extraits aqueux et DCM sont testés. Les produits majoritaires peuvent ensuite être purifiés pour tenter d'identifier les composés antifongiques. L'huile essentielle a également été testée, de la même manière que les extraits. Le traitement des données et les calculs de  $CI_{50}$  des extraits et produits actifs ont été déterminés par régression non linéaire par l'intermédiaire du logiciel GraphPad Prism 5.

#### *Remarque – mise au point*

Les protocoles utilisés prennent en compte la quantité d'extraits ou de produits disponibles. Les extraits et sous-extraits peuvent être testés en boîtes de Pétri. Des cultures en petits volumes, en microplaques 96 puits, sont plutôt utilisées pour les tests des produits purifiés.

#### **8.1. Criblage de l'activité antifongique des extraits et sous-extraits**

Le protocole est inspiré de celui utilisé par Siah et al. (2010). Les extraits et sous-extraits des différentes parties du houblon, ainsi que l'huile essentielle de cônes sont préalablement solubilisés dans le MeOH et dilués dans un milieu potato dextrose agar (Fluka™, USA) pour avoir une concentration finale en extrait de  $1,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  en boîte, avec au maximum 1,25% de solvant. Un témoin MeOH a montré l'innocuité du solvant sur le champignon à cette concentration. Des dilutions successives au demi sont ensuite réalisées pour tester les concentrations suivantes : 1,25 ; 0,6 ; 0,3 ; 0,16 et  $0,08 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Après solidification du milieu dans les boîtes de Pétri,  $5 \mu\text{L}$  d'une suspension sporale dont la concentration est fixée à  $5 \times 10^5$  spores/mL à l'aide d'une cellule de Malassez, sont déposés au centre de chaque boîte. La reproductibilité a été évaluée par la réalisation de 5 réplicats par extrait.

Les diamètres des colonies sont mesurés après 10 jours d'incubation à  $21^\circ\text{C}$ .



**Remarque**

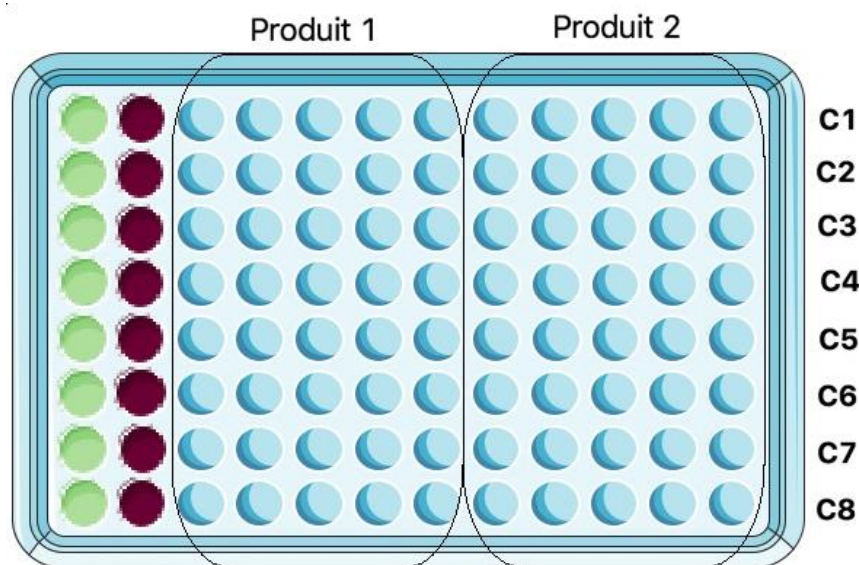
Pour les tests des extraits et sous-extraits, la souche *Z. tritici* T01193 a été utilisée. Quelques mois plus tard, les essais en serre réalisés par d'autres personnes ont montré que celle-ci perdait de sa virulence. Elle a donc été remplacée par une souche qui lui est proche : *Z. tritici* T02596.

La méthode de l'échiquier détaillée dans la partie 7.3.1., a été adaptée en boîte de Pétri pour étudier l'effet de l'association de l'huile essentielle de houblon avec un fongique de synthèse, le bixafène. Concernant la dissolution de l'extrait et l'ensemencement, le même protocole que celui utilisé pour le criblage a été effectué.

**8.2. Identification des produits actifs en microplaques**

L'activité des molécules purifiées du sous-extrait DCM de cônes femelles, ainsi que des 3 composés majoritaires de l'huile essentielle a été évaluée envers *Z. tritici* T02596. Une méthode de micro-dilution en microplaques 96 puits inspirée par Siah et al. (2010) a été utilisée.

Les cupules de la microplaque sont d'abord remplies avec 112,5 µL de milieu peptone glucose liquide contenant le produit solubilisé dans 1% de DMSO. Des volumes de 37,5 µL de la suspension sporale à  $5 \times 10^5$  spores/mL sont ensuite ajoutés aux puits. Le volume final de chaque cupule est de 150 µL. Les concentrations suivantes ont été testées : 1,25 ; 0,6 ; 0,3 ; 0,16 ; 0,08 ; 0,04 ; 0,02 et 0,01 mg.mL<sup>-1</sup> (C1 à C8, **Fig. 78**). Le bixafène, un fongicide de synthèse, a été utilisé comme témoin positif dans les mêmes conditions.



**Figure 78.** Schéma de plaque pour le test des produits purifiés contre *Z. tritici*. Les témoins de culture sont symbolisés par des pastilles vertes ; les témoins DMSO sont symbolisés par des pastilles violettes.

Après 6 jours d'incubation à 21°C sous agitation et à l'abri de la lumière, la concentration en champignons dans chacun des puits est estimée par comptage à la cellule de Malassez.

## Chapitre 9. Analyses statistiques

---

Les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du logiciel R.

Pour chaque série de données, la normalité sur les résidus a d'abord été évaluée par le test de Shapiro- Wilk (Shapiro et Wilk, 1965). Dans le cas où seules deux conditions sont comparées, des tests de t-student sont réalisés, si la normalité est vérifiée. Dans le cas contraire, un test de Mann-Whitney est effectué. Lorsque plus de deux séries de données doivent être comparées, et si la normalité est vérifiée, l'ANOVA suivi du test de Tukey permettent de mettre en évidence les différences significatives entre les conditions. Si la normalité n'est pas vérifiée ou que le nombre d'observations n'est pas suffisant pour l'évaluer, le test de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn sont réalisés (Dinno, 2015). Dans chacun des cas, le risque  $\alpha$  est fixé à 0,05.

## Conclusion générale et perspectives

Ce projet de thèse visait principalement l'isolement de composés phénoliques originaux du houblon à fort potentiel antimicrobien, en particulier dans la lutte contre les souches résistantes. Le fractionnement bioguidé par CPC et par CLHP préparative a permis de purifier et d'identifier six composés phénoliques prénylés. Ces composés avaient déjà été décrits dans la littérature, mais leur potentiel antimicrobien dans la lutte contre les souches résistantes aux antibiotiques n'a été que très peu étudié.

Concernant l'activité antibactérienne, les six composés purifiés se sont avérés actifs contre les souches de *S. aureus*. Trois d'entre eux, les plus efficaces : le XN, le DMX et la lupulone, ont révélé un important potentiel de lutte vis-à-vis de l'isolat clinique de SARM T28.1, issu d'une ostéite de pied diabétique. Dans ce contexte, plusieurs paramètres clés tels que la bactéricidie et l'effet post-antibiotique ont été analysés, montrant pour cet aspect, un potentiel intéressant des deux chalcones : le XN et le DMX. Ces paramètres assurent un effet efficace des produits pendant plusieurs heures. Le potentiel anti-biofilm de ces produits est un atout indéniable pour le traitement des infections difficiles à éradiquer. En effet, le DMX et la lupulone ont montré une efficacité, à la fois pour inhiber la formation du biofilm, mais également pour le détruire, à des concentrations sub-inhibitrices. Afin de diminuer leur dose et d'augmenter leur efficacité, ces composés pourraient également être utilisés en association avec des antibiotiques. L'association de la lupulone et du XN avec l'oxacilline permet notamment de contourner la résistance de la souche à cet antibiotique, ce qui ouvre des perspectives de combinaison des produits pour le traitement des infections difficiles. Les analyses de cytotoxicité des produits, combinées avec les données de biodisponibilité décrites dans la littérature, nous ont amené à réfléchir au mode d'administration optimal de ces composés. Les avantages et les inconvénients d'une administration orale ou d'une application locale ont été discutés. La lupulone étant le produit le plus actif, ce qui limite sa toxicité envers plusieurs lignées cellulaires, constitue le meilleur candidat de notre étude. Néanmoins, la difficulté à l'obtenir est un frein majeur. Les résultats des premiers essais de biotechnologies végétales avec le houblon montrent un potentiel limité pour la production des métabolites d'intérêt. Elles nécessitent davantage de recherche. Des méthodes de purification ou d'hémi-synthèse pourrait alors être développées. L'obtention de la lupulone à partir de sous-produits brassicoles pourrait être une piste prometteuse car dans ces derniers, les acides  $\alpha$ , principaux composés interférents avec

la purification de la lupulone, ont préalablement été enlevés par le processus de fabrication de la bière.

Parmi les composés phénoliques prénylés purifiés du houblon, le DMX et la co-humulone se sont avérés actifs vis-à-vis du champignon pathogène du blé, *Z. tritici*. Leur activité antifongique contre ce phytopathogène est nouvellement décrite pour le houblon. Cependant, la faible disponibilité de ces produits *in planta* et leur activité relativement modérée envers le champignon, n'a pas conduit à une poursuite de l'étude *in vivo*. L'huile essentielle de houblon a en revanche montré une association synergique avec un antifongique de synthèse. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives de lutte contre ce champignon. L'utilisation de plusieurs agents antifongiques, en association, permettrait à la fois de diminuer la dose d'antifongique de synthèse, et de ralentir le développement de résistances aux fongicides.

Diverses perspectives sont envisagées pour la suite de ce projet.

- Concernant les activités biologiques en santé humaine, il sera nécessaire de confirmer le potentiel antibactérien et l'innocuité du ou des candidats les plus prometteurs par le biais d'analyses *in vivo*. Pour poursuivre l'aspect applicatif, des collaborations seront initiées avec des galénistes. D'un point de vue fondamental, il est envisagé d'étudier plus en détails le mode d'action de ces molécules sur les bactéries.

Dans le but d'élargir le spectre antimicrobien du houblon, l'activité de ce dernier a également été évaluée envers un parasite humain, *Trypanosoma brucei brucei*.

- Concernant le potentiel du houblon comme bio-pesticide, des études vis-à-vis d'autres phytopathogènes tels que *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* et *Phytophthora infestans* sont en cours.
- Concernant l'aspect phytochimie et l'obtention des métabolites d'intérêt : les sous-produits brassicoles contenant du houblon paraissent prometteurs comme source de composés d'intérêt actifs, il sera intéressant d'essayer de corrélérer leur composition avec les matières premières et les processus de fabrication utilisés par les brasseurs. Pour cela, plusieurs brasseries, de plusieurs tailles et avec des processus de fabrication variés, devront être échantillonnées. La production de ces métabolites par le biais de suspensions cellulaires de houblon pourrait également constituer une piste. Les résultats sont attendus dans les prochains mois.

Plus spécifiquement pour les autres parties de la plante (feuilles et tiges), qui ne sont pas utilisées par les brasseurs, un axe de valorisation de sera recherché par le biais d'autres activités biologiques. Leur composition chimique pourra être étudiée.

En parallèle de cette thèse, un chapitre d'ouvrage publié chez Springer dans *Natural Antimicrobial Agents*<sup>3</sup>, ainsi qu'une revue en cours de révision dans *Phytochemistry Reviews*<sup>4</sup> ont été rédigées. Une liste complète de la valorisation scientifique de cette thèse est disponible à la fin de ce mémoire.

---

<sup>3</sup> Bocquet L, Sahpaz S et Rivière C. 2018. An overview of the antimicrobial properties of hop. In Mérillon JM & Rivière C (ed) *Natural Antimicrobial Agents*, Series Sustainable Development and Biodiversity, Springer, p. 31-54.

<sup>4</sup> Bocquet L, Sahpaz S, Hilbert JL, Rambaud C et Rivière C. 2018b. « *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology ». *Phytochemistry Reviews*, en cours de révision.

# Bibliographie

- Abedini A, Roumy V, Mahieux S, Biabiany M, Standaert-Vitse 1, Rivière C, Sahpaz S, Bailleul F, Neut C et Hennebelle T. 2013. « Rosmarinic Acid and Its Methyl Ester as Antimicrobial Components of the Hydromethanolic Extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae) ». *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 1-11.
- Aberl A et Coelhan M. 2012. « Determination of Volatile Compounds in Different Hop Varieties by Headspace-Trap GC/MS - In Comparison with Conventional Hop Essential Oil Analysis ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (11): 2785-92.
- Abourashed EA, Koetter U et Brattström A. 2004. « In Vitro Binding Experiments with a Valerian, Hops and Their Fixed Combination Extract (Ze91019) to Selected Central Nervous System Receptors ». *Phytomedicine* 11 (7-8): 633-38.
- Ab Rahman S, Farhana S, Singh E, Pieterse CMJ et Schenk PM. 2018. « Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens ». *Plant Science* 267: 102-11.
- Abram V, Čeh B, Vidmar M, Hercezi M, Lazić N, Bucik V, Smole Možina S, Kosir IJ, Kač M, Demsar L et Ulrih NA. 2015. « A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones ». *Industrial Crops and Products* 64: 124–134.
- Abreu AC, McBain AJ et Simões M. 2012. « Plants as Sources of New Antimicrobials and Resistance-Modifying Agents ». *Natural Product Reports* 29 (9): 1007-21.
- Akazawa H, Kohno H, Tokuda H, Suzuki N, Yasukawa K, Kimura Y, Manosroi A, Manosroi J et Akihisa T. 2012. « Anti-Inflammatory and Anti-Tumor-Promoting Effects of 5-Deprenyllupulone C and Other Compounds from Hop (*Humulus Lupulus* L.) ». *Chemistry & Biodiversity* 9 (6): 1045-54.
- Akdemir EG. 2015. « Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria ». *International Journal of Food Microbiology* 202: 35–41.
- Aliyu S et Bala M. 2011. « Brewer's Spent Grain: A Review of Its Potentials and Applications ». *African Journal of Biotechnology* 10 (3): 324-31.
- Allsopp P, Possemiers S, Campbell D, Gill C et Rowland I. 2013. « A comparison of the anticancer properties of isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin using *in vitro* models of colon cancer ». *BioFactors* 39 (4): 441–447.
- Almaguer C, Schönberger C, Gastl M, Arendt EK et Becker T. 2014. « *Humulus Lupulus* – a Story That Begs to Be Told. A Review ». *Journal of the Institute of Brewing* 120 (4): 289-314.
- ANSES, ANSMS, et INSP. 2016. « Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : nécessité d'une mobilisation déterminée et durable ». [En ligne] <http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2016/Consommation-d-antibiotiques-et-resistance-aux-antibiotiques-en-France-necessite-d-une-mobilisation-determinee-et-durable>
- Arede P, Milheirico C, de Lencastre H et Oliveira DC. 2012. « The Anti-Repressor MecR2 Promotes the Proteolysis of the mecA Repressor and Enables Optimal Expression of  $\beta$ -lactam Resistance in MRSA ». *PLoS Pathogens* 8 (7): 1-17.
- Arif T, Bhosale JD, Kumar N, Mandal TK, Bendre RS, Lavekar GS et Dabur R. 2009. « Natural products - antifungal agents derived from plants ». *Journal of Asian Natural Products Research* 11 (7): 621-638.
- Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M et Parr-Dobrzanski B. 2002. « The strobilurin fungicides ». *Pest Management Science* 58 (7): 649–662.
- Bartmańska A, Tronina T, Popłoński J et Huszcza E. 2013. « Biotransformations of Prenylated Hop Flavonoids for Drug Discovery and Production ». *Current Drug Metabolism* 14 (10): 1083-1097.

- Bedini S, Flamini G, Girardi J, Cosci F et Conti N. 2015. « Not Just for Beer: Evaluation of Spent Hops (*Humulus Lupulus* L.) as a Source of Eco-Friendly Repellents for Insect Pests of Stored Foods ». *Journal of Pest Science* 88 (3): 583-592.
- Berger-Bächli B, Barberis-Maino L, Strässle A et Kayser FH. 1989. « FemA, a Host-Mediated Factor Essential for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*: Molecular Cloning and Characterization ». *Molecular & General Genetics: MGG* 219 (1-2): 263-269.
- Bernotiene G, Nivinskene O, Butkiene R et Mockute D. 2004. « Chemical composition of essential oils of hops (*Humulus lupulus* L.) growing wild in Aukstaitija ». *CHEMIJA* 15 (2): 31-36.
- Berthod A, Hassoun M et Ruiz-Angel MJ. 2005. « Alkane Effect in the Arizona Liquid Systems Used in Countercurrent Chromatography ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 383 (2): 327-240.
- Bhattacharya S, Virani S, Zavro M et Haas GJ. 2003. « Inhibition of *Streptococcus mutans* and Other Oral streptococci by hop (*Humulus lupulus* L.) constituents ». *Economic Botany* 57 (1): 118-125.
- von Bingen H. 2005. « Heilkraft der Natur "Physica" ». In *Das Buch von dem inneren Wesen der verschiedenen Naturen der Geschöpfe*, Basler Hildegard-Gesellschaft. <https://www.buch24.de/shopdirekt.cgi?id=2629778&p=3&t=&h=&kid=0&klid=2&sid=29>.
- Bland JS, Minich D, Lerman R, Darland G, Lamb J, Tripp M et Grayson N. 2015. « Isohumulones from hops (*Humulus lupulus*) and their potential role in medical nutrition therapy ». *PharmaNutrition* 3 (2): 46-52.
- Bocquet L, Sahpaz S et Rivière C. 2018a. An overview of the antimicrobial properties of hop. In Mérillon JM & Rivière C (ed) *Natural Antimicrobial Agents, Series Sustainable Development and Biodiversity*, Springer, 31-54.
- Bocquet L, Sahpaz S, Hilbert JL, Rambaud C et Rivière C. 2018b. « *Humulus lupulus* L. a famous edible and medicinal plant: an overview of its phytochemistry and its biological activities, advances in plant biotechnology ». *Phytochemistry Reviews*, en cours de revision.
- Bogdanova K, Röderova M, Kolar M, Langova K, Dusek M, Jost P, Kubelkova K, Bostik P et Olsovska J. 2018. « Antibiofilm activity of bioactive hop compounds humulone, lupulone and xanthohumol toward susceptible and resistant staphylococci ». *Research in Microbiology*. Accepté.
- Bois D. 1996. « Les plantes à boissons ». *Les plantes alimentaires chez tous les peuples et à travers les âges : histoire, utilisation, culture* ». Rive Droite, 4: 182-189.
- Bolca S, Possemiers S, Maervoet V, Huybrechts I, Heyerick A, Vervarcke S, Depypere H, De Keukeleire D, Bracke M, De Henauw S, Verstraete W and de Wiele TV. 2007. « Microbial and Dietary Factors Associated with the 8-Prenylnaringenin Producer Phenotype: A Dietary Intervention Trial with Fifty Healthy Post-Menopausal Caucasian Women ». *British Journal of Nutrition* 98 (5): 950-959.
- Bourgeois-Nicolaos N, Piriou O, Butel MJ et Doucet-Populaire F. 2006. « Le linézolide : activité antibactérienne, intérêts cliniques et résistance ». *Annales de Biologie Clinique* 64 (6): 549-564.
- Bravo L, Cabo J, Fraile A, Jimenez K et Villar A. 1974. « Estudio farmacodinamico del lupulo (*Humulus lupulus* L.). Accion tranquilizante ». *Bolletino chimico farmaceutico*: 310-315.
- Bruneton, Jean. 2016. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. 5<sup>ème</sup> édition. Lavoisier.
- Buckwold VE, Wilson RJH, Nalca A, Beer BB, Voss TG, Turpin JA, Buckheit RW, Wei J, Wenzel-Mathers M, Walton EM, Smith RJ, Pallansh M, Ward P, Wells J, Chuvala L, Sloane S, Paulman R, Russel J, Hartman T et Ptak R. 2004. « Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses ». *Antiviral Research* 61 (1): 57-62.
- Caenen, Simon. 2016. « Les sept derniers producteurs de houblon du Nord sont en Flandre et veulent se développer ». *La Voix du Nord*, 2016.
- Cattoor K, Bracke M, Deforce D, De Keukeleire D et Heyerick A. 2010. « Transport of Hop Bitter Acids across Intestinal Caco-2 Cell Monolayers ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (7): 4132-4140.
- Cattoor K, Dresel M, De Bock L, Boussery K, Van Bocxlaer J, Remon JP, De Keukeleire D, Deforce D, Hofmann D et Heyerick A. 2013. « Metabolism of Hop-Derived Bitter Acids ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (33): 7916-7924.
- Cattoor K, Remon JP, Boussery K, Van Bocxlaer J, Bracke M, De Keukeleire D, Deforce D et Heyerick A. 2011. « Bioavailability of Hop-Derived Iso- $\alpha$ -Acids and Reduced Derivatives ». *Food & Function* 2 (7): 412-422.
- Cavallo JD, Chardon H, Chidiac C, Choutet P, Courvalin P, Dabernat H et Drugeon H 2006. *Comité de l'antibiogramme de*



- la société Française de Microbiologie. [En ligne] [http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/Casfm\\_2005.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/Casfm_2005.pdf).
- Čeh B, Kač M, Košir IJ et Abram V. 2007. « Relationships between Xanthohumol and Polyphenol Content in Hop Leaves and Hop Cones with Regard to Water Supply and Cultivar ». *International Journal of Molecular Sciences* 8 (9): 989-1000.
- Cermak P, Olsovska J, Mikyska A, Dusek M, Kadleckova Z, Vanicek J, Nyc O, Sigler K, Bostikova V et Bostik P. 2017. « Strong Antimicrobial Activity of Xanthohumol and Other Derivatives from Hops (*Humulus lupulus* L.) on Gut Anaerobic Bacteria ». *Acta Pathologica, Microbiologica and Immunologica Scandinavica* 125: 1033-1038.
- Česlová L, Holčápek M, Fidler M, Drštičková J et Lísa M. 2009. « Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry ». *Advanced Separation Methods in Food Analysis*, 1216 (43): 7249-7257.
- CEPCM (ECDC). 2016. « Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union ». European Centre for Disease Prevention and Control, European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. [En ligne] <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/EAAD%20EARS-Net%20summary.pdf>.
- Chadwick LR, Pauli GF et Farnsworth NR. 2006. « The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties ». *Phytomedicine* 13 (1–2): 119-131.
- Chadwick L, Nikolic RD, Burdette JE, Overk CR, Bolton JL, van Breemen RB, Fröhlich R, Fong HHS, Farnsworth NR et Pauli GF. 2004. « Estrogens and Congeners from Spent Hops (*Humulus lupulus*) ». *Journal of Natural Products* 67 (12): 2024-2032.
- Chambers HF. 1997. « Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications ». *Clinical Microbiology Reviews* 10 (4): 781-791.
- Chapman AC. 1903. « Essential Oil of Hops ». *Journal of the Chemical Society, Transactions* 83 (0): 505-513.
- Chastang T. 2014. « Étude de la synthèse du resvératrol et de ses dérivés (viniférines) par des suspensions de cellules de vigne et optimisation de la production en bioréacteur ». Thèse, École centrale de Paris.
- Chen QH, Fu ML, Chen MM, Liu J, Liu XJ, He GQ et Pu SC. 2012. « Preparative isolation and purification of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) by high-speed counter-current chromatography ». *Food Chemistry* 132 (1): 619-623.
- Chen SN, Lankin DC, Chadwick LR, Jaki BU et Pauli GF. 2009. « Dynamic Residual Complexity of Natural Products by qHNMR: Solution Stability of Desmethylxanthohumol ». *Planta Medica* 75 (7): 757-62.
- Choi JY, Desta KT, Lee SJ, Kim YH, Shin SC, Kim GS, Lee SJ, Shim JH, Hacimuftuoglu A et Abd El-Aty AM. 2018. « LC-MS/MS Profiling of Polyphenol-Enriched Leaf, Stem and Root Extracts of Korean *Humulus Japonicus* Siebold & Zucc and Determination of Their Antioxidant Effects ». *Biomedical Chromatography* 32 (5): e4171.
- Choi O, Yahiro K, Morinaga N, Miyazaki M et Noda M. 2007. « Inhibitory Effects of Various Plant Polyphenols on the Toxicity of Staphylococcal Alpha-Toxin ». *Microbial Pathogenesis* 42 (5-6): 215-224.
- Choma IM et Grzelak EM. 2011. « Bioautography detection in thin-layer chromatography ». *Journal of Chromatography A* 1218 (19): 2684–2691.
- Clark SM, Vaitheeswaran V, Ambrose SJ, Purves RW et Page JE. 2013. « Transcriptome analysis of bitter acid biosynthesis and precursor pathways in hop (*Humulus lupulus*) ». *BMC Plant Biology* 13: 12.
- Coldea TE, Mudura E, Rotar AM, Salanta LC, Pop CR et Darab C. 2017. « Brewer's spent hop polyphenols characterization and industrial exploitation ». *Hop and Medicinal Plants*, n° 1-2: 9-16.
- Collin S, Jerkovic V, Bröhan M et Callemien D. 2013. « Polyphenols and Beer Quality ». In *Natural Products*, 2333-59. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Costa R, Rodrigues I, Guardão L, Rocha-Rodrigues S, Silva C, Magalhães J, Ferreira-de-Almeida M, Negrão R et Soares R. 2017. « Xanthohumol and 8-Prenylnaringenin Ameliorate Diabetic-Related Metabolic Dysfunctions in Mice ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 45 (juillet): 39-47.
- Craig WA. 1991. « The postantibiotic effect ». *Annals of Internal Medicine* 13 (16): 121-124.
- Cushnie TP et Lamb AJ. 2011. « Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 38 (2): 99-107.
- Dahlberg CJ, Harris G, Urban J, Tripp ML, Bland JS et Carroll BJ. 2012. « Isolation of bitter acids from hops (*Humulus lupulus* L.) using countercurrent chromatography ». *Journal of separation science* 35 (9): 1183-1189.

- Dayan FE, Cantrell CL et Duke SO. 2009. « Natural products in crop protection ». *Modern Trends in Agrochemistry*, 17 (12): 4022-4034.
- De Keukeleire J, Janssens I, Heyerick A, Ghekiere G, Cambie J, Roldán-Ruiz I, Van Bockstaele E et De Keukeleire D. 2007. « Relevance of Organic Farming and Effect of Climatological Conditions on the Formation of  $\alpha$ -Acids,  $\beta$ -Acids, Desmethylxanthohumol, and Xanthohumol in Hop (*Humulus lupulus* L.) ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (1): 61-66.
- De Keukeleire J, Ooms G, Heyerick A, Roldan-Ruiz I, Van Bockstaele E et De Keukeleire D. 2003. « Formation and Accumulation of  $\alpha$ -Acids,  $\beta$ -Acids, Desmethylxanthohumol, and Xanthohumol during Flowering of Hops (*Humulus lupulus* L.) ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (15): 4436-4441.
- Delaunay S, Rondags E et Germain P. 2005. *Production d'antibiotiques par biotechnologies*. 6<sup>ème</sup> édition. Techniques Ingénieur.
- Delehanty JB, Johnson BJ, Hickey TE, Pons T et Ligler FS. 2007. « Binding and Neutralization of Lipopolysaccharides by Plant Proanthocyanidins ». *Journal of Natural Products* 70 (11): 1718-1724.
- Deraedt, Aude. 2017. « Le houblon nordiste reprend son souffle grâce au « consommateur local » ». *La Voix du Nord*, 2017.
- Dewanjee S, Gangopadhyay M, Bhattacharya N, Khanra R et Dua TK. 2015. « Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry ». *Journal of Pharmaceutical Analysis* 5 (2): 75-84.
- Dephy maräichage. 2015. « *Biocontrôle ou Valoriser ce qui se fait dans la nature pour protéger ses cultures* ». Ecophyto, 2p. [http://draaf.pays-de-la-loire.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Fiche\\_Dephy\\_Biocontrôle\\_BAT\\_cle045b85.pdf](http://draaf.pays-de-la-loire.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Fiche_Dephy_Biocontrôle_BAT_cle045b85.pdf).
- Dhooghe L, Naessens T, Heyerick A, De Keukeleire D, Vlietinck AJ, Pieters L et Apers S. 2010. « Quantification of xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, and 6-prenylnaringenin in hop extracts and derived capsules using secondary standards ». *Talanta* 83 (2): 448-456.
- Diller RA, Riepl HM, Rose O, Frias C, Henze G et Prokop A. 2005. « Synthesis of Demethylxanthohumol, a New Potent Apoptosis-Inducing Agent from Hops ». *Chemistry & Biodiversity* 2 (10): 1331-1337.
- Diller RA, Riepl HM, Rose O, Frias C, Henze G et Prokop A. 2009. « Desmethylxanthohumol from Hops, Chemistry and Biological Effects ». In *Beer in Health and Disease Prevention*, 703-709. Elsevier.
- Dinno A. 2015. « Nonparametric Pairwise Multiple Comparisons in Independent Groups Using Dunn's Test ». *The Stata Journal* 15 (1): 292-300.
- Dorn C, Bataille F, Gaebele E, Heilmann J et Hellerbrand C. 2010. « Xanthohumol feeding does not impair organ function and homeostasis in mice ». *Food and Chemical Toxicology* 48 (7): 1890-1897.
- Dorn C, Weiss TS, Jörg Heilmann et Hellerbrand C. 2010. « Xanthohumol, a prenylated chalcone derived from hops, inhibits proliferation, migration and interleukin-8 expression of hepatocellular carcinoma cells ». *International Journal of Oncology* 36 (2): 435-441.
- Dorosz, Philippe. 2018. *Guide pratique des médicaments*. 37<sup>ème</sup> édition. Maloine.
- Dos Santos Mathias TR, Marinho Fontes Alexandre V, Cammarota MC, Moretzsohn de Mello PP et Camporese Servulo EF. 2015. « Characterization and Determination of Brewer's Solid Wastes Composition ». *Journal of the Institute of Brewing* 121 (3): 400-404.
- Dresel M, Van Opstaele F, Praet T, Jaskula-Goiris B, Van Holle A, Naudts D, De Keukeleire D, De Cooman L et Aerts G. 2013. « Investigation of the impact of the hop variety and the hopping technology on the analytical volatile profile of single-hopped worts and beers ». *Brewing Science* 66: 162-175.
- Dumas ER, Michaud AE, Bergeron C, Lafrance JL, Mortillo S et Gafner S. 2009. « Deodorant effects of a supercritical hops extract: antibacterial activity against *Corynebacterium xerosis* and *Staphylococcus epidermidis* and efficacy testing of a hops/zinc ricinoleate stick in humans through the sensory evaluation of axillary deodorancy ». *Journal of Cosmetic Dermatology* 8 (3): 197-204.
- Dusek M, Olsovska J, Krofta K, Jurkova M et Mikyska A. 2014. « Quantitative determination of  $\beta$ -acids and their transformation products in beer and hop using HR/AM-LC-MS/MS ». *Journal of Agricultural and Food chemistry* 62(31): 7690-7697.
- Dyke KGH, Jevons MP et Parker MT. 1966. « Penicillinase Production and Intrinsic Resistance to Penicillins in *Staphylococcus aureus* ». *The Lancet*, 835-838.

- Eastwell KC et Nelson ME. 2007. « Occurrence of Viroids in Commercial Hop (*Humulus lupulus* L.) Production Areas of Washington State ». *Plant Health Progress*. 8 p.
- Ecophyto. 2016. « Le plan Ecophyto : un bilan en demi-teinte ». [En ligne] [http://rhone-alpes.synagri.com/synagri/pj.nsf/TECHPJPARCLEF/16619/\\$File/Ecophyto%20AURA%20Bilan.pdf?OpenElement](http://rhone-alpes.synagri.com/synagri/pj.nsf/TECHPJPARCLEF/16619/$File/Ecophyto%20AURA%20Bilan.pdf?OpenElement).
- Edwardson JR. 1952. « Hops—Their Botany, History, Production and Utilization ». *Economic Botany* 6 (2): 160-175.
- European Medicines Agency. 2014. « Community herbal monograph on *Humulus lupulus* L. ». [En ligne] [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_-\\_Community\\_herbal\\_monograph/2014/08/WC500170937.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2014/08/WC500170937.pdf).
- European Medicines Agency. 2015. *Guideline on bioanalytical method validation*. [En ligne] [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf).
- Favre C, Ghedira K, Goetz P, Lejeune R et Staub H. 2007. « *Humulus lupulus* L. ». *Phytothérapie* 5 (2): 86-89.
- Farag MA, Porzel A, Schmidt J et Wessjohann LA. 2012. « Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics ». *Metabolomics* 8 (3): 492-507.
- Farag MA et Wessjohann LA. 2013. « Cytotoxic effect of commercial *Humulus lupulus* L. (hop) preparations - In comparison to its metabolomic fingerprint » 4 (4): 417-421.
- Faragó J, Kluciarovsky F et Psenakova I. 2011. « Bioactive Polyphenols and Flavonoids in Cell Cultures of Hops (*Humulus lupulus* L.) ». *Current Opinion in Biotechnology* 22: S141.
- Faragó J, Psenàková I et Natàlia F. 2009. « The Use of Biotechnology in Hop (*Humulus Lupulus* L.) Improvement ». *Nova Biotechnologica* 9 (3): 279-293.
- Fischer N, Weinreich B, Nitz S et Drawert F. 1991. « Applications of high-speed counter-current chromatography for the separation and isolation of natural products ». *Journal of Chromatography A* 538 (1): 193-202.
- Fones H et Gurr S. 2015. « The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective ». *Fungal Genetics and Biology* 79: 3-7.
- Forino M, Pace S, Chianese G, Santagostini L, Werner M, Weinigel C, Rummler S, Fico G, Werz O et Tagliatalata-Scafati O. 2016. « Humudifucol and Bioactive Prenylated Polyphenols from Hops (*Humulus lupulus* Cv. "Cascade") ». *Journal of Natural Products* 79 (3): 590-97.
- Frölich S, Schubert C, Bienzle U et Jenett-Siems K. 2005. « *In Vitro* Antiplasmodial Activity of Prenylated Chalcone Derivatives of Hops (*Humulus lupulus*) and Their Interaction with Haemin ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55 (6): 883-887.
- Gatica-Arias AM, Amma N, Stanke M et Weber G. 2012. « *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation of Hop (*Humulus lupulus* L. Cv. Tettmanger): Establishment of a System for Functional Evaluation of Genes ». *Brewing Science* 65 (7): 91-95.
- Gent DH, Massie ST, Twomey MC et Wolfenbarger SN. 2017. « Adaptation to Partial Resistance to Powdery Mildew in the Hop Cultivar Cascade by *Podosphaera macularis* ». *Plant Disease* 101 (6): 874-881.
- Gerhäuser C. 2005a. « Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents ». *European Journal of Cancer* 41 (13): 1941-1954.
- Gerhäuser C. 2005b. « Broad Spectrum Antiinfective Potential of Xanthohumol from Hop (*Humulus lupulus* L.) in Comparison with Activities of Other Hop Constituents and Xanthohumol Metabolites » *Molecular Nutrition & Food Research* 49 (9): 827-831.
- Gibbons S. 2008. « Phytochemicals for Bacterial Resistance - Strengths, Weaknesses and Opportunities ». *Planta Medica* 74 (6): 594-602.
- Gibbons S et Udo EE. 2000. « The Effect of Reserpine, a Modulator of Multidrug Efflux Pumps, on the *in Vitro* Activity of Tetracycline against Clinical Isolates of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Possessing the Tet(K) Determinant ». *Phytotherapy Research* 14 (2): 139-140.
- Gibert C et Trouillet JL. 2001. « Traitement des infections à staphylocoques résistants à la méticilline : optimisation des traitements disponibles ou utilisation de nouvelles molécules ? ». *Réanimation* 10: 329-335.
- Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H et Wecke J. 1998. « Staphylococcal Cell Wall: Morphogenesis and Fatal Variations in

- the Presence of Penicillin ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (4): 1371-1414.
- Girard B. 1996. « Retention index calculation using Kovats constant model for linear temperature-programmed gas chromatography ». *Journal of Chromatography A* 721 (2): 279-288.
- Grasswitz TR et James DG. 2008. « Biology, phenology and control of *Hypena humuli* (Lepidoptera: Noctuidae), an emerging pest of hops (*Humulus lupulus*) (Cannabaceae) in the USA ». *International Journal of Pest Management* 54 (4): 333-338.
- Green CP. 1997. « Comparison of Tettnanger, Saaz, Hallertau and Fuggle Hops Grown in the Usa, Australia and Europe ». *Journal of the Institute of Brewing* 103 (4): 239-243.
- Guay GG, Khan SA et Rothstein DM. 1993. « The Tet(K) Gene of Plasmid PT181 of *Staphylococcus Aureus* Encodes an Efflux Protein That Contains 14 Transmembrane Helices ». *Plasmid* 30 (2): 163-166.
- Guo J, Nikolic D, Chadwick LR, Pauli GF et van Breemen RB. 2006. « Identification of Human Hepatic Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of 8-Prenylnaringenin and Isoxanthohumol from Hops (*Humulus Lupulus* L.) ». *Drug Metabolism and Disposition* 34 (7): 1152-1159.
- Habrylo O. 2011. « Une E.S.T. (Expressed Sequence Tag) conduit à la caractérisation, chez le houblon (*Humulus lupulus*), de trois inhibiteurs de xyloglucanase dont l'expression est ». Thèse, Université de Strasbourg.
- Hänsel R et Wagener HH. 1967. « Versuche, sedativ-hypnotische Wirkstoffe im Hopfen nachzuweisen ». *Arzneim Forsch, Drug research* 17: 79-81.
- Hänsel R, Wohlfart R et Schmidt H. 1982. « The sedativ-hypnotic principle of hops ». *Planta Medica* 45 (4): 224-28.
- Hanske L, Loh G, Sczesny S, Blaut M et Braune A. 2010. « Recovery and Metabolism of Xanthohumol in Germ-Free and Human Microbiota-Associated Rats ». *Molecular Nutrition and Food Research* 54 (10): 1405-1413.
- Hartman BJ et Tomasz A. 1984. « Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. ». *Journal of Bacteriology* 158 (2): 513-516.
- Heinrich M, Barnes J, Prieto Garcia JM, Gibbons S et Williamson EM. 2018. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 3<sup>ème</sup> édition. [En ligne] <https://www.bookdepository.com/Fundamentals-Pharmacognosy-Phytotherapy-International-Edition-Michael-Heinrich/9780702070303>.
- Hemaiswarya S, Kumar Kruthiventi A et Doble M. 2008. « Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases ». *Phytomedicine* 15 (8): 639-652.
- Herath W, Ferreira D, Khan SI et Khan IA. 2003. « Identification and Biological Activity of Microbial Metabolites of Xanthohumol ». *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 51 (11): 1237-1240.
- Hermans-Lokkerbol ACJ, Hoek AC et Verpoorte R. 1997. « Preparative separation of bitter acids from hop extracts by centrifugal partition chromatography ». *Journal of Chromatography A* 771 (1): 71-79.
- Hermans-Lokkerbol ACJ et Verpoorte R. 1994a. « Preparative separation and isolation of three  $\alpha$  bitter acids from hop, *Humulus lupulus* L., by centrifugal partition chromatography ». *Journal of Chromatography A* 664 (1): 45-53.
- Hermans-Lokkerbol ACJ et Verpoorte R. 1994b. « Development and validation of a high-performance liquid chromatography system for the analysis of hop bitter acids ». *Journal of Chromatography A* 669 (1): 65-73.
- Hernández AF, Gil F et Lacasaña M. 2017. « Toxicological Interactions of Pesticide Mixtures: An Update ». *Archives of Toxicology* 91 (10): 3211-3223.
- Herth, Antoine. 2011. « Le bio-contrôle pour la protection des cultures : 15 recommandations pour soutenir les technologies vertes ». [En ligne] <http://agriculture.gouv.fr/le-bio-controle-pour-la-protection-des-cultures-15-recommandations-pour-soutenir-les-technologies>.
- Ho YC, Liu CH, Chen CN, Duan KJ et Lin MT. 2008. « Inhibitory effects of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) on human hepatocellular carcinoma cell lines ». *Phytotherapy Research* 22 (11): 1465-1468.
- Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Guerin PJ et Piddock LJV. 2016. « Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance ». *The Lancet* 387 (10014): 176-187.
- Horlemann C, Schwekendiek A, Höhnle M et Weber G. 2003. « Regeneration and Agrobacterium-Mediated Transformation of Hop (*Humulus lupulus* L.) ». *Plant Cell Reports* 22 (3): 210-217.

- Hsieh MH, Yu CM, Yu VL et Chow JW. 1993. « Synergy assessed by checkerboard. A critical analysis ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 16 (4): 343-349.
- Hubert J, Plé K, Hamzaoui M et Renault JH. 2013. « Polyphenol purification by solid support-free liquid-liquid chromatography (CCC, CPC) ». *Natural Products*: 2145-2172.
- Hughes PS. 1996. « Preparative Regime for the Purification of Bitter Acids Derived from Hops (*Humulus lupulus* L.) ». *Journal of Chromatography A* 731 (1-2): 327-330.
- Hussong R, Frank N, Knauff J, Ittrich C, Owen R, Becker H et Gerhäuser C. 2005. « A Safety Study of Oral Xanthohumol Administration and Its Influence on Fertility in Sprague Dawley Rats ». *Molecular Nutrition & Food Research* 49 (9): 861-867.
- Huszczka E et Bartmańska A. 2008. « The Implication of Yeast in Debittering of Spent Hops ». *Enzyme and Microbial Technology* 42 (5): 421-425.
- Huszczka E, Bartmańska A, Anioł M, Maczka W, Zolnierczyk A et Wawrzęńczyk C. 2008. « Degradation of hop bitter acids by fungi ». *Waste Management* 28 (8): 1406-1410.
- Intelmann D, Haseleu G et Hofmann T. 2009. « LC-MS/MS Quantitation of Hop-Derived Bitter Compounds in Beer Using the ECHO Technique ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (4): 1172-1182.
- Isman MB. 2000. « Plant essential oils for pest and disease management ». *Crop Protection*, XIV<sup>th</sup> International Plant Protection Congress, 19 (8-10): 603-608.
- Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, de Lencastre H, Perreten V, Holden MTG, Coleman DC, Goering R, Giffard PM, Skov RL, Zhang K, Westh H, O'Brien F, Tenover FC, Oliveira DC, Boyle-Vavra S, Laurent F, Kearns AM, Kreiswirth B, Ko KS, Grundmann H, Sollid JE, John JF, Daum R, Soderquist B et Buist G. 2012. « Guidelines for Reporting Novel MecA Gene Homologues ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (10): 4997-4999.
- Ito Y. 1987. « High-speed countercurrent chromatography ». *Nature* 326 (6111): 419-420.
- Ito Y. 2005. « Golden Rules and Pitfalls in Selecting Optimum Conditions for High-Speed Counter-Current Chromatography ». *Journal of Chromatography A* 1065 (2): 145-168.
- Jabran K, Mahajan G, Sardana V et Chauhan BS. 2015. « Allelopathy for weed control in agricultural systems ». *Crop Protection* 72: 57-65.
- Jelinek L, Sneberger M, Karabin M et Dostalek P. 2010. « Comparison of Czech Hop Cultivars Based on their Contents of Secondary Metabolites ». *Czech Journal of Food Sciences* 28 (4): 309-316.
- Jerkovic V et Collin S. 2007. « Occurrence of Resveratrol and Piceid in American and European Hop Cones ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (21): 8754-9758.
- Jevons MP. 1961. « "Celbenin" - resistant Staphylococci ». In *British Medical Journal*, 1:124-125.
- Jirovetz L, Bail S, Buchbauer G, Denkova Z, Slavchev A, Stoyanova A, Schmidt E et Geissler M. 2006. « Antimicrobial testings, gas chromatographic analysis and olfactory evaluation of an essential oil of hop cones (*Humulus lupulus* L.) from Bavaria and some of its main compounds ». *Scientia Pharmaceutica* 74: 189-201.
- Johnson EA et Gerhard JH. 2001. Antimicrobial activity of hops extract against *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile* and *Helicobacter pylori*. US 6251461 B1, issued 2001.
- Kaatz GW et Seo SM. 1995. « Inducible NorA-Mediated Multidrug Resistance in *Staphylococcus aureus*. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (12): 2650-2655.
- Kac J, Plazar J, Mlinarič A, Žegura B, Lah TT et Filipič M. 2008. « Antimutagenicity of hops (*Humulus lupulus* L.): bioassay-directed fractionation and isolation of xanthohumol ». *Phytomedicine* 15 (3): 216-220.
- Kamiński DM, Gawęda K, Arczewska M, Senczyna B et Gagoś M. 2017. « A kinetic study of xanthohumol cyclization to isoxanthohumol – A role of water ». *Journal of Molecular Structure* 1139: 10-16.
- Kang SS, Kim JG, Lee TH et Oh KB. 2006. « Flavonols Inhibit Sortases and Sortase-Mediated *Staphylococcus aureus* Clumping to Fibrinogen ». *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29 (8): 1751-1755.
- Kao TH et Wu GY. 2013. « Simultaneous determination of prenylflavonoid and hop bitter acid in beer lee by HPLC-DAD-MS ». *Food Chemistry* 141 (2): 1218-1226.

- Kao TH. 2018. « Health Potential for Beer Brewing Byproducts ». In *Current Topics on Superfoods*, Naofumi Shiomi. 18 p.
- Karabín M, Hudcová T, Jelínek L et Dostálek P. 2015. « Biotransformations and biological activities of hop flavonoids ». *Biotechnology Advances*, BioTech 2014 and 6<sup>th</sup> Czech-Swiss Biotechnology Symposium, 33 (6): 1063–1090.
- Karabín L, Hudcová T, Jelínek L et Dostálek P. 2016. « Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15 (3): 542-567.
- Karabín M, Jelínek L, Kinčl T, Hudcová T, Kotlíková B et Dostálek P. 2013. « New Approach to the Production of Xanthohumol-Enriched Beers: Production of Xanthohumol-Enriched Beers ». *Journal of the Institute of Brewing* 119: 98-102.
- Kedzierski B, Kukuła-Koch W et Głowniak K. 2014. « Application of CPC and related methods for the isolation of natural substances—a review ». *Acta Poloniae Pharmaceutica* 71 (2): 223-227.
- Kelesidis T et Falagas ME. 2015. « Substandard/Counterfeit Antimicrobial Drugs ». *Clinical Microbiology Reviews* 28 (2): 443-464.
- Kishimoto T, Kobayashi M, Yako N, Iida A et Wanikawa A. 2008. « Comparison of 4-Mercapto-4-Methylpentan-2-One Contents in Hop Cultivars from Different Growing Regions ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (3): 1051-1057.
- Koch W et Heim G. 1953. « Estrogens in hops and beer; preliminary report ». *Munchener Medizinische Wochenschrift* 95 (31-32): 845-854.
- Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Navarro Torné A, Witte W et Friedrich AW. 2010. « Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe ». [En ligne] <http://edoc.rki.de/docviews/abstract.php?id=1027>.
- de Koning JA, Hogenboom AC, Lacker T, Strohschein S, Albert K et Brinkman UATH. 1998. « On-line trace enrichment in hyphenated liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy ». *Journal of Chromatography A* 813: 55-61.
- Konstantinidou-Doltsinis S, Markellou E, Kasselaki AM, Fanouraki MN, Koumaki CM, Schmitt A, Liopa-Tsakalidis A et Malathrakis NE. 2006. « Efficacy of Milsana, a Formulated Plant Extract from *Reynoutria Sachalinensis*, against Powdery Mildew of Tomato *Leveillula Taurica* ». *BioControl* 51 (3): 375-392.
- Kosowka-Shick K, McGhee PL et Appelbaum PC. 2010. « Affinity of Ceftaroline and Other  $\beta$ -Lactams for Penicillin-Binding Proteins from *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(5): 1670-1677.
- Kovačević M et Kač M. 2002. « Determination and verification of hop varieties by analysis of essential oils ». *Food Chemistry* 77 (4): 489-494.
- Krofta K, Poustka J, Nováková K et Hajšlová J. 2005. « Contents of prenylflavonoids in czech hops and beers ». *Acta Horticulturae* 668: 201-206.
- Kuehbeck F, Mueller M, Back W, Kurz T et Krottenthaler M. 2007. « Effect of Hot Trub and Particle Addition on Fermentation Performance of *Saccharomyces cerevisiae* ». *Enzyme and Microbial Technology* 41 (6-7): 711-720.
- Kyrou I, Christou A, Panagiotakos D, Stefanaki C, Skenderi K, Katsana K et Tsigos C. 2017. « Effects of a hops (*Humulus lupulus* L.) dry extract supplement on self-reported depression, anxiety and stress levels in apparently healthy young adults: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover pilot study ». *Hormones - International Journal of Endocrinology and Metabolism* 16 (2): 171-180.
- Langezaal CR, Chandra A et Scheffer JJC. 1992. « Antimicrobial screening of essential oils and extracts of some *Humulus lupulus* L. cultivars ». *Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition* 14 (6): 353-356.
- Langezaal CR et Scheffer JJC. 1992. « Initiation and Growth Characterization of Some Hop Cell Suspension Cultures ». *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30 (2): 159-164.
- Lanoue A. 2002. « Étude de la biosynthèse et de la production d'alcaloïdes tropaniques par les racines transgéniques de *Datura* ». Thèse, Université de Picardie Jules Verne.
- Larson AE, Yu RRY, Lee OA, Price S, Haas GJ et Johnson EA. 1996. « Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food ». *International Journal of Food Microbiology* 33 (2): 195-207.

- Laxminarayan R, Matsoso P, Pant S, Brower C, Røttingen JA, Klugman K et Davies S. 2016. « Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge ». *The Lancet* 387 (10014): 168-175.
- Legette LC, Karnpracha C, Reed RL, Choi J, Bobe G, Christensen JM, Rodriguez-Proteau R, Purnell J et Stevens JF. 2014. « Human pharmacokinetics of xanthohumol, an anti-hyperglycemic flavonoid from hops ». *Molecular Nutrition & Food Research* 58 (2): 248-255.
- Legette LC, Moreno Luna AY, Reed RL, Miranda CL, Bobe G, Proteau RR et Stevens JF. 2013. « Xanthohumol lowers body weight and fasting plasma glucose in obese male Zucker fa/fa rats ». *Phytochemistry* 91: 236-241.
- Legette LC, Ma L, Reed RL, Miranda CL, Christensen JM, Rodriguez-Proteau M et Stevens JF. 2012. « Pharmacokinetics of xanthohumol and metabolites in rats after oral and intravenous administration ». *Molecular Nutrition & Food Research* 56 (3): 466-474.
- Lencastre H et Tomasz A. 1994. « Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38 (11): 2590-2598.
- Lewis K. 2008. « Multidrug tolerance of biofilms and persister cells ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 322: 107-131.
- Li H, Ban Z, Qin H, Ma L, King AJ et Wang G. 2015. « A Heteromeric Membrane-Bound Prenyltransferase Complex from Hop Catalyzes Three Sequential Aromatic Prenylations in the Bitter Acid Pathway ». *Plant Physiology* 167 (3): 650-659.
- Li HJ et Deinzer ML. 2006. « Structural Identification and Distribution of Proanthocyanidins in 13 Different Hops ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (11): 4048-4056.
- Lim D et Strynadka NCJ. 2002. « Structural Basis for the  $\beta$ -Lactam Resistance of PBP2a from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ». *Nature Structural Biology* 9 (11): 870-876.
- Lipsky BA, Peters EJG, Senneville E, Berendt AR, Embil JM, Lavery LA, Urbančič-Rovan V et Jeffcoate WJ. 2012. « Expert Opinion on the Management of Infections in the Diabetic Foot ». *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 28 (S1): 163-178.
- Lipsky BA et Hoey C. 2009. « Topical Antimicrobial Therapy for Treating Chronic Wounds ». *Clinical Infectious Diseases* 49 (10): 1541-1549.
- Lorenzana A, De Mendoza AH, Victoria Seco M, Piedad Campelo M et Casquero PA. 2017. « Within-plant Distribution of *Phorodon Humuli* (Hemiptera: Aphididae) and Natural Enemies on Hops with Implications for Sampling and Management ». *Entomological Science* 20 (1): 443-450.
- Lou S, Zheng YM, Liu SL, Qiu J, Han Q, Li N, Zhu Q, Zhang P, Yang C et Liu Z. 2014. « Inhibition of Hepatitis C Virus Replication In Vitro by Xanthohumol, A Natural Product Present in Hops ». *Planta Medica* 80 (02/03): 171-176.
- Lu Y, Sun C, Wang Y et Pan Y. 2007. « Two-Dimensional Counter-Current Chromatography for the Preparative Separation of Prenylflavonoids from *Artocarpus Altilis* ». *Journal of Chromatography A* 1151 (1-2): 31-36.
- Luzak B, Golanski J, Przygodzki T, Boncler M, Sosnowska D, Oszmianski J, Watala C et Rozalski M. 2016. « Extract from spent hop (*Humulus lupulus* L.) reduces blood platelet aggregation and improves anticoagulant activity of human endothelial cells *in vitro* ». *Journal of Functional Foods* 22: 257-269.
- Ma XC, Sun C, Huang SS, Wang JK, Zhang BJ, Li FY, Wang G, Deng S et Cui J. 2010. « Preparative Isolation and Purification of Four Prenylflavanones from Microbial Biotransformation of Kurarinone by High-Speed Counter-Current Chromatography ». *Separation and Purification Technology* 76 (2): 140-145.
- Machado JC, Faria MA, Melo A et Ferreira IMPLVO. 2017. « Antiproliferative effect of beer and hop compounds against human colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells ». *Journal of Functional Foods* 36: 255-261.
- Mack D, Becker P, Chatterjee I, Dobinsky S, Knobloch JKM, Peters G, Rohde H et Herrmann M. « Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses ». *International Journal of Medical Microbiology* 294(2-3): 203-212.
- MacKenzie FM et Gould IM. 1993. « The post-antibiotic effect ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 32 (4): 519-537.
- Magalhães PJ, Vieira JS, Gonçalves LM, Pacheco JG, Guido LF et Barros AA. 2010. « Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray tandem mass spectrometry ». *Journal of Chromatography A*, 34<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 1217 (19): 3258-3268.

- Magalhães PJ, Vieira JS, Gonçalves LM, Pacheco JG, Guido LF et Barros AA. 2010. « Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpyrrolidone : Characterization by high-performance liquid chromatography-diode-array detection-electrospray tandem mass spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1217: 3258-3268.
- Maietti A, Brighenti V, Bonetti G, Tedeschi P, Prencipe FP, Benvenuti S, Brandolini V et Pellati F. 2017. « Metabolite profiling of flavonols and in vitro antioxidant activity of young shoots of wild *Humulus lupulus* L. (hop) ». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 142: 28-34.
- Malkomes HP. 2006. « Allelopathy of middle European agricultural weeds - an overview ». *Journal of Plant Diseases and Protection*, 435-445.
- Maltonne. 2016. « Les maladies et prédateurs du houblon et leur traitement ». [En ligne] [www.maltonne.be](http://www.maltonne.be). <https://maltonne.files.wordpress.com/2016/05/les-maladies-du-houblon-et-leur-traitement.pdf>.
- Marianelli L, Paoli F, Torrini G, Mazza G, Benvenuti C, Binazzi F, Sabbatini Peverieri G, Bosio G, Venanzio D, Giacometto E, Priori S, Koppenhöfer AM et Roversi PF. 2018. « Entomopathogenic Nematodes as Potential Biological Control Agents of *Popillia japonica* (Coleoptera, Scarabaeidae) in Piedmont Region (Italy) ». *Journal of Applied Entomology* 142 (3): 311-318.
- Marques HMC. 2010. « A Review on Cyclodextrin Encapsulation of Essential Oils and Volatiles ». *Flavour and Fragrance Journal* 25 (5): 313-326.
- Marston A et Hostettmann K. 2006. « Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis ». *Journal of Chromatography A* 1112 (1-2): 181-194.
- Martorana D. 2010. « The Short and Bitter History of Hops ». *PhillyBeerScene* (blog). [En ligne] <http://www.beerscenemag.com/2010/04/the-short-and-bitter-history-of-hops/>.
- McDade MC et Christians NE. 2000. « Corn Gluten Meal—a Natural Preemergence Herbicide: Effect on Vegetable Seedling Survival and Weed Cover ». *American Journal of Alternative Agriculture* 15 (04): 189-191.
- McGowan JE. 1983. « Antimicrobial Resistance in Hospital Organisms and Its Relation to Antibiotic Use ». *Clinical Infectious Diseases* 5 (6): 1033-1048.
- Menet MC. 2011. « Principes de la spectrométrie de masse ». *Revue Francophone des Laboratoires, Spectrométrie de masse*, 437: 41-53.
- Meyer E, Gastmeier P, Deja M et Schwab F. « Antibiotic consumption and resistance: Data from Europe and Germany ». *International Journal of Medical Microbiology* 303: 388-395.
- Milligan SRJ, Kalita JC, Heyerick A, Rong H, De Cooman L et De Keukeleire D. 1999. « Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84 (6): 2249-2252.
- Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt et Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie. 2015. « Plan Ecophyto II ». [En ligne] [http://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/151022\\_ecophyto.pdf](http://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/151022_ecophyto.pdf).
- Ministère de l'agriculture et de l'alimentation. 2016. « Plan EcoAntibio 2012-2017 : lutte contre l'antibiorésistance Alim'agri ». [En ligne] <http://agriculture.gouv.fr/plan-ecoantibio-2012-2017-lutte-contre-lantibioresistance>.
- Ministère de l'agriculture et de l'alimentation. 2018. « Ecoantibio 2 : plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire (2017 - 2021) ». [En ligne] <http://agriculture.gouv.fr/le-plan-ecoantibio-2-2017-2021>.
- Miranda CL, Stevens JF, Ivanov V, McCall M, Frei B, Deinzer ML et Buhler DR. 2000. « Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (9): 3876-3884.
- Mishra AK, Selvaraj Duraisamy G, Matoušek J, Radisek S, Javornik B et Jakse J. 2016. « Identification and characterization of microRNAs in *Humulus lupulus* using high-throughput sequencing and their response to Citrus bark cracking viroid (CBCVd) infection ». *BMC Genomics* 17: 919-938.
- Mizobuchi S et Sato Y. 1985. « Antifungal Activities of Hop Bitter Resins and Related Compounds ». *Agricultural and Biological Chemistry* 49 (2): 399-403.
- Monzote L, Lackova A, Staniek K, Steinbauer S, Pichler G, Jäger W et Gille L. 2017. « The Antileishmanial Activity of Xanthohumol Is Mediated by Mitochondrial Inhibition ». *Parasitology* 144 (06): 747-759.



- Moreira MM, Carvalho AM, Valente IM, Gonçalves LM, Rodrigues JA, Barros AA et Guido LF. 2011. « Novel Application of Square-Wave Adsorptive-Stripping Voltammetry for the Determination of Xanthohumol in Spent Hops ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (14): 7654-758.
- Mouratidis PXE, Colston KW, Tucknott ML, Tyrrell E et Pirianov G. 2013. « An Investigation into the Anticancer Effects and Mechanism of Action of Hop  $\beta$ -Acid Lupulone and Its Natural and Synthetic Derivatives in Prostate Cancer Cells ». *Nutrition and Cancer* 65 (7): 1086-1092.
- Mundy L, Pendry B et Rahman M. 2016. « Antimicrobial resistance and synergy in herbal medicine ». *Journal of Herbal Medicine* 6 (2): 53-58.
- Murakami A, Darby P, Javornik B, Pais MSS, Seigner E, Lutz A et Svoboda P. 2003. « Molecular markers for powdery mildew (*Sphaerotheca humuli*) resistance in hops ». *Molecular evolution of hops*, *Humulus lupulus*. Proceedings of the Scientific Commission, International Hop Growers Convention, 8-123
- Nagel J, Culley LK, Lu Y, Liu E, Matthews PD, Stevens JF et Page JE. 2008. « EST analysis of hop glandular trichomes identifies an O-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol ». *The Plant Cell* 20 (1): 186-200.
- Natarajan P, Katta S, Andrei I, Babu Rao Ambati V, Leonida M, et G. J. Haas. 2008. « Positive antibacterial co-action between hop (*Humulus lupulus*) constituents and selected antibiotics ». *Phytomedicine* 15 (3): 194-201.
- Natsume S, Takagi H, Shiraishi H, Murata M, Toyonaga H, Patzak J, Takagi M, Yaegashi H, Uemura A, Mitsuoka C, Yoshida K, Krofta K, Satake H, Terauchi R et Ono E. 2015. « The Draft Genome of Hop (*Humulus lupulus*), an Essence for Brewing ». *Plant and Cell Physiology* 56 (3): 428-41.
- Negrão R, Duarte D, Costa R et Soares R. 2013. « Isoxanthohumol Modulates Angiogenesis and Inflammation via Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, Tumor Necrosis Factor Alpha and Nuclear Factor Kappa B Pathways: Isoxanthohumol Modulates Angiogenesis and Inflammation ». *BioFactors* 39 (6): 608-622.
- Nemati M, Hermans K, Lipinska U, Denis O, Deplano A, Struelens M, Devriese LA, Pasmans F et Haesebrouck F. 2008. « Antimicrobial Resistance of Old and Recent Staphylococcus aureus Isolates from Poultry: First Detection of Livestock-Associated Methicillin-Resistant Strain ST398 ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (10): 3817-3819.
- Nickerson GB et Williams PA. 1986. « Varietal Differences in the Proportions of Cohumulone, Adhumulone, and Humulone in Hops ». *The American Society of Brewing Chemists* 44 (2): 91-94.
- Nickerson GB, Williams PA et Haunold A. 1988. « Composition of Male Hop Oil ». *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 46 (1): 14-17.
- Nicodème JD, Nicodème EP, Zingg M, Uçkay I, Malaarne S et Suva D. 2015. « Pied diabétique infecté : du diagnostic à la prise en charge ». *Revue Médicale Suisse*, n° 477. [En ligne] <https://www.revmed.ch/RMS/2015/RMS-N-477/Pied-diabetique-infecte-du-diagnostic-a-la-prise-en-charge>.
- Nikolic D, Li Y, Chadwick LR, Grubjesic S, Schwab P, Metz P et van Breemen RB. 2004. « Metabolism of 8-Prenylnaringenin, a Potent Phytoestrogen from Hops (*Humulus Lupulus*), by Human Liver Microsomes ». *Drug Metabolism and Disposition* 32 (2): 272-279.
- Nookandesh A, Frank N, Steiner F, Ellinger R, Schneider B, Gerhäuser C et Becker H. 2004. « Xanthohumol metabolites in faeces of rats ». *Phytochemistry* 65 (5): 561-570.
- Nozawa H. 2005. « Xanthohumol, the chalcone from beer hops (*Humulus lupulus* L.), is the ligand for farnesoid X receptor and ameliorates lipid and glucose metabolism in KK-Ay mice ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336 (3): 754-761.
- Nozawa H, Nakao W, Zhao F et Kondo K. 2005. « Dietary Supplement of Isohumulones Inhibits the Formation of Aberrant Crypt Foci with a Concomitant Decrease in Prostaglandin E2 Level in Rat Colon ». *Molecular Nutrition & Food Research* 49 (8): 772-778.
- Oberbauer E, Urmann C, Steffenhagen C, Bieler L, Brunner D, Furtner D, Humpel D, Bäumer B, Bandtlow C, Couillard-Despres S, Rivera FJ, Riepl H et Aigner L. 2013. « Chroman-like Cyclic Prenylflavonoids Promote Neuronal Differentiation and Neurite Outgrowth and Are Neuroprotective ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24 (11): 1953-1962.
- Oladokun O, Tarrega A, James S, Smart K, Hort J et Cook D. 2016. « The impact of hop bitter acid and polyphenol profiles on the perceived bitterness of beer ». *Food Chemistry* 205: 212-220.
- Oladokun O, James S, Cowley T, Smart K, Hort J et Cook D. 2017. « Dry-Hopping: the effect of temperature and hop variety on the bittering profiles and properties of resultant beers ». *Brewing Science* 70: 187-196.

- OMS. 2017 « L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques ». [En ligne] <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/fr/>.
- Ortega AB, Skerget M et Knez Z. 2016. « Separation of xanthohumol from hop extracts by supercritical fluid chromatography ». *Chemical Engineering Research & Design* 109: 335-345.
- Paleos J. 1969. « Adsorption from aqueous and nonaqueous solutions on hydrophobic and hydrophilic high surface-area copolymers ». *Journal of Colloid and Interface Science* 31 (1): 7-18.
- Pang Y, Nikolic D, Zhu D, Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR et van Breemen RB. 2007. « Binding of the Hop (*Humulus lupulus* L.) Chalcone Xanthohumol to Cytosolic Proteins in Caco-2 Intestinal Epithelial Cells ». *Molecular Nutrition & Food Research* 51 (7): 872-879.
- Patzak J, Karel K, Alena H et Vladimír N. 2015. « Number and size of lupulin glands, glandular trichomes of hop (*Humulus lupulus* L.), play a key role in contents of bitter acids and polyphenols in hop cone ». *International Journal of Food Science & Technology* 50 (8): 1864-1872.
- Peacock SJ et Paterson GK. 2015. « Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* ». *Annual Review of Biochemistry* 84: 577-601.
- Péchat L, Rivière C et Méillon JM. 2011. « Purification et identification structurale d'hétérosides de polyphénols de *Morus alba* L.: Mise au point de tests in vitro pour l'évaluation de leur potentiel inhibiteur sur l'activité gélatinolytique de la MMP-9 ». Rapport de stage.
- Possemiers S, Bolca S, Grootaert C, Heyerick A, Decroos K, Dhooge W, De Keukeleire D, Rabot S, Verstraete W et de Wiele TV. 2006. « The prenylflavonoid isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) is activated into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in the human intestine ». *The Journal of Nutrition* 136 (7): 1862-1867.
- Possemiers S, Heyerick A, Robbens V, De Keukeleire D et Verstraete W. 2005. « Activation of Proestrogens from Hops (*Humulus lupulus* L.) by Intestinal Microbiota; Conversion of Isoxanthohumol into 8-Prenylnaringenin ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (16): 6281-6288.
- Possemiers S, Rabot S, Espín JC, Bruneau A, Philippe C, González-Sarrías A, Heyerick A, Tomás-Barberán FA, De Keukeleire D et Verstraete W. 2008. « *Eubacterium limosum* activates isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in rat intestine ». *The Journal of Nutrition* 138 (7): 1310-1316.
- Prencipe FP, Brighenti V, Rodolfi M, Mongelli A, dall'Asta C, Ganino T, Bruni R et Pellati F. 2014. « Development of a new high-performance liquid chromatography method with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection for the metabolite fingerprinting of bioactive compounds in *Humulus lupulus* L. ». *Journal of Chromatography A* 1349: 50-59.
- Progar V, Jakse J, Stajner V, Radisek S, Javornik S et Berne S. 2017. « Comparative Transcriptional Analysis of Hop Responses to Infection with *Verticillium Nonalfae* ». *Plant Cell Reports* 36 (10): 1599-1613.
- Pyun MS et Shin S. 2006. « Antifungal Effects of the Volatile Oils from *Allium* Plants against *Trichophyton* Species and Synergism of the Oils with Ketoconazole ». *Phytomedicine* 13 (6): 394-400.
- Rad M, Hümpel M, Schaefer O, Schoemaker RC, Schleuning WD, Cohen AF et Burggraaf J. 2006. « Pharmacokinetics and Systemic Endocrine Effects of the Phyto-Oestrogen 8-Prenylnaringenin after Single Oral Doses to Postmenopausal Women ». *British Journal of Clinical Pharmacology* 62 (3): 288-296.
- Raina S, De Vizio D, Odell M, Clements M, Vanhulle S et Keshavarz T. 2009. « Microbial Quorum Sensing: A Tool or a Target for Antimicrobial Therapy? ». *Biotechnology and Applied Biochemistry* 54 (2): 65-84.
- Rancán L, Paredes SD, García I, Muñoz P, García C, López de Hontanar G, de la Fuente M, Vara E et Tresguerres JAF. 2017. « Protective effect of xanthohumol against age-related brain damage ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 49: 133-140.
- Reeb-Whitaker CK et Bonauto DK. 2014. « Respiratory Disease Associated with Occupational Inhalation to Hop (*Humulus lupulus*) during Harvest and Processing ». *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 113 (5): 534-538.
- Regnault-Roger C. 2006. « Les substances naturelles d'origine végétale : Qu'elles soient biospesticides ou éliciteurs (SDM), quelles sont leurs perspectives dans la protection des cultures ? ». *Phytoma-La Défense des végétaux* 591: 14-18.
- Renard-Merlier D, Randoux B, Nowak E, Farcy F, Durand R et Reignault P. 2007. « Iodine, Salicylic Acid, Heptanoyl Salicylic Acid and Trehalose Exhibit Different Efficacies and Defence Targets during a Wheat/Powdery Mildew

Interaction ». *Phytochemistry* 68 (8): 1156-1164.

Renault JH, Voutquenne L, Caron C, Zeches-Hanrot M, Berwanger S et Becker H. 2006. « Purification of Xanthohumol from *Humulus lupulus* by Centrifugal Partition Chromatography Using an Original Acetone Based Solvent Scale ». *Journal of Liquid Chromatography & Related technologies* 29 (5): 761-771.

Ríos JL et Recio MC. 2005. « Medicinal Plants and Antimicrobial Activity ». *Journal of Ethnopharmacology* 100 (1-2): 80-84.

Rodriguez-Proteau RJE, Mata C, Miranda CL, Fan Y, Brown JJ et Buhler DR. 2006. « Plant polyphenols and multidrug resistance: Effects of dietary flavonoids on drug transporters in Caco-2 and MDCKII-MDR1 cell transport models ». *Xenobiotica* 36 (1): 41-58.

Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Baumberg S et Wootton JC. 1990. « Inducible Erythromycin Resistance in Staphylococci Is Encoded by a Member of the ATP-Binding Transport Super-Gene Family ». *Molecular Microbiology* 4 (7): 1207-1214.

Rossini F, Loreti P, Provenzano ME, De Santis D et Ruggeri R. 2016. « Agronomic Performance and Beer Quality Assessment of Twenty Hop Cultivars Grown in Central Italy ». *Italian Journal of Agronomy* 11 (3): 180-187.

Roy AT, Leggett G et Koutoulis A. 2001. « Development of a Shoot Multiplication System for Hop (*Humulus lupulus* L.) ». *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37 (1): 79-83.

Rozalski M, Micota B, Sadowska B, Stochmal A, Jedrejek D, Wieckowska-Szakiel M, Rozalska M. 2013. « Antiadherent and Antibiofilm Activity of *Humulus lupulus* L. Derived Products: New Pharmacological Properties ». *BioMed Research International* 2013: 7 p.

Sagesser, M. (Oregon State University, et M. Deinzer. 1996. « HPLC-Ion Spray-Tandem Mass Spectrometry of Flavonol Glycosides in Hops ». *American Society of Brewing Chemists (USA)*.

Sakamoto K et Konings WN. 2003. « Beer Spoilage Bacteria and Hop Resistance ». *International Journal of Food Microbiology* 89 (2-3): 105-124.

Sandoval-Ramírez BA, Lamuela-Raventós RM, Estruch R, Sasot G, Doménech M et Tresserra-Rimbau A. 2017. « Beer Polyphenols and Menopause: Effects and Mechanisms—A Review of Current Knowledge ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017: 1-9.

Sansawat T, Lee HC, Zhang L, Ryser ET et Kang I. 2016. « Antilisterial effects of different hop acids in combination with potassium acetate and potassium diacetate at 7 and 37 °C ». *Food Control* 59: 256-261.

Schmalreck AF et Teuber M. 1975. « Structural Features Determining the Antibiotic Potencies of Natural and Synthetic Hop Bitter Resins, Their Precursors and Derivatives ». *Canadian Journal of Microbiology* 21 (2): 205-212.

Schmandke H. 2010. « Prenyl flavonoids in hops and beer - biochemical and biological activities ». *Ernahrungs-Umschau* 53 (6): 225-229.

Segawa S, Yasui K, Takata Y, Kurihara T, Kaned H et Watari J. 2014. « Flavonoid Glycosides Extracted from Hop (*Humulus lupulus* L.) as Inhibitors of Chemical Mediator Release from Human Basophilic KU812 Cells ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70 (12): 2990–2997.

Senneville E, Brière M, Neut C, Messad N, Lina G, Richard JL, Sotto A et Lavigne JP. 2014. « The French Study Group on the Diabetic Foot. First report of the predominance of clonal complex 398 *Staphylococcus aureus* strains in osteomyelitis complicating diabetic foot ulcers: a national French study ». *Clinical Microbiology and Infection* 20 (4): 274-277.

Shapiro SS et Wilk MB. 1965. « An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples) ». *Biometrika* 52 (3): 591-611.

Sharp DC. 2016. « Factors that Influence the Aroma and Monoterpene Alcohol Profile of Hopped Beer ». Oregon State University. Thèse.

Shilpha J, Satish L, Kavikkul M, Joe Virgin Largia M et Ramesh M. 2015. « Methyl Jasmonate Elicits the Solasodine Production and Anti-Oxidant Activity in Hairy Root Cultures of *Solanum trilobatum* L. ». *Industrial Crops and Products* 71: 54-64.

Shimura M, Hasumi A, Minato T, Hosono M, Miura Y, Mizutani S, Kondo K, Oikawa S et Yoshida A. 2005. « Isohumulones modulate blood lipid status through the activation of PPAR $\alpha$  ». *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1736 (1): 51-60.

- Shoda M. 2000. « Bacterial control of plant diseases ». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89 (6): 515-21.
- Siah A, Deweer C, Morand E, Reignault P et Halama P. 2010. « Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four *in vitro* bioassays and by screening of G143A substitution ». *Crop Protection* 29 (7): 737-743.
- Siah A, Magnin-Robert M, Randoux B, Choma C, Rivière C, Halama P et Reignault P. 2018. « Natural Agents Inducing Plant Resistance Against Pests and Diseases ». In Mérillon JM & Rivière C (ed) *Natural Antimicrobial Agents, Series Sustainable Development and Biodiversity*, Springer, 121-59.
- Simpson WJ et Smith ARW. 1992. « Factors Affecting Antibacterial Activity of Hop Compounds and Their Derivatives ». *Journal of Applied Bacteriology* 72 (4): 327-334.
- Siragusa GR, Haas GJ, Matthews PD, Smith RJ, Buhr RJ, Dale NM et Wise MG. 2008. « Antimicrobial Activity of Lupulone against *Clostridium Perfringens* in the Chicken Intestinal Tract Jejunum and Caecum ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61 (4): 853-858.
- Smýkalová I, Ortová M, Lipavská H et Patzak J. 2001. « Efficient In Vitro Micropropagation and Regeneration of *Humulus lupulus* on Low Sugar, Starch-Gelrite Media ». *Biologia Plantarum* 44 (1): 7-12.
- Spetsig LO et Steninger μ. 1960. « Hulupones, a New Group of Hop Bitter Substances ». *Journal of the Institute of Brewing* 66 (5): 413-417.
- Spiewak R et Dutkiewicz Ā. 2002. « Occupational Airborne and Hand Dermatitis to Hop (*Humulus lupulus*) with Non-Occupational Relapses ». *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 9 (2): 249-252.
- Spivey JM. 1992. « The Postantibiotic Effect ». *Clinical Pharmacy* 11 (10): 865-875.
- Srinivasan V, Goldberg D et Haas GJ. 2004. « Contributions to the antimicrobial spectrum of hop constituents ». *Economic Botany* 58 (1): 230-238.
- Stassi F. 2017. « On peut redévelopper la culture du houblon en France ». *L'Usine Matières premières*. [En ligne] <https://www.usinenouvelle.com/article/on-peut-redevelopper-la-culture-du-houblon-en-france>. N503359.
- Steenackers B, De Cooman L et De Vos D. 2015. « Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review ». *Food Chemistry* 172: 742-756.
- Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Zenewicz LA et Lewis K. 2000. « Synergy in a Medicinal Plant: Antimicrobial Action of Berberine Potentiated by 5'-Methoxyhydnocarpin, a Multidrug Pump Inhibitor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (4): 1433-1437.
- Stevens JF, Ivancic M, Hsu VL et Deinzer ML. 1997. « Prenylflavonoids from *Humulus lupulus* ». *Phytochemistry* 44 (8): 1575-1585.
- Stevens JF, Miranda CL, Wolthers KR, Schimerlik M, Deinzer ML et Buhler DR. 2002. « Identification and in Vitro Biological Activities of Hop Proanthocyanidins: Inhibition of NNOS Activity and Scavenging of Reactive Nitrogen Species ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (12): 3435-3443.
- Stevens JF et Page JE. 2004. « Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! ». *Phytochemistry* 65 (10): 1317-1330.
- Stevens JF, Taylor AW et Deinzer ML. 1999. « Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 832 (1-2): 97-107.
- Stevens JF, Taylor AW, Nickerson GB, Ivancic M, Henning J, Haunold A et Deinzer ML. 2000. « Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol ». *Phytochemistry* 53 (7): 759-775.
- Stevens R. 1967. « The Chemistry of Hop Constituents ». *Brewing Industry Research Foundation* 67 (1): 19-71.
- Stojceska V, Ainsworth P, Plunkett A et İbanoglu S. 2008. « The recycling of brewer's processing by-product into ready-to-eat snacks using extrusion technology ». *Journal of Cereal Science* 47 (3): 469-479.
- Stompor M, Dancewicz K, Gabryś B et Anioł M. 2015. « Insect Antifeedant Potential of Xanthohumol, Isoxanthohumol, and Their Derivatives ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (30): 6749-6756.
- Stoodley P, Sauer L, Davies DG et Costerton JW. 2002. « Biofilms as Complex Differentiated Communities ». *Annual Review of Microbiology* 56 (1): 187-209.

- Sugiyama R, Oda H et Kurosaki F. 2006. « Two Distinct Phases of Glandular Trichome Development in Hop (*Humulus lupulus* L.) ». *Plant Biotechnology* 23 (5): 493-496.
- Sumiyoshi M et Kimura Y. 2013. « Hop (*Humulus lupulus* L.) Extract Inhibits Obesity in Mice Fed a High-Fat Diet over the Long Term ». *British Journal of Nutrition* 109 (1): 162-172.
- Tabata N, Ito M, Tomoda H et Ōmura S. 1997. « Xanthohumols, diacylglycerol acyltransferase inhibitors, from *Humulus lupulus* ». *Phytochemistry* 46 (4): 683-687.
- Tanaka Y, Honma D, Tamura M, Yanagida A, Zhao P, Shoji T, Tagashira M, Shibusawa Y et Kanda T. 2012. « New chromanone and acylphloroglucinol glycosides from the bracts of hops ». *Phytochemistry Letters* 5 (3): 514-518.
- Tanaka Y, Yanagida A, Komeya S, Kawana M, Honma D, Tagashira M, Kanda T et Shibusawa Y. 2014. « Comprehensive Separation and Structural Analyses of Polyphenols and Related Compounds from Bracts of Hops (*Humulus lupulus* L.) ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (10): 2198-2206.
- Taniguchi Y, Matsukura Y, Ozaki H, Nishimura K et Shindo K. 2013. « Identification and Quantification of the Oxidation Products Derived from  $\alpha$ -Acids and  $\beta$ -Acids During Storage of Hops (*Humulus lupulus* L.) ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (12): 3121-3130.
- Taniguchi Y, Taniguchi H, Yamada M, Matsukura Y, Koizumi H, Furihata K et Shindo K. 2014. « Analysis of the Components of Hard Resin in Hops (*Humulus lupulus* L.) and Structural Elucidation of Their Transformation Products Formed during the Brewing Process ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (47): 1602-1612.
- Tattevin P. 2011. « Ceftobiprole : la première  $\beta$ -lactamine active contre les SARM ? » *La Lettre du Pharmacologue* 25 (1): 22-25.
- Tattevin P. 2016. « Traitement des infections à staphylocoque ». Présentation [En ligne]. <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/jra/jra-2016/jra2016-trt-staphylocoques-tattevin.pdf>.
- Teng Y, Li X, Yang K, Li X, Zhang Z, Wang L, Deng Z, Song B, Yan Z, Zhang Y, Lu K et Yu P. 2017. « Synthesis and Antioxidant Evaluation of Desmethylxanthohumol Analogs and Their Dimers ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 125: 335-345.
- Tenover FC. 2006. « Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria ». *The American Journal of Medicine, Antimicrobial Resistance Prevention Initiative: Proceedings of an Expert Panel on Resistance*, 119 (6): 3-10.
- The Angiosperm Phylogeny Group. 2016. « An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG IV ». *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 1-20.
- Thompson M, Ellison SLR et Wood R. 2002. « Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis ». *Pure and Applied Chemistry* 74 (5): 835-855.
- Tillman GE, Haas GJ, Wise MG, Oakley B, Smith MA et Siragusa GR. 2011. « Chicken Intestine Microbiota Following the Administration of Lupulone, a Hop-Based Antimicrobial ». *FEMS Microbiology Ecology* 77 (2): 395-403.
- Todd PH et Guzinski JA. 1990. Purification of beta acids for hydrogenolysis and such purified beta acids. United States US4918240A. [En ligne] <https://patents.google.com/patent/US4918240A/en>.
- Torriani SF, Brunner PC, McDonald BA et Sierotzki H. 2009. « QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola* ». *Pest Management Science* 65 (2): 155-62.
- Tremblay YDN, Hathroubi S et Jacques M. 2014. « Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique ». *The Canadian Journal of Veterinary Research* 78 (2): 110-16.
- Tsukiyama RI, Katsura H, Tokuriki N et Kobayashi M. 2002. « Antibacterial activity of licochalcone A against spore-forming bacteria. - PubMed - NCBI ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (5): 1226-1230.
- Tsurumaru Y, Sasaki K, Miyawaki T, Uto Y, Momma T, Umemoto N, Momose M et Yazaki K. 2012. « HIPT-1, a membrane-bound prenyltransferase responsible for the biosynthesis of bitter acids in hops ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417 (1): 393-398.
- Tyrrell E, Archer R, Tucknott M, Colston K, Pirianov G, Ramanathan D, Dhillon R, Sinclair A et Skinner GA. 2012. « The synthesis and anticancer effects of a range of natural and unnatural hop  $\beta$ -acids on breast cancer cells ». *Phytochemistry Letters* 5 (1): 144-149.
- Van Breemen RB, Yuan Y, Banuvar S, Shulman LP, Qiu X, Ramos Alvarenga RF, Chen SN, Dietz BM, Bolton JL, Pauli GF,

- Krause E, Viana M et Nikolic D et al., 2014. « Pharmacokinetics of prenylated hop phenols in women following oral administration of a standardized extract of hops ». *Molecular Nutrition & Food Research* 58 (10): 1962-1969.
- Van Cleemput M, Cattoor K, De Bosscher K, Heageman G, De Keukeleire D et Heyerick A. 2009. « Hop (*Humulus lupulus*)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds ». *Journal of Natural Products* 72 (6): 1220-1230.
- Vanhoecke BW, Delporte F, Van Braeckel E, Heyerick A, Depypere HT, Nuytinck M, De Keukeleire D et Bracke ME. 2005. « A safety study of oral tangeretin and xanthohumol administration to laboratory mice ». *In Vivo* 19 (1): 103-107.
- Varo A, Raya-Ortega MC et Trapero A. 2016. « Selection and Evaluation of Micro-Organisms for Biocontrol of *Verticillium dahliae* in Olive ». *Journal of Applied Microbiology* 121 (3): 767-777.
- Verzele M. 1986. « 100 Years of Hop Chemistry and Its Relevance to Brewing ». *Journal of the Institute of Brewing* 92 (1): 32-48.
- « VIDAL - Le dictionnaire ». 2018. [En ligne] [https://www.vidal.fr/substances/23578/ceftaroline\\_fosamil/](https://www.vidal.fr/substances/23578/ceftaroline_fosamil/).
- Vogel S, Ohmayer S, Brunner G et Heilmann J. 2008. « Natural and non-natural prenylated chalcones: Synthesis, cytotoxicity and anti-oxidative activity ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 (8): 4286-4293.
- Wagner H et Ulrich-Merzenich G. 2009. « Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals ». *Phytomedicine* 16 (2): 97-110.
- Waldrop R, McLaren A, Calara F et McLemore R. 2014. « Biofilm Growth Has a Threshold Response to Glucose *in Vitro* ». *Clinical Orthopaedics and Related Research* 472 (11): 3305-3310.
- Wang Q, Ding ZH, Liu JK et Zheng YT. 2004. « Xanthohumol, a novel anti-HIV-1 agent purified from Hops *Humulus lupulus* ». *Antiviral Research* 64 (3): 189-194.
- Weiskirchen R, Mahli A, Weiskirchen A et Hellerbrand C. 2015. « The hop constituent xanthohumol exhibits hepatoprotective effects and inhibits the activation of hepatic stellate cells at different levels ». *Frontiers in Physiology* 6: 140-151.
- Wendakoon C, Calderon P et Gagnon D. 2012. « Evaluation of selected medicinal plants extracted in different ethanol concentrations for antibacterial activity against human pathogens ». *Journal of Medicinally Active Plants* 1 (2): 60-68.
- Yajima H, Noguchi T, Ikeshima E, Shiraki M, Kanaya T, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Oikawa S et Kondo K. 2005. « Prevention of Diet-Induced Obesity by Dietary Isomerized Hop Extract Containing Isohumulones, in Rodents ». *International Journal of Obesity* 29 (8): 991-997.
- Yajima H, Ikeshima E, Shiraki M, Kanaya T, Fujiwara D, Odai H, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Oikawa S et Kondo K. 2004. « Isohumulones, Bitter Acids Derived from Hops, Activate Both Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  and Reduce Insulin Resistance ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (32): 33456-33462.
- Yamaguchi N, Satoh-Yamaguchi K et Ono M. 2009. « *In vitro* evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing *acne vulgaris* ». *Phytomedicine* 16 (4): 369-376.
- Yamamoto K, Wang J, Yamamoto S et Tobe H. 2000. « Suppression of Cyclooxygenase-2 Gene Transcription by Humulon of Beer Hop Extract Studied with Reference to Glucocorticoid ». *FEBS Letters* 465 (2-3): 103-106.
- Yen TL, Hsu CK, Lu WJ, Hsieh CY, Hsiao G, Chou DS, Wu GJ et Sheu JR. 2012. « Neuroprotective Effects of Xanthohumol, a Prenylated Flavonoid from Hops (*Humulus Lupulus*), in Ischemic Stroke of Rats ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (8): 1937-1944.
- Yong WK, Ho YF et Abd Malek SN. 2015. « Xanthohumol induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in A549 non-small cell lung cancer cells ». *Pharmacognosy Magazine* 11: 275-283.
- Young SL. 2004. « Natural Product Herbicides for Control of Annual Vegetation Along Roadsides ». *Weed Technology* 18 (03): 580-587.
- Zanoli P, Rivasi M, Zavatti M, Brusiani F et Baraldi M. 2005. « New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L ». *Journal of Ethnopharmacology* 102 (1): 102-106.
- Zanoli P et Zavatti M. 2008. « Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. » *Journal of Ethnopharmacology* 116 (3): 383-396.
- Zenger K, Dutta S, Wolff H, Genton MG et Kraus B. 2015. « *In vitro* structure-toxicity relationship of chalcones in human hepatic stellate cells ». *Toxicology* 336: 26-33.

- Zhang N, Liu Z, Han Q, Chen J, Lou S, Qiu J et Zhang G. 2009. « Inhibition of Bovine Viral Diarrhea Virus in Vitro by Xanthohumol: Comparisons with Ribavirin and Interferon- $\alpha$  and Implications for the Development of Anti-Hepatitis C Virus Agents ». *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 38 (4): 332-340.
- Zhang N, Liu Z, Han Q, Chen J et Lv Y. 2010. « Xanthohumol enhances antiviral effect of interferon  $\alpha$ -2b against bovine viral diarrhea virus, a surrogate of hepatitis C virus ». *Phytomedicine* 17 (5): 310-316.
- Zhao F, Watanabe Y, Nozawa H, Daikonnya A, Kondo K et Kitanaka S. 2005. « Prenylflavonoids and Phloroglucinol Derivatives from Hops (*Humulus lupulus*) ». *Journal of Natural Products* 68 (1): 43-49.
- Zhao X, Jiang K, Liang B et Huang X. 2016. « Anticancer effect of xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis of human liver cancer through NF-kappa B/p53-apoptosis signaling pathway ». *Oncology Report* 35(2): 669-675.
- Żołnierczyk AK, Mączka WK, Grabarczyk M, Wińska K, Woźniak E et Anioł M. 2015. « Isoxanthohumol - Biologically active hop flavonoid ». *Fitoterapia* 103: 71-82.
- Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM et van 't Riet K. 1990. « Modeling of the Bacterial Growth Curve ». *Applied and Environmental Microbiology* 56 (6): 1875-1881.

**Publications internationales**

Bocquet L, Rivière C, Dermont C, Samaillie J, Hilbert JL, Halama P, Siah A et Sahpaz S. **2018**. « Antifungal activity of hop's extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* ». *Industrial Crops and Products* 122: 290-297.

Bocquet L, Rambaud C, Hilbert JL, Sahpaz S et Rivière C. **2018**. « *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology ». *Phytochemistry Reviews*: 1-44, doi : 10.1007/s11101-018-9584-y.

Bocquet L, Sahpaz S, Bonneau N, Beaufay C, Mahieux S, Samaillie J, Roumy V, Bordage S, Hennebelle T, Chai F, Quetin-Leclercq J, Neut C et Rivière C. « Phenolic compounds from *Humulus lupulus* L. as natural anti-bacterial products: new weapons in the fight against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* ». *Phytotherapy Research*, soumise.

**Chapitre d'ouvrage**

Bocquet L, Sahpaz S et Rivière C. **2018**. An overview of the antimicrobial properties of hop. In Mérillon JM & Rivière C. *Natural Antimicrobial Agents, Series Sustainable Development and Biodiversity*, Springer, p. 31-54.

**Actes de congrès**

Bocquet L, Siah A, Samaillie J, Hilbert JL, Halama P, Sahpaz S et Rivière C. **2016**. « Antifungal activity of hop extracts against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* ». *Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences* 81 (2), 1-250.

Bocquet L, Rivière C, Neut C, Mahieux S, Roumy V, Hennebelle T, Bordage S, Samaillie J et Sahpaz S. **2016**. « Antimicrobial properties of phenolic compounds from hops, *Humulus lupulus* L.: fight against multidrug resistance ». *Planta Medica* 82 (S 01), S1-S381.

Bocquet L, Neut C, Mahieux S, Samaillie J, Bordage S, Roumy V, Hennebelle T, Sahpaz S et Rivière C. **2017**. « Phenolic compounds from hops: fight against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* ». In Rivière C. (ed.) (2017). *Trends in Natural Product Research - PSE Young Scientists' Meeting Lille 2017. Natural Products in Health, Agro-food and Cosmetics: Abstracts of the Phytochemical Society of Europe*. Phytochemical Society of Europe, Leicester. ISBN-13 978-0-9565472-6-2.

**Communications orales**✚ Congrès internationaux

Bocquet L, Neut C, Mahieux S, Samaillie J, Bordage S, Roumy V, Hennebelle T, Sahpaz S et Rivière C. « Phenolic compounds from hops: fight against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ». *Natural Product in Health, Agro-Food and Cosmetics, Phytochemical Society of Europe Young Scientists' Meeting*, 28 Juin - 1<sup>er</sup> Juillet **2017**, Lille, France.

✚ Congrès nationaux

Bocquet L, Neut C, Mahieux S, Samaillie J, Sahpaz S et Rivière C. « Les composés phénoliques antibactériens du houblon : lutte contre l'antibiorésistance ». *Journées jeunes chercheurs de la SFR Condorcet*, 18-19 janvier **2018**, Amiens, France.

Bocquet L et Rivière C. « Purification par CPC de produits d'origine naturelle à activité antimicrobienne ». 3<sup>ème</sup> Journée Scientifique sur les Substances Naturelles, Gilson/Armen, 6 décembre **2016**, Avignon, France.

Bocquet L et Rivière C. « Études phytochimiques et biologiques des composés phénoliques antimicrobiens du houblon, *Humulus lupulus* L ». 4<sup>èmes</sup> Journées sur le Métabolisme Spécialisé des Plantes, juillet **2015**, Reims, France.

**Communications par affiche**✚ Congrès internationaux

Bocquet L, Siah A, Samaillie J, Hilbert JL, Halama P, Sahpaz S et Rivière C. « Antifungal potential of hop extracts against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* ».

- *Natural Product in Health, Agro-Food and Cosmetics*, 28 Juin - 1er Juillet **2017**, Lille, France.
- *Deepen Knowledge in Plant Pathology for Innovative Agro-Ecology*, 29 Mai - 2 juin **2017**, Dunkerque, France

Bocquet L, Rivière C, Neut C, Mahieux S, Roumy V, Hennebelle T, Bordage S, Samaillie J et Sahpaz S. « Antimicrobial properties of phenolic compounds from hops, *Humulus lupulus* L.: fight against multidrug resistance ». 9<sup>th</sup> Joint Natural Products Conference, 24 - 27 juillet **2016**, Copenhague, Danemark.

Bocquet L, Siah A, Samaillie J, Hilbert JL, Halama P, Sahpaz S et Rivière C. « Antifungal potential of hop extracts against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* ». 68<sup>th</sup> International Symposium on Crop Protection, 17 mai **2016**, Gand, Belgique.

Bocquet L, Neut C, Mahieux S, Samaillie J, Roumy V, Hennebelle T, Sahpaz S et Rivière C. « Antimicrobial properties of phenolic compounds from hop, *Humulus lupulus* L.: fight against multi-drug resistance ». *Plant Omics for Biotechnology and human Health*, 24 - 26 novembre **2016**, Gand, Belgique.

✚ Congrès nationaux

Bocquet L, Neut C, Mahieux S, Samaillie J, Roumy V, Bordage S, Hennebelle T, Chai F, Sahpaz S et Rivière C. « Phenolic compounds from hops as new weapons against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains ». Flash présentation. 3<sup>ème</sup> Symposium AFERP STOLON, 18 - 20 juillet **2018**, Rennes, France.

Bocquet L, Neut C, Mahieux S, Samaillie J, Roumy V, Bordage S, Hennebelle T, Sahpaz S et Rivière C. « Les composés phénoliques antimicrobiens du houblon : lutte contre la résistance de *Staphylococcus aureus* à la méticilline ». 1<sup>ère</sup> journée de la recherche en pharmacie, 10 juillet **2017**, Lille, France.

Bocquet L, Neut C, Mahieux S, Samaillie J, Roumy V, Bordage S, Hennebelle T, Sahpaz S et Rivière C. « Les composés phénoliques antimicrobiens du houblon : perspectives de valorisation des coproduits de l'industrie brassicole ». *Journées SFR Condorcet*, 8 - 9 juin **2017**, Lille, France.



## RÉSUMÉ

### **Les composés phénoliques du houblon, *Humulus lupulus* L. : Lutte contre la résistance microbienne et perspectives industrielles**

La recherche de nouveaux antimicrobiens est un enjeu majeur de santé publique au niveau mondial. Les antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine et animale, ainsi que les pesticides conventionnels massivement employés sur les grandes cultures, induisent l'apparition de résistances qui rendent de nombreuses infections en santé humaine et en santé du végétal, difficiles à traiter. Dans ce contexte, les plantes constituent une source de composés d'origine biosynthétique et de structure variées. Le houblon, *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae), est connu pour son pouvoir antimicrobien. Ses cônes femelles sont utilisés par l'industrie brassicole pour la conservation de la bière. Ce potentiel n'est en revanche pas exploité pour lutter contre la résistance microbienne. Dans cette étude, l'activité antimicrobienne des cônes femelles de houblon a été évaluée vis-à-vis de bactéries pathogènes de l'Homme, ainsi que de phytopathogènes. En suivant un processus de fractionnement bioguidé, les composés responsables des diverses activités antimicrobiennes ont été purifiés par chromatographie de partage centrifuge (CPC) et par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Une attention particulière a été portée sur deux chalcones : le xanthohumol et le desméthylxanthohumol, ainsi que sur un dérivé d'acylphloroglucinols : la lupulone. Ils présentent des perspectives prometteuses, notamment dans la lutte contre des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM).

MOTS CLÉS : houblon, composés phénoliques, fractionnement bioguidé, antibactérien, SARM, antifongique, bio-fongicide

---

## ABSTRACT

### **Phenolic compounds from hop, *Humulus lupulus* L.: Fight against microbial resistance and industrial prospects**

Searching for new antimicrobials is a real and timely challenge in term of public health. Antibiotics used for human and animal therapeutics, and conventional pesticides massively applied on field crops, induce resistance that makes infections difficult to treat, in plant and human health. Plants are a source of compounds from diverse biosynthetic origins and various structures. Hop, *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae), is known for its antimicrobial properties. Female inflorescences are used by the brewing industry for beer conservation. This potential is however not exploited to fight against microbial resistance. In this study, the antimicrobial activity of female hop cones was assessed against human-pathogenic bacteria and some phytopathogens. By following a bioguided fractionation process, centrifugal partition chromatography (CPC) and high performance liquid chromatography (HPLC) allowed to purify antimicrobial products. Particular attention was focused on two prenylated chalcones: xanthohumol and desmethylxanthohumol, as well as one acylphloroglucinol derivative: lupulone. They raise promising prospects, especially in the fight against strains of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA).

KEYWORDS: hops, phenolic compounds, bioguided fractionation, antibacterial, MRSA, antifungal, bio-fungicide