



**HAL**  
open science

# Développement de méthodes d'extraction et d'analyse de molécules terpéniques à activité anti-inflammatoire

Zélie Triaux

► **To cite this version:**

Zélie Triaux. Développement de méthodes d'extraction et d'analyse de molécules terpéniques à activité anti-inflammatoire. Chimie analytique. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAF032 . tel-02988305

**HAL Id: tel-02988305**

**<https://theses.hal.science/tel-02988305>**

Submitted on 4 Nov 2020

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

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

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

**UMR 7178 – Équipe de Chimie Analytique des Molécules BioActives et  
Pharmacognosie (CAMBAP)**

# THÈSE

présentée par :

**Zélie TRIAUX**

soutenue le : **27 Septembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie Analytique

**Développement de méthodes d'extraction et  
d'analyse de molécules terpéniques à activité  
anti-inflammatoire**

**THÈSE dirigée par :**  
**M MARCHIONI Éric**

Professeur, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**  
**Mme DESTANDAU Émilie**  
**M FERNANDEZ Xavier**

Professeur, Université d'Orléans  
Professeur, Université de Nice Sophia Antipolis

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**  
**M MARCIC Christophe**  
**M PETITJEAN Hugues**

Maitre de Conférences, Université de Strasbourg  
PDG, Benephyt



---

# REMERCIEMENTS

---



## REMERCIEMENTS

Mes travaux de recherches ont été réalisés dans le cadre d'une thèse CIFRE entre l'équipe de Chimie Analytique des Molécules BioActives et Pharmacognosie (CAMBAP) de l'UMR 7178 et l'entreprise Benephyt. Ce périple de trois ans prenant fin, je souhaite exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont accompagnées et soutenues pendant les hauts et les bas de ce travail de thèse.

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à mon directeur de thèse Éric MARCHIONI pour m'avoir accueillie dans son équipe depuis mon stage de Master 2. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de thèse et pour l'autonomie dont il m'a fait part.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude et ma reconnaissance à Christophe MARCIC pour son encadrement, ses conseils et ses encouragements. Malgré son emploi du temps très chargé, il a toujours su trouver du temps pour me guider, pour me rassurer dans des moments difficiles et pour m'aider à avancer tout en m'accordant une grande autonomie. Je tiens aussi à le remercier pour le temps qu'il a consacré à la correction de mon manuscrit de thèse. Je suis fière d'avoir été la première doctorante que tu as encadrée, j'espère être présente pour ta soutenance d'HDR et je te souhaite toute l'amélioration possible sur Mario Kart.

Je souhaiterais ensuite remercier Hugues PETITJEAN, directeur de Benephyt, pour m'avoir accordé la chance de participer au développement de la recherche dans son entreprise. Même à l'autre bout du monde, il était toujours disponible pour m'aider et répondre à mes questions tout en suivant de manière régulière l'avancement de ma thèse pendant ses retours en France. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir permis de découvrir l'univers de la biologie que j'ai fortement apprécié et dont j'aimerais continuer à explorer dans ma future carrière.

Je tiens à remercier la professeure Emilie DESTANDAU de l'Université d'Orléans et le professeur Xavier FERNANDEZ de l'Université de Nice Sophia Antipolis de me faire l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Je remercie également le docteur Alexandre CHARLET de l'Université de Strasbourg d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

J'aimerais remercier toutes les personnes de l'équipe CAMBAP qui m'ont aidées de prêt ou de loin pour conduire au mieux ce projet et qui rendaient la vie quotidienne au laboratoire très agréable, je me suis sentie bien intégrée pendant ces trois ans parmi vous. Ce fut toujours un véritable plaisir de tous se retrouver autour dans un goûter dans cette minuscule salle de pause. Je tiens à exprimer ma plus sincère gratitude à Diane qui m'a donné l'opportunité de faire mon stage de M2 dans le même laboratoire et sans qui je n'aurais sûrement pas postulé à cette thèse. Je ne remerciais jamais assez Martine pour toute son aide sur les statistiques. Merci à Sonia, Ludivine, Saïd, Minjie, Souade, Christian et Fathi toujours présents pour aider et discuter. Merci aussi à Aurélie, Mélanie, Laurence et Quentin de m'avoir accueilli chaleureusement dans leurs bureaux pendant ces trois derniers mois de

rédaction. Je tiens à remercier vivement Myriam pour toutes les démarches administratives ainsi que pour les commandes. Je remercie également tous les anciens, présents et futurs doctorants de l'équipe : Randa, Mamadou, Yé, Clément et Gwenaëlle. Bon courage à Clément et Gwenaëlle pour ce qui arrive ! Je souhaite remercier tous les stagiaires qui m'ont aidé à faire avancer mon projet de thèse et notamment Johanna sans qui la culture cellulaire serait toujours un grand mystère pour moi.

Merci particulièrement à Gwendoudi dite la délicatesse et Nathalie le petit calamar, rencontrées dans un contexte professionnel qui sont maintenant devenues des amies, sans qui ces derniers mois les plus durs mentalement de ma thèse n'auraient pas été les mêmes. Toujours à l'écoute et disponibles, elles m'ont poussées vers l'avant et m'ont aidées à me défouler lorsque j'en avais besoin. Merci pour les crises de rire et le soutien au quotidien.

Je tiens ensuite à remercier sincèrement mes amis pour tout le soutien qu'ils m'ont apportés pendant ces trois dernières années, ça aurait été beaucoup plus dur sans vous. Merci à Elo, celle qui je pense m'a le plus supportée, merci pour les soirées, les sorties, les repas, les voyages qui m'ont permis de me vider la tête. Merci à Boris pour les trajets entre la fac et le crossfit, un bon moment de partage sur nos galères réciproques en manips de bio. Merci à Alex et aux week-ends retrouvailles pleins de crêpes, merci pour ton soutien même à distance. Merci à Justine, collègue puis amie, pour les longues pauses discussion dans le couloir qui me permettait souvent de vider mon sac. Merci à Coralie, amie de longue date, pour ton écoute et tes encouragements. Merci à Franck pour les discussions autour d'une expérience commune. Merci à tous pour vos amitiés, j'espère créer avec vous encore de nombreux souvenirs.

Je souhaiterais exprimer ma plus grande reconnaissance et ma plus sincère gratitude à ma mère. Je suis là aujourd'hui grâce à elle et je lui dois cette réussite. Elle nous a toujours soutenu, mes frères et moi, tout au long de nos études afin que l'on obtienne un métier que l'on aime quel qu'il soit. Même dans des périodes difficiles, nous et notre bonheur étaient toujours sa priorité. Sans ses sacrifices, je n'aurais jamais eu la chance de réaliser ce travail de thèse. Merci.

Enfin, je tiens à remercier Thomas de tout mon cœur. Je sais que je ne suis pas facile à vivre tous les jours, surtout quand j'ai faim et que je suis fatiguée, mais tu es toujours là pour moi. Merci infiniment pour le soutien que tu m'as apporté au cours de ces trois dernières années mais aussi depuis que l'on s'est rencontré. Notre histoire ne fait que commencer et j'ai hâte d'embarquer avec toi vers  
une  
nouvelle  
aventure.

---

# SOMMAIRE

---





## SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>5</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>17</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>25</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>31</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>35</b>
<b>CHAPITRE I – INTRODUCTION.....</b>	<b>41</b>
I.1. LA DOULEUR CHRONIQUE .....	41
<i>I.1.1. Définition générale de la douleur chronique .....</i>	<i>41</i>
<i>I.1.2. Classification des douleurs chroniques.....</i>	<i>42</i>
<i>I.1.3. Acteurs des douleurs chroniques inflammatoires.....</i>	<i>43</i>
I.1.3.1 Mécanisme de la douleur .....	43
I.1.3.2. Mécanisme de l’inflammation .....	44
I.1.3.3. Les messagers de l’inflammation : les cytokines .....	48
I.1.3.3.1. Les chimiokines .....	48
I.1.3.3.2. Les interleukines .....	48
I.1.3.3.3. Le facteur de nécrose tumorale $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) .....	49
<i>I.1.4. Traitement des douleurs chroniques .....</i>	<i>50</i>
I.1.4.1. Les traitements pour soulager les douleurs chroniques.....	50
I.1.4.2. Les anti-TNF- $\alpha$ comme traitement contre les douleurs chroniques inflammatoires ....	51
I.2. LES PLANTES : SOURCES DE MOLECULES NATURELLES BIOACTIVES.....	51
<i>I.2.1. Les plantes médicinales.....</i>	<i>51</i>
<i>I.2.2. Les métabolites secondaires : principes actifs des plantes .....</i>	<i>52</i>
<i>I.2.3. La plus grande famille de molécules naturelles : les terpènes.....</i>	<i>53</i>
I.2.3.1. Présentation et classification des terpènes .....	53
I.2.3.2. Biosynthèse des terpènes .....	55
I.2.3.2.1. Les précurseurs des terpènes : l’IPP et le DMAPP.....	55
I.2.3.2.2. L’origine de l’IPP : la voie MVA et la voie MEP .....	55
I.2.3.2.3. Assemblage tête-à-queue de l’IPP et DMAPP en C <sub>10</sub> , C <sub>15</sub> et C <sub>20</sub> diphosphates de prényle .....	56
I.2.3.2.4. Les monoterpènes et sesquiterpènes synthèses.....	57
I.2.3.3. Modulation de la voie du TNF- $\alpha$ par les terpènes volatils .....	62
<i>I.2.4. Étude de deux plantes thérapeutiques peu caractérisées .....</i>	<i>65</i>
I.2.4.1. <i>Calamintha nepeta</i> (L.) savi.....	65
I.2.4.2. <i>Asarum europaeum</i> (L.) .....	67
I.3. L’EXTRACTION DES TERPENES VOLATILS .....	68
<i>I.3.1. Les méthodes d’extraction conventionnelles pour l’obtention d’huiles essentielles .....</i>	<i>69</i>

I.3.1.1. Définitions.....	69
I.3.1.2. Les méthodes d'extractions dites conventionnelles .....	70
I.3.1.2.1. La distillation par entraînement à la vapeur d'eau.....	70
I.3.1.2.2. L'hydrodiffusion.....	70
I.3.1.2.3. L'hydrodistillation .....	71
I.3.1.2.4. L'extraction par solvants non aqueux.....	71
I.3.1.2.5. Les désavantages de ces méthodes conventionnelles .....	71
<i>I.3.2. Les techniques non conventionnelles pour l'extraction des terpènes volatils.....</i>	<i>72</i>
I.3.2.1. Descriptions des méthodes d'extractions non conventionnelles.....	72
I.3.2.1.1. L'extraction par fluide supercritique (SFE, Supercritical Fluid Extraction) .....	72
I.3.2.1.2. L'extraction assistée par ultrasons (UAE, Ultrasound-Assisted Extraction).....	72
I.3.2.1.3. L'extraction assistée par microondes (MAE, Microwaves-Assisted Extraction) .	73
I.3.2.1.4. L'extraction par liquide pressurisé (PLE, Pressurized Liquid Extraction) .....	73
I.3.2.2. Les limites de ces techniques non conventionnelles .....	74
<i>I.3.3. Les méthodes de microextraction dans l'espace de tête.....</i>	<i>74</i>
I.3.3.1. Les techniques de microextraction à base d'absorbants.....	75
I.3.3.1.1. La microextraction sur phase solide (SPME, Solid Phase Microextraction).....	75
I.3.3.1.2. L'extraction par sorption dans l'espace de tête (HSSE, Headspace Sorptive Extraction).....	76
I.3.3.2. Les techniques de microextraction en phase liquide.....	77
I.3.3.2.1. La microextraction en phase liquide assistée par fibre creuse (HF-LPME, Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction) .....	77
I.3.3.2.2. La microextraction liquide sur une goutte (SDME, Single Drop Microextraction) .....	77
<i>I.3.4. Des solvants d'extraction émergents : les solvants eutectiques profonds (DES).....</i>	<i>79</i>
I.3.4.1. Présentation des solvants eutectiques profonds (DES, Deep Eutectic Solvents) .....	80
I.3.4.2. Méthode de préparation d'un DES.....	82
I.3.4.2. Propriétés physicochimiques des DESs .....	82
I.3.4.3. Utilisation des DESs pour l'extraction de molécules bioactives.....	83
I.4. OBJECTIFS DU PROJET DE THESE « TER-PAIN » .....	86
I.5. RÉFÉRENCES .....	87
<b>CHAPITRE II – DEMARCHE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>95</b>
II.1. L'EXTRACTION DES TERPENES VOLATILS.....	95
II.1.1. L'HydroDistillation (HD) .....	95
II.1.2. L'Extraction par liquide pressurisé (PLE) .....	96
II.1.3. L'extraction dans l'espace de tête (HS).....	97
II.1.4. La microextraction sur phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME).....	99
II.1.5. L'extraction par sorption dans l'espace de tête (HSSE).....	102

II.1.6. La microextraction liquide sur une goutte dans l'espace de tête couplée aux solvants eutectiques profonds (DES-HS-SDME).....	104
II.2. LES PLANS D'EXPERIENCES POUR L'OPTIMISATION DES METHODES D'EXTRACTION.....	106
II.2.1. Plan factoriel complet à deux niveaux.....	106
II.2.2. Plan composite centré.....	110
II.3. L'ANALYSE DES EXTRAITS TERPENIQUES.....	111
II.2.1. La méthode d'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).....	111
II.2.2. Identification des composés volatils.....	113
II.2.3. Quantification des composés volatils.....	114
II.4. PREPARATION DES PLANTES ETUDIEES.....	117
II.5. TEST DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DES EXTRAITS TERPENIQUES DE PLANTES.....	118
II.5.1. Cultures cellulaires.....	118
II.5.2. La cytométrie en flux.....	119
II.5.3. Principe du test anti-inflammatoire.....	122
II.5.4. Traitement des données.....	125
II.6. RÉFÉRENCES.....	126
<b>CHAPITRE III – OPTIMISATION DES METHODES D'EXTRACTION.....</b>	<b>130</b>
III.1. ARTICLE: COMPARISON OF HEADSPACE, HYDRODISTILLATION AND PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION OF TERPENES AND TERPENOIDS FROM FOOD MATRICES – QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS.....	131
III.1.1. Abstract.....	131
III.1.2. Introduction.....	131
III.1.3. Materials and methods.....	133
III.1.3.1. Materials.....	133
III.1.3.2. Chemicals.....	133
III.1.3.3. Sample preparation procedure.....	133
III.1.3.3.1. Headspace extraction (HS).....	133
III.1.3.3.2. Hydrodistillation.....	134
III.1.3.3.3. Pressurized liquid extraction (PLE).....	134
III.1.3.4. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) procedure.....	135
III.1.3.5. Qualitative and quantitative analysis.....	135
III.1.4. Results and discussion.....	136
III.1.4.1. Optimization of the sample preparation.....	136
III.1.4.2. Calibration.....	138
III.1.4.3. Analysis of the food extracts.....	143
III.1.4.3.1. Qualitative analysis.....	143
III.1.4.3.2. Quantitative analysis.....	151
III.1.5. Conclusions.....	151

III.1.6. Acknowledgements.....	152
III.1.7. Appendix.....	153
III.2. RESULTATS PRELIMINAIRES SUR L'EXTRACTION PAR SORPTION DANS L'ESPACE DE TETE (HSSE).....	158
III.2.1. Les paramètres d'extraction de l'HSSE.....	158
III.2.2. Les paramètres de désorption du barreau.....	160
III.3. ARTICLE: OPTIMIZATION BY EXPERIMENTAL DESIGN OF HEADSPACE SORPTIVE EXTRACTION AND SOLID PHASE MICROEXTRACTION FOR THE DETERMINATION OF TERPENES IN SPICES.....	162
III.3.1. Abstract.....	162
III.3.2. Introduction.....	163
III.3.3. Experimental.....	165
III.3.3.1. Reagents and materials.....	165
III.3.3.2. SPME conditions.....	165
III.3.3.3. HSSE conditions.....	166
III.3.3.4. Experimental design and definition of the response.....	167
III.3.3.5. GC-MS analysis.....	169
III.3.3.6. Sample characterization and quantification.....	169
III.3.4. Results and discussion.....	170
III.3.4.1. Optimization of SPME conditions.....	170
III.3.4.1.1. Screening by a 2 <sup>4</sup> Full Factorial Design.....	170
III.3.4.1.2. Optimization by a Face Centered Design.....	171
III.3.4.2. Optimization of HSSE conditions.....	173
III.3.4.2.1. Screening by a 2 <sup>3</sup> Full Factorial Design.....	173
III.3.4.2.2. Optimization by a Face Centered Design.....	175
III.3.4.3. Calibration and limits of detection.....	176
III.3.4.4. SPME and HSSE comparative study.....	181
III.3.5. Conclusions.....	184
III.3.6. Acknowledgements.....	184
III.3.7. Supplementary information.....	185
III.4. RÉFÉRENCES.....	193
<b>CHAPITRE IV – ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DES EXTRAITS TERPENIQUES DE PLANTES ....</b>	<b>200</b>
IV.1. OPTIMISATION DE DIFFERENTS PARAMETRES DU TEST ANTI-INFLAMMATOIRE.....	200
IV.2. ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DES EXTRAITS DE PLANTE.....	204
IV.2.1. Composition des extraits.....	204
IV.2.2. Activité anti-inflammatoire des extraits.....	208
IV.3. ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DE TROIS TERPENOÏDES VOLATILS PURS.....	211
IV.4. REFERENCES.....	216
<b>CHAPITRE V – LES « SOLVANTS EUTECTIQUES PROFONDS » POUR L'EXTRACTION DES TERPENES VOLATILS.....</b>	<b>220</b>

V.1. LES LIQUIDES IONIQUES POUR L'EXTRACTION DES TERPENES VOLATILS .....	221
V.2. RESULTATS PRELIMINAIRES SUR LA SYNTHESE ET L'UTILISATION DES DES .....	223
V.2.1. Les DESs synthétisés .....	223
V.2.2. Screening d'une méthode d'extraction.....	225
V.2.2.1. L'extraction solide-liquide aux ultrasons .....	225
V.2.2.2. La microextraction sur une goutte dans l'espace de tête (HS-SDME).....	230
V.3. ARTICLE : DEEP EUTECTIC SOLVENTS-BASED HEADSPACE SINGLE DROP MICROEXTRACTION FOR THE QUANTIFICATION OF TERPENES IN SPICES.....	233
V.3.1. Abstract .....	234
V.3.2. Introduction.....	234
V.3.3. Experimental .....	236
V.3.3.1. Chemicals and materials.....	236
V.3.3.2. Preparation of deep eutectic solvents (DESs).....	237
V.3.3.3. Headspace single drop microextraction (HS-SDME) procedure.....	238
V.3.3.4. Optimization of DES-HS-SDME conditions by design of experiments.....	238
V.3.3.5. Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) conditions.....	240
V.3.3.6. Quantification of terpenes in spices.....	241
V.3.4. Results and discussion.....	242
V.3.4.1. Screening of DESs.....	242
V.3.4.2. Optimization of DES-HS-SDME conditions by design of experiments.....	245
V.3.4.2.1. Screening of the significant extraction conditions: 2 <sup>4</sup> full factorial design.....	245
V.3.4.2.2. Finding the optimum: 2 <sup>2</sup> face centered design .....	247
V.3.4.3. Calibration .....	249
V.3.4.4. Application to the extraction of terpenes from spices .....	251
V.3.5. Conclusion.....	257
V.3.6. Acknowledgements .....	257
V.4. COMPARAISON DE TOUTES LES METHODES D'EXTRACTION DEVELOPPEES POUR L'EXTRACTION DES TERPENES VOLATILS.....	257
V.5. EXTRACTION DES COMPOSES TERPENIQUES DANS LES PLANTES PAR DES-HS-SDME .....	262
V.6. RÉFÉRENCES .....	266
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>270</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>277</b>
ANNEXE 1 : TABLEAU RECAPITULATIF DES PARAMETRES DES METHODES D'EXTRACTION OPTIMISEES.....	277
ANNEXE 2 : STRUCTURE DES HBA ET HBD UTILISES POUR LES DIFFERENTES COMBINAISONS DES DESS SYNTHETISES.....	278



---

## LISTE DES FIGURES

---





## LISTE DES FIGURES

## CHAPITRE I

FIGURE I - 1 - SCHEMA SIMPLIFIE DU MECANISME DE LA DOULEUR.....	44
FIGURE I - 2 - SCHEMA SIMPLIFIE DU MECANISME DE L'INFLAMMATION AIGUË .....	46
FIGURE I - 3 - MECANISMES DE L'INFLAMMATION AIGUË (A) ET CHRONIQUE (B) EN FONCTION DU TEMPS (ADAPTE DE SERHAN ET AL. [10]) .....	47
FIGURE I - 4 - REPARTITION DES METABOLITES SECONDAIRES DE PLANTES (ADAPTE DE TISSIER ET AL. [28]).....	53
FIGURE I - 5 - CLASSIFICATION DES TERPENES SUIVANT LE NOMBRE D'UNITES ISOPRENES DANS LEUR STRUCTURE CHIMIQUE.....	54
FIGURE I - 6 - PRECURSEURS DES TERPENOÏDES.....	55
FIGURE I - 7 - LES DEUX VOIES SIMPLIFIEES DE BIOSYNTHESE DU DIPHOSPHATE D'ISOPENTENYL (IPP) DANS LA CELLULE VEGETALE.....	56
FIGURE I - 8 - COUPLAGE TETE-A-QUEUE DES UNITES ISOPRENIQUES CONDUISANT A LA FORMATION DES DIFFERENTES CLASSES DE TERPENES.....	57
FIGURE I - 9 - QUELQUES VOIES DE PRODUCTION DE MONOTERPENES ACYCLIQUES, CYCLIQUES ET BICYCLIQUES PAR LES TPS (ADAPTE DE DEGENHARDT ET AL.[35]) .....	59
FIGURE I - 10 - BIOSYNTHESE DU MENTHOL ET DE SES ISOMERES DANS LA MENTHE (ADAPTE DE TURNER & CROTEAU [38]) .....	60
FIGURE I - 11 - QUELQUES VOIES DE PRODUCTION DE SESQUITERPENES ACYCLIQUES ET CYCLIQUES PAR LES TPS (ADAPTE DE DEGENHARDT ET AL. [35]).....	62
FIGURE I - 12 - PRINCIPAUX COMPOSES DE L'HUILE ESSENTIELLE DE CALAMINTHA NEPETA.....	66
FIGURE I - 13 - PRINCIPAUX COMPOSES DE L'HUILE ESSENTIELLE D'ASARUM EUROPÆUM.....	67
FIGURE I - 14 - EXPRESSION DES TPS EN REPONSE A DIFFERENTS STRESS DANS LES ORGANES ET TISSUS DE LA PLANTE (ADAPTE DE THOLL [56]) .....	69
FIGURE I - 15 - INTERACTION D'UN HBD AVEC L'AMMONIUM QUATERNAIRE CHLORURE DE CHOLINE (ADAPTE DE FRANCISCO ET AL. [86]) .....	80
FIGURE I - 16 - DIAGRAMME DE PHASE D'UN MELANGE DE DEUX COMPOSES (A ET B) (ADAPTE DE LIU ET AL. [87]) .....	81
FIGURE I - 17 - INFLUENCE DE L'AJOUT DE DES COMPOSES DE CHCl ET ETHYLENE GLYCOL A UN RATIO MOLAIRE DE 1 :3 DANS LA PHASE MOBILE POUR LA SEPARATION D'ALCALOÏDES SUR UNE COLONNE C18 (ADAPTE DE TAN ET AL. [94]).....	84

## CHAPITRE II

FIGURE II - 1 - PRINCIPE ET MONTAGE DE L'EXTRACTION PAR HYDRODISTILLATION.....	96
FIGURE II - 2 - SCHEMA DE FONCTIONNEMENT DU SYSTEME D'EXTRACTION PAR LIQUIDE PRESSURISE (PLE) .....	97
FIGURE II - 3 - PRINCIPE DE L'EXTRACTION DANS L'ESPACE DE TETE (HS) .....	98
FIGURE II - 4 - PRINCIPE DE LA MICROEXTRACTION SUR PHASE SOLIDE DANS L'ESPACE DE TETE (HS- SPME) .....	100
FIGURE II - 5 - MONTAGE DE L'EXTRACTION PAR SORPTION DANS L'ESPACE DE TETE (HSSE) .....	102
FIGURE II - 6 - PRINCIPE DE L'EXTRACTION PAR SORPTION DANS L'ESPACE DE TETE (HSSE) .....	102
FIGURE II - 7 - PRINCIPE DE LA MICROEXTRACTION LIQUIDE SUR UNE GOUTTE DANS L'ESPACE DE TETE (HS-SDME).....	104
FIGURE II - 8 - EXPERIENCES POUR UN PLAN FACTORIEL COMPLET 2 <sup>2</sup> .....	107
FIGURE II - 9 - PLAN COMPOSITE POUR DEUX FACTEURS .....	110
FIGURE II - 10 - SURFACES DE REPONSES POUR UN MODELE QUADRATIQUE A DEUX VARIABLES. (A) MAXIMUM, (B) MINIMUM ET (C) MAXIMUM HORS DU DOMAINE D'ETUDE [16] .....	111
FIGURE II - 11 - PROGRAMME DE TEMPERATURE APPLIQUE AU FOUR DE LA GC.....	112
FIGURE II - 12 - METHODOLOGIE D'INTEGRATION UTILISEE POUR L'ETALONNAGE .....	117
FIGURE II - 13 - PLANTES ETUDIEES .....	117
FIGURE II - 14 - LIGNEE CELLULAIRE UTILISEE POUR LES TESTS BIOLOGIQUES.....	118
FIGURE II - 15 - PRINCIPE DE LA FOCALISATION HYDRODYNAMIQUE DANS UN CYTOMETRE .....	120
FIGURE II - 16 - DIFFRACTION DE LA LUMIERE PAR LA CELLULE (A) ET SCHEMA D'UN CYTOGRAMME PERMETTANT LA DIFFERENCIATION DE DIFFERENTES CELLULES (B) .....	121
FIGURE II - 17 - PRINCIPE GENERAL DE LA CYTOMETRIE EN FLUX.....	122
FIGURE II - 18 - PRINCIPE DU TEST ANTI-INFLAMMATOIRE BASE SUR L'INHIBITION DE LA SECRETION DU TNF- $\alpha$ .....	123
FIGURE II - 19 - FOCALISATION HYDRODYNAMIQUE DANS UN MICRO-CAPILLAIRE.....	124

## CHAPITRE III

FIGURE III - 1 - THE EFFECT OF EXTRACTION TIME (A), EXTRACTION TEMPERATURE (B), NUMBER OF CYCLES (C), AND SOLVENT (D) ON THE EFFICIENCIES OF EXTRACTION OF 16 CHARACTERISTICS TERPENOIDS FROM NUTMEG BY PLE .....	137
FIGURE III - 2 - THE EFFECT OF EXTRACTION TIME (A), EXTRACTION TEMPERATURE (B) AND STIRRING SPEED (C) ON THE EFFICIENCIES OF EXTRACTION OF 16 CHARACTERISTICS TERPENOIDS FROM NUTMEG BY HEADSPACE.....	138
FIGURE III - 3 - STRUCTURES OF THE 28 STANDARDS USED FOR THE QUANTIFICATION ANALYSIS ....	143

FIGURE III - 4 - GC/MS TOTAL ION CHROMATOGRAMS FOR NUTMAG EXTRACTS OBTAINED BY HS EXTRACTION (A), HYDRODISTILLATION (B) AND PLE (C). (1) SABINENE; (2) $\Gamma$ -TERPINENE; (3) 4- TERPINEOL; (4) $\alpha$ -TERPINEOL; (5) SAFROLE; (6) METHYL EUGENOL; (7) MYRISTICINE .....	144
FIGURE III - 5 - INFLUENCE DE L'AJOUT OU NON D'UN SOLVANT D'EXTRACTION SUR L'EXTRACTION DES TERPENES VOLATILS DANS LA MUSCADE PAR HSSE (80 MG DE MUSCADE, 1 HEURE D'EXTRACTION A 40 °C SOUS AGITATION A 250 RPM, 30 MIN DE DESORPTION DANS 100 $\mu$ L D'ETHANOL) .....	159
FIGURE III - 6 - INFLUENCE DE LA VITESSE D'AGITATION SUR L'EXTRACTION DES TERPENES VOLATILS DANS LA MUSCADE PAR HSSE (80 MG DE MUSCADE, 1 HEURE D'EXTRACTION A 40 °C, 30 MIN DE DESORPTION DANS 100 $\mu$ L D'ETHANOL).....	160
FIGURE III - 7 - INFLUENCE DU TEMPS DE DESORPTION DES TERPENES VOLATILS DE LA MUSCADE ABSORBES SUR LE BARREAU APRES EXTRACTION (80 MG DE MUSCADE, 1 HEURE D'EXTRACTION A 80 °C A 250 RPM, 30 MIN DE DESORPTION DANS 100 $\mu$ L DE SOLVANT).....	161
FIGURE III - 8 - INFLUENCE DU SOLVANT DE DESORPTION DES TERPENES VOLATILS DE LA MUSCADE ABSORBES SUR LE BARREAU APRES EXTRACTION (80 MG DE MUSCADE, 1H30 D'EXTRACTION A 80 °C A 250 RPM, 30 MIN DE DESORPTION DANS 100 $\mu$ L D'ETHANOL).....	162
FIGURE III - 9 - TOTAL ION CHROMATOGRAM OBTAINED FOR NUTMEG EXTRACTS BY (A) SPME AND (B) HSSE. SELECTED COMPOUNDS FOR THE OPTIMIZATION BY EXPERIMENTAL DESIGN. 1, $\alpha$ PINENE; 2, $\beta$ PINENE; 3, SABINENE; 4, $\beta$ CARENE; 5, $\beta$ -MYRCENE; 6, $\alpha$ PHELLANDRENE; 7, $\beta$ CARENE; 8, LIMONENE; 9, $\beta$ -PHELLANDRENE; 10, $\Gamma$ -TERPINENE; 11, $p$ -CYMENE; 12, TERPINOLENE; 13, $\alpha$ -CUBEBENE; 14, COPAENE; 15, LINALOOL; 16, BORNYL ACETATE; 17, 4-TERPINEOL; 18, CARYOPHYLLENE; 19, $\alpha$ -TERPINEOL; 20, $\alpha$ -TERPINEOL ACETATE; 21, GERANYL ACETATE; 22, $\Delta$ -CADINENE; 23, SAFROLE; 24, METHYL EUGENOL; 25, EUGENOL; 26, ISOEUGENOL METHYL ETHER; 27, ELEMICIN; 28, MYRISTICINE .....	168
FIGURE III - 10 - CONTOUR PLOTS FROM THE FACE CENTERED DESIGN OF SPME EXTRACTS OF NUTMEG SHOWING THE EFFECT OF EXTRACTION TEMPERATURE AND EXTRACTION TIME ON THE OVERALL DESIRABILITY.....	173
FIGURE III - 11 - CONTOUR PLOTS FROM THE FACE CENTERED DESIGN OF HSSE EXTRACTS OF NUTMEG SHOWING THE EFFECT OF EXTRACTION TEMPERATURE AND EXTRACTION TIME ON THE OVERALL DESIRABILITY .....	176
FIGURE III - 12 - QUALITATIVE COMPARATIVE STUDY BETWEEN SPME AND HSSE FOR THE EXTRACTION OF TERPENOIDES FROM SEVEN DIFFERENT FOOD MATRICES.....	181
FIGURE III - 13 - STRUCTURES OF THE 28 STANDARDS USED FOR THE QUANTIFICATION ANALYSIS ..	185

## CHAPITRE IV

FIGURE IV - 1 - DEMARCHE D'ANALYSE DES RESULTATS OBTENUS PAR CYTOMETRIE EN FLUX POUR L'EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE .....	201
FIGURE IV - 2 - CYTOGRAMMES DES CONTROLES POSITIFS ET NEGATIFS UTILISES POUR EVALUER L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DES EXTRAITS.....	202
FIGURE IV - 3 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE LPS SUR LA SECRETION DE TNF-A (I) ET SUR LA MORT CELLULAIRE (II) (TEST DE TUKEY, A=0,05).....	202
FIGURE IV - 4 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL DANS LE MILIEU CELLULAIRE SUR LA SECRETION DE TNF-A (I) ET SUR LA MORT CELLULAIRE (II) (TEST DE TUKEY, A=0,05) .....	203
FIGURE IV - 5 - ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE (I) ET TOXICITE (II) DES EXTRAITS DE PLANTES OBTENUS PAR PLE DILUES PAR 5 (N=3, TEST DE STUDENT, COMPARE AU CONTROLE NEGATIF CONTENANT 1 % D'ETHANOL, A=0,05, * 0,01<p<0,05 ; ** 0,001<p<0,01 ; *** p<0,001) .....	209
FIGURE IV - 6 - ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE (I) ET TOXICITE (II) DES EXTRAITS DE PLANTES OBTENUS PAR HSSE DILUES PAR 10 (N=3, TEST DE STUDENT COMPARE AU CONTROLE NEGATIF CONTENANT 1 % D'ETHANOL, A=0,05, * 0,01<p<0,05 ; ** 0,001<p<0,01 ; *** p<0,001) .....	210
FIGURE IV - 7 - COURBE EFFET-DOSE DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DU PULEGONE (N=3) ...	211
FIGURE IV - 8 - COURBE EFFET-DOSE DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DU MENTHOL (N=3) ....	212
FIGURE IV - 9 - COURBE EFFET-DOSE DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DE L'EUGENOL (N=3) .	213
FIGURE IV - 10 - ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE (I) ET TOXICITE (II) DE L'EXTRAIT DE CLOU DE GIROFLE DILUE PAR 10 OBTENU PAR PLE (N=3, TEST DE STUDENT COMPARE AU CONTROLE NEGATIF CONTENANT 1 % D'ETHANOL, A=0,05, * 0,01<p<0,05 ; ** 0,001<p<0,01 ; *** p<0,001) .....	215

## CHAPITRE V

FIGURE V - 1 - STRUCTURES DES LIQUIDES IONIQUES UTILISES POUR L'EXTRACTION DES TERPENES VOLATILS DANS LA MUSCADE.....	221
FIGURE V - 2 - CHROMATOGRAMMES D'EXTRAITS DE MUSCADE OBTENUS PAR EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE AVEC DIFFERENTS LIQUIDES IONIQUES (10 MIN AUX ULTRASONS, ANALYSE PAR HS-GC-MS).....	222
FIGURE V - 3 - CHROMATOGRAMMES D'EXTRAITS DE MUSCADE OBTENUS PAR EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE AVEC DIFFERENTS DESS.....	227
FIGURE V - 4 - CHROMATOGRAMMES D'EXTRAITS DE MUSCADE OBTENUS PAR HS-SDME AVEC DIFFERENTS DESS.....	231
FIGURE V - 5 - ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE L'AGITATION DE L'ECHANTILLON SUR L'EXTRACTION DES TERPENES VOLATILS DANS LA MUSCADE PAR DES-HS-SDME .....	233

FIGURE V - 6 - TOTAL ION CHROMATOGRAM OBTAINED FOR NUTMEG EXTRACTS BY DES-HS-SDME. SELECTED COMPOUNDS FOR THE OPTIMIZATION BY DESIGN OF EXPERIMENTS. 1, $\alpha$ -PINENE; 2, B-PINENE; 3, SABINENE; 4, 3-CARENE; 5, $\alpha$ -PHELLANDRENE; 6, 4-CARENE; 7, LIMONENE; 8, $\Gamma$ -TERPINENE; 9, P-CYMENE; 10, TERPINOLENE; 11, TRANS-SABINENE HYDRATE; 12, COPAENE; 13, LINALOOL; 14, 1-TERPINEOL; 15, BORNYL ACETATE; 16, 4-TERPINEOL; 17, 4-TERPINEOL ACETATE; 18, B-TERPINEOL; 19, (E)-B-FARNESENE; 20, $\alpha$ -TERPINEOL; 21, TRANS-PIPERITOL; 22, SAFROLE; 23, METHYL EUGENOL; 24, EUGENOL; 25, ISOEUGENOL METHYL ETHER; 26, ELEMICIN; 27, MYRISTICINE.....	239
FIGURE V - 7 - STRUCTURES OF THE 29 STANDARDS USED FOR THE QUANTIFICATION ANALYSIS .....	242
FIGURE V - 8 - SCREENING OF DESS FOR THE EXTRACTION OF TERPENES FROM NUTMEG. (A) INCREASING THE ALKYL CHAIN OF THE HBD. (B) CHANGING THE CHEMICAL NATURE OF THE HBD. (C) CHANGING THE CHEMICAL NATURE OF THE HBA. (D) OTHER NATURES OF DESS ....	244
FIGURE V - 9 - CONTOUR PLOTS OF THE OVERALL DESIRABILITY FOR DES-HS-SDME AS A FUNCTION OF EXTRACTION TEMPERATURE AND EXTRACTION TIME FOR THE EXTRACTION OF TERPENES FROM NUTMEG BY DES-HS-SDME USING N <sub>4444</sub> BR/DODECANOL (1:2) AS EXTRACTING SOLVENT .....	249
FIGURE V - 10 - CHROMATOGRAMS OF THE SPICES EXTRACTS WITH THE IDENTIFICATION OF THEIR MAIN CONSTITUENTS (SCALED IS ADAPTED TO SHOW ONLY THE PEAKS WITH THE HIGHEST INTENSITY).....	252
FIGURE V - 11 - COMPARAISON DE L'ANALYSE QUALITATIVE DES EXTRAITS D'EPICES OBTENUS PAR SIX METHODES D'EXTRACTION DIFFERENTES .....	258
FIGURE V - 12 - COMPARAISON DE L'ANALYSE QUANTITATIVE D'EXTRAITS DE MUSCADE OBTENUS PAR SIX DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION .....	261
FIGURE V - 13 - COMPARAISON DE L'ANALYSE QUALITATIVE DES EXTRAITS DE PLANTES OBTENUS PAR TROIS METHODES D'EXTRACTION DIFFERENTES : LA PLE, LA HSSE ET LA DES-HS-SDME ....	264



---

## LISTE DES TABLEAUX

---





## LISTE DES TABLEAUX

## CHAPITRE I

TABLEAU I - 1 - MONOTERPENES ACYCLIQUES, MONOCYCLIQUES ET BICYCLIQUES ETUDIES POUR LEURS ACTIVITES ANALGESIQUE, ANTI-INFLAMMATOIRE ET ANTI-TNF-A .....	64
TABLEAU I - 2 - COMPARAISON DES AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES METHODES DE MICROEXTRACTION A PARTIR DE LA LITTERATURE (ADAPTE DE YANG ET AL. [64]) .....	79

## CHAPITRE II

TABLEAU II - 1 - CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DES ETALONS UTILISES POUR L'ANALYSE QUANTITATIVE .....	115
--	-----

## CHAPITRE III

TABLE III - 1 - CALIBRATION PARAMETERS OF STANDARDS FOR LIQUID INJECTION: RETENTION INDEX (RI), ION EXTRACTED FROM THE TIC ANALYSIS, CONCENTRATION RANGES, SLOPE OF THE LINEAR CALIBRATION CURVE, COEFFICIENT OF DETERMINATION (R <sup>2</sup> ), LIMIT OF DETECTION (LOD) AND LIMIT OF QUANTIFICATION (LOQ) .....	139
TABLE III - 2 - CALIBRATION PARAMETERS OF STANDARDS FOR HS INJECTION: RETENTION INDEX (RI), ION EXTRACTED FROM THE TIC ANALYSIS, CONCENTRATION RANGES, SLOPE OF THE LINEAR CALIBRATION CURVE, COEFFICIENT OF DETERMINATION (R <sup>2</sup> ), LIMIT OF DETECTION (LOD) AND LIMIT OF QUANTIFICATION (LOQ) .....	141
TABLE III - 3 - CHEMICAL COMPOSITION OF NUTMEG EXTRACTS OBTAINED USING THREE EXTRACTION PROCEDURES. QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS .....	145
TABLE III - 4 - CHEMICAL COMPOSITION OF THYME EXTRACTS OBTAINED USING THREE EXTRACTION PROCEDURES. QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS .....	147
TABLE III - 5 - CHEMICAL COMPOSITION OF ORANGE PEELS EXTRACTS OBTAINED USING THREE EXTRACTION PROCEDURE. QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS .....	149
TABLE III - 6 - CHEMICAL COMPOSITION OF CLOVE EXTRACTS OBTAINED USING THREE EXTRACTION PROCEDURE. QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS .....	153
TABLE III - 7 - CHEMICAL COMPOSITION OF CUMIN EXTRACTS OBTAINED USING THREE EXTRACTION PROCEDURE. QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS .....	154
TABLE III - 8 - CHEMICAL COMPOSITION OF CINNAMON EXTRACTS OBTAINED USING THREE EXTRACTION PROCEDURE. QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS .....	156
TABLE III - 9 - CHEMICAL COMPOSITION OF FENNEL SEEDS EXTRACTS OBTAINED USING THREE EXTRACTION PROCEDURE. QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS .....	157

TABLE III - 10 - SIGNIFICANT REGRESSION COEFFICIENTS AND FITTING PARAMETERS FOR ALL 28 RESPONSES OF THE 24 FULL FACTORIAL DESIGN FOR SPME EXTRACTION CONDITIONS .....	170
TABLE III - 11 - SIGNIFICANT REGRESSION COEFFICIENTS AND FITTING PARAMETERS FOR ALL 28 RESPONSES OF THE 23 FULL FACTORIAL DESIGN FOR HSSE EXTRACTION CONDITIONS.....	173
TABLE III - 12 - CALIBRATION PARAMETERS OF STANDARDS FOR SPME AND HSSE: RETENTION INDEX (RI), ION EXTRACTED FROM THE TIC ANALYSIS, RELATIVE STANDARD DEVIATION (RSD) CALCULATED ON A 3 µG/G STANDARD MIXTURE, CONCENTRATION RANGES, COEFFICIENT OF DETERMINATION (R <sup>2</sup> ), AND L .....	178
TABLE III - 13 - QUANTITATIVE COMPARATIVE STUDY BETWEEN SPME AND HSSE FOR THE EXTRACTION OF TERPENOIDES FROM SEVEN DIFFERENT SPICES. CONCENTRATIONS (µG/G) OF TERPENOIDES. ....	182
TABLE III - 14 - SIGNIFICANT REGRESSION COEFFICIENTS AND FITTING PARAMETERS FOR ALL 28 RESPONSES OF THE 22 FACE CENTERED DESIGN FOR SPME EXTRACTION CONDITIONS .....	186
TABLE III - 15 - SIGNIFICANT REGRESSION COEFFICIENTS AND FITTING PARAMETERS FOR ALL 28 RESPONSES OF THE 22 FACE CENTERED DESIGN FOR HSSE EXTRACTION CONDITIONS.....	187
TABLE III - 16 - COMPOSITION OF CINNAMON EXTRACTS OBTAINED BY SPME AND HSSE.....	188
TABLE III - 17 - COMPOSITION OF CUMIN EXTRACTS OBTAINED BY SPME AND HSSE.....	188
TABLE III - 18 - COMPOSITION OF FENNEL SEEDS EXTRACTS OBTAINED BY SPME AND HSSE .....	189
TABLE III - 19 - COMPOSITION OF CLOVE EXTRACTS OBTAINED BY SPME AND HSSE.....	189
TABLE III - 20 - COMPOSITION OF NUTMEG EXTRACTS OBTAINED BY SPME AND HSSE.....	190
TABLE III - 21 - COMPOSITION OF THYME EXTRACTS OBTAINED BY SPME AND HSSE.....	192

## CHAPITRE IV

TABLEAU IV - 1 - COMPOSITION DES EXTRAITS DE CALMINTHA NEPETA OBTENUS PAR PLE ET PAR HSSE .....	205
TABLEAU IV - 2 - COMPOSITION DES EXTRAITS DE ASARUM EUROPÆUM OBTENUS PAR PLE ET PAR HSSE .....	205
TABLEAU IV - 3 - COMPOSITION DES EXTRAITS DE MENTHA PIPERITA OBTENUS PAR PLE ET PAR HSSE .....	205
TABLEAU IV - 4 - COMPOSITION DES EXTRAITS DE THYMUS VULGARIS OBTENUS PAR PLE ET PAR HSSE .....	206
TABLEAU IV - 5 - VALEURS DES EC <sub>50</sub> DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE ET DE LA TOXICITE DES DIFFERENTS TERPENOÏDES VOLATILS ETUDIES.....	213
TABLEAU IV - 6 – CONCENTRATIONS (EN MM) EN PULEGONE ET EN MENTHOL DANS LES EXTRAITS DE PLANTES APRES DILUTIONS AU CONTACT DES CELLULES.....	214

## CHAPITRE V

TABLE V - 1 - COMBINAISONS DE HBA ET HBD TESTES POUR SYNTHETISER DIFFERENTS DES .....	224
TABLE V - 2 - COEFFICIENTS DE VARIATION (RSD) DE DIFFERENTS TERPENES VOLATILS DANS DIFFERENTES CONDITIONS D'EXTRACTION ASSISTEE PAR ULTRASONS COUPLEE AUX DESs (1:1) (N=8).....	229
TABLE V - 3 - COEFFICIENTS DE VARIATION (RSD) DE L'EXTRACTION DE DIFFERENTS TERPENES VOLATILS PAR DES-HS-SDME (N=6).....	231
TABLE V - 4 - LIST OF SYNTHETIZED DES AND THEIR CHEMICAL STRUCTURES.....	237
TABLE V - 5 - FACTORS AND LEVELS USED IN 2 <sup>4</sup> FULL FACTORIAL DESIGN.....	245
TABLE V - 6 - VALIDATION OF THE MODEL'S FITNESS (EXPLAINED VARIATIONS (R <sup>2</sup> ) AND LACK OF FIT (LOF) OF THE 2 <sup>4</sup> FULL FACTORIAL DESIGN SCREENING THE INFLUENCE OF THE EXTRACTION PARAMETERS (EXTRACTION TEMPERATURE (T), EXTRACTION TIME (TEXT), DROP VOLUME (V) AND SAMPLE MASS (M)) OF DES-HS-SDME .....	246
TABLE V - 7 - FACTORS AND LEVELS USED IN 2 <sup>2</sup> FACE CENTERED DESIGN.....	247
TABLE V - 8 - VALIDATION OF THE MODEL'S FITNESS (EXPLAINED VARIATIONS (R <sup>2</sup> ), PREDICTED VARIATION (Q <sup>2</sup> ) AND LACK OF FIT (LOF) OF THE 22 FACE CENTERED DESIGN DETERMINING THE OPTIMAL EXTRACTION CONDITIONS (EXTRACTION TEMPERATURE (T) AND EXTRACTION TIME (TEXT)) OF DES-HS-SDME.....	248
TABLE V - 9 - CALIBRATION PARAMETERS OF STANDARDS FOR DES-HS-SDME: RETENTION INDEX (RI), SLOPE, ION EXTRACTED FROM THE TIC ANALYSIS, RELATIVE STANDARD DEVIATION (RSD) CALCULATED ON A 10 µG/G STANDARD MIXTURE, CONCENTRATION RANGES, COEFFICIENT OF DETERMINATION (R <sup>2</sup> ), AND LIMIT OF QUANTIFICATION (LOQ).....	250
TABLE V - 10 - QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE SPICES EXTRACTS OBTAINED BY DES-HS-SDME.....	253
TABLE V - 11 - AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTIONS EN FONCTIONS DES OBJECTIFS DE L'ETUDE .....	260
TABLE V - 12 - COMPOSITION DE L'EXTRAIT DE CALAMINTHA NEPETA OBTENU PAR DES-HS-SDME .....	262
TABLE V - 13 - COMPOSITION DE L'EXTRAIT D'ASARUM EUROPAEUM OBTENU PAR DES-HS-SDME	262
TABLE V - 14 - COMPOSITION DE L'EXTRAIT DE MENTHA PIPERITA OBTENU PAR DES-HS-SDME ...	263
TABLE V - 15 - COMPOSITION DE L'EXTRAIT DE THYMUS VULGARIS OBTENU PAR DES-HS-SDME .	264



---

## ABREVIATIONS

---



## ABREVIATIONS

ANOVA	Analyse de la variance, <i>Analysis Of Variance</i>
ASE	Extraction accélérée par solvant, <i>Accelerated Solvent Extraction</i>
CAR	Carboxen
CIFRE	Conventions Industrielles de Formation pour la Recherche
DES	Solvant eutectique profond, <i>Deep Eutectic Solvent</i>
DLLME	Microextraction liquide liquide dispersive, <i>Dispersive Liquid Liquid Microextraction</i>
DMAPP	Diméthylallyldiphosphate
DRS	Département recherches subatomiques
DVB	Divinylbenzène
DXP	1-désoxyxylulose-5-phosphate
EC <sub>50</sub>	Concentration efficace médiane, <i>half maximum Effective Concentration</i>
FBS	Sérum de veau fœtal, <i>Fetal Bovine Serum</i>
FPP	Diphosphate de farnésyle, <i>Farnesyl diphosphate</i>
FSC	Diffusion frontale, <i>Forward Scatter</i>
GAP	Glycéraldéhyde-3-phosphate
GC	Chromatographie en phase gazeuse, <i>Gas Chromatography</i>
GGPP	Disphosphate de géranyle géranyle, <i>Geranyl Geranyl diphosphate</i>
GPP	Diphosphate de géranyle, <i>Geranyl diphosphate</i>
HBA	Accepteur de liaison hydrogène, <i>Hydrogen Bond Acceptor</i>
HBD	Donneur de liaison hydrogène, <i>Hydrogen Bond Donor</i>
HD	Hydrodistillation
HF-LPME	Microextraction en phase liquide assistée par fibre creuse, <i>Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction</i>
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance, <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HS	Extraction dans l'espace de tête, <i>Headspace extraction</i>
HSSE	Extraction par sorption dans l'espace de tête, <i>Headspace Sorptive Extraction</i>
IASP	Association internationale pour l'étude de la douleur, <i>International Association for the Study of Pain</i>
IL	Interleukine
IL	Liquide ionique, <i>Ionic Liquid</i>
IPHC	Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien
IPP	Isopentényldiphosphate
LOD	Limite de détection, <i>Limit Of Detection</i>
LoF	Défaut d'ajustement, <i>Lack of Fit</i>
LOQ	Limite de quantification, <i>Limit Of Quantification</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MEP	Méthylérythritol phosphate
MS	Spectromètre de masse, <i>Mass spectrometer</i>
MVA	Mévalonate ou acide mévalonique
N <sub>4444</sub> Br	Bromure de tétrabutylammonium
NIST	Institut national des normes et de la technologie, <i>National Institute of Standards and Technology</i>
OVAT	Une variable à la fois, <i>One-variable-at-a-time</i>



PAMP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes, <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	Tampon phosphate salin, <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PE	<i>R</i> -phycoérythrine
PLE	Extraction par liquide pressurisé, <i>Pressurized Liquid Extraction</i>
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
RI	Indice de rétention, <i>Retention Index</i>
RPM	Tours par minute, <i>Rounds Per Minute</i>
RPMI	Institut commémoratif de Roswell Park, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSD	Coefficient de variation, <i>Relative Standard Deviation</i>
SAFE	Évaporation d'arôme assistée par solvant, <i>Solvent Assisted Flavor Evaporation</i>
SBSE	Extraction par sorption sur barreau magnétique, <i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>
SDME	Microextraction liquide sur une goutte, <i>Single Drop Microextraction</i>
SFE	Extraction par un fluide supercritique, <i>Supercritical Fluid Extraction</i>
SPME	Microextraction sur phase solide, <i>Solid Phase Microextraction</i>
SS	Somme des carrés, <i>Sum of Squares</i>
SSC	Diffusion latérale, <i>Side Scatter</i>
TDU	Unité de désorption thermique, <i>Thermal Desorption Unit</i>
TIC	Chromatogramme total d'ions, <i>Total Ion Chromatogram</i>
TNF	Facteur de nécrose tumorale, <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TPS	Terpènes Synthases
GPPS	Diphosphate de géranyle synthase, <i>Geranyl diphosphate Synthase</i>
FPPS	Diphosphate de farnésyle synthase, <i>Farnesyl diphosphate Synthase</i>
GGPPS	Diphosphate de géranyle géranyle synthase, <i>Geranyl Geranyl diphosphate Synthase</i>
LPP	Diphosphate de linalyle, <i>Linalyl diphosphate</i>
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux, <i>Food and Drug Administration</i>
UAE	Extraction assistée par ultrasons, <i>Ultrasound-Assisted Extraction</i>
MAE	Extraction assistée par microondes, <i>Microwaves-Assisted Extraction</i>
ME	Microextraction
ChCl	Chlorure de choline, <i>Choline Chloride</i>
NADES	Solvant eutectique profond naturel, <i>Natural Deep Eutectic Solvent</i>
ATCC	Collection de cultures américaine, <i>American Type Culture Collection</i>
NS	Non significatif, <i>Not significant</i>
C <sub>2</sub> mim	1-éthyl-3-méthylimidazolium
C <sub>4</sub> mim	1-butyl-3-méthylimidazolium
C <sub>6</sub> mim	1-hexyl-3-méthylimidazolium
N <sub>8881</sub> Cl	Chlorure de méthyltrioctylammonium

---

# INTRODUCTION GENERALE

---



## INTRODUCTION GENERALE

Une douleur est dite chronique lorsque la sensation de douleur revient épisodiquement et est persistante pendant au moins 3 mois (voir 6 mois dans certains cas) ou au-delà de la période de guérison prévue. Aujourd'hui, environ 30 % des adultes de la population française sont affectés par des douleurs chroniques. Souvent associée à la dépression, l'anxiété, les troubles du sommeil et une altération de la qualité de vie, la douleur chronique est devenue un enjeu de santé publique. Deux formes de douleur chronique peuvent être distinguées : les douleurs neuropathiques (lésion du système nerveux) et les douleurs inflammatoires (douleurs articulaires). La polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou encore les douleurs musculaires sont des exemples de douleurs inflammatoires chroniques. L'un des principaux messagers de l'inflammation est le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ). Le TNF- $\alpha$  est sécrété par les cellules du système immunitaire dans la minute qui suit l'agression. Lorsque le système immunitaire fonctionne correctement, le TNF- $\alpha$  possède une action positive et protège l'organisme. Cependant, lors d'une défaillance du système immunitaire, la persistance du TNF- $\alpha$  à des concentrations élevées contribue à une inflammation chronique. Les antalgiques utilisés généralement pour traiter les douleurs chroniques (morphine, opioïdes, antidépresseurs...) sont certes efficaces mais présentent souvent des effets secondaires à long terme non négligeables. Des traitements à base de médicaments anti-TNF- $\alpha$  ont aussi été développés. Inhiber la production du TNF- $\alpha$  permet de diminuer la cascade de la réponse inflammatoire et donc diminuer les symptômes de douleurs liés à l'inflammation. Des thérapies non pharmacologiques sont aussi utilisées pour soulager les douleurs chroniques comme par exemple l'acupuncture, l'hypnose, la kinésithérapie ou encore la psychologie. Cependant, de nouvelles thérapies efficaces sont toujours attendues. Pourquoi ne pas utiliser la biodiversité à notre disposition dans les produits d'origine naturelle afin de soulager ces douleurs chroniques ?

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet de thèse « TER-PAIN », réalisé en collaboration avec l'entreprise Benephyt et l'équipe de Chimie Analytique des Molécules Bioactives et Pharmacognosie (CAMPAB) de l'Université de Strasbourg.

L'étude porte sur l'activité anti-inflammatoire et anti-TNF- $\alpha$  des métabolites secondaires de deux plantes peu caractérisées : le *Calamintha nepeta* (L.) savi et l'*Asarum Europaeum* (L.). Parmi ces métabolites secondaires, les terpènes représentent l'une des plus grandes familles de molécules naturelles avec environ 70 000 structures connues aujourd'hui. Leur structure de base est composée d'unités de cinq carbones appelé isoprène, qui peut être assemblée par deux (monoterpène), par trois (sesquiterpène), par 4 (diterpène), par 5 (sesterpène)... Les monoterpènes, ainsi que certains sesquiterpènes, sont des composés très volatils et les principaux constituants de l'essence de la plante. De par leur grande diversité de structure chimique, les terpènes possèdent une grande variété de propriétés biologiques telles qu'antimicrobienne, antioxydante, anti-nociceptive, anti-inflammatoire...

De nombreux terpènes volatils ont aussi montré une capacité à inhiber la sécrétion du TNF- $\alpha$  suite à une agression *in vitro* et/ou *in vivo*. Ces molécules pourraient donc être utilisées comme anti-TNF- $\alpha$  dans le traitement des douleurs chroniques inflammatoires. Il apparaît donc important de développer une méthode d'extraction spécifique et robuste pour ces composés terpéniques, et plus particulièrement pour les monoterpènes et les sesquiterpènes volatils à partir de matière végétale.

Les méthodes d'extraction dites conventionnelles utilisées historiquement pour l'extraction des terpènes volatils à partir de matrice végétale sont la distillation et l'extraction par solvants non aqueux. Cependant, ces méthodes traditionnelles utilisent souvent un grand volume de solvant non respectueux de l'environnement, sont fastidieuses et ont un rendement d'extraction faible. De nouvelles techniques ont émergées au cours de la dernière décennie pour l'extraction spécifique des terpènes volatils, des techniques plus écoresponsables (sans solvant), plus rapides, abordables et souvent automatisées. Ces techniques d'extraction peuvent être séparées en deux types : les méthodes dites non conventionnelles (extraction par fluide supercritique, extraction assistée par ultrasons, extraction par solvant pressurisé...) et les méthodes de microextraction. L'avantage majeur des méthodes de microextraction par rapport aux méthodes d'extraction non conventionnelles est leur sélectivité par rapport aux molécules ciblées. En effet, elles peuvent être mises en place directement dans l'espace de tête de l'échantillon ce qui permet d'augmenter significativement la sélectivité pour les molécules volatiles et semi-volatiles. Ainsi, l'extraction peut être réalisée sur l'échantillon sous sa forme solide, sans prétraitement nécessaire. Dans cette étude, trois méthodes de microextraction ont été sélectionnées pour l'extraction de terpènes volatils : la microextraction sur phase solide (SPME, Solide Phase Microextraction), l'extraction par sorption dans l'espace de tête (HSSE, Headspace Sorptive Extraction) ainsi que la microextraction liquide sur une goutte (SDME, Single Drop Microextraction). L'efficacité de ces trois méthodes de microextraction pour l'extraction des terpènes volatils a été comparée à celle de trois autres méthodes : l'hydrodistillation (HD), l'extraction par liquide pressurisé (PLE, Pressurized Liquid Extraction) et l'extraction dans l'espace de tête (HS, Headspace extraction).

En ce qui concerne les méthodes de microextraction dans l'espace de tête, les composés volatils vont s'absorber sur différentes phases : une fibre polymérique pour la HS-SPME, un barreau magnétique recouvert de polymère pour la HSSE et un solvant pour la HS-SDME. Les solvants utilisés classiquement en SDME sont le toluène, l'isooctane ou encore l'octanol, des solvants organiques suffisamment visqueux pour permettre la suspension de la goutte. Cependant ces solvants, même s'ils ont été utilisés en très faible quantité, sont pour la plupart toxiques pour l'environnement et peuvent représenter un danger pour l'être humain. Un enjeu actuel majeur de la chimie analytique est d'utiliser des procédés d'extraction « verts », respectueux de l'environnement et de la santé humaine. Dans cette étude, les solvants organiques classiques ont été remplacés par des solvants « verts » émergents appelés solvants eutectiques profonds (DES, Deep Eutectic Solvent). Ces nouveaux solvants, développés à partir du début des années 2000, sont constitués d'un mélange entre un accepteur de

liaison hydrogène et un donneur de liaison hydrogène dans un ratio molaire bien précis appelé point eutectique. A cette composition le mélange des composés est liquide à température ambiante, cela permet d'abaisser considérablement les températures de fusion de chacun des constituants du DES. Ces solvants peuvent être obtenus à partir de produits naturels, en particulier les métabolites primaires comme par exemple des sucres (glucose, sucrose...), des alcools (glycérol, sorbitol...), des acides organiques (acide malique, acide caféique...), des acides aminés (alanine, lysine...) ou encore des sels d'ammonium (chlorure de choline, bétaïne...). Le solvant obtenu est alors appelé solvant eutectique profond naturel (NADES, Naturel Deep Eutectic Solvent), il est non toxique, écoresponsable, très abordable et facile à synthétiser. De plus, ces solvants, souvent appelés « solvants sur mesure », possèdent des propriétés physico-chimiques facilement adaptables à l'application souhaitée en modifiant la nature chimique d'un des deux constituants. Ces nouveaux solvants se présentent alors comme une réelle alternative aux solvants organiques toxiques dans de nombreux domaines.

L'objectif de cette thèse est de développer une méthode robuste et efficace pour l'extraction des terpènes volatils dans deux plantes médicinales puis de mesurer l'activité anti-TNF- $\alpha$  *in vitro* des extraits terpéniques de ces mêmes plantes.

Ce manuscrit de thèse est structuré en 5 chapitres. Le premier est composé d'une étude bibliographique sur la douleur chronique inflammatoire et son mécanisme d'action, sur les terpènes et leur synthèse dans les plantes ainsi que sur les méthodes utilisées pour l'extraction des terpènes volatils. Le deuxième chapitre met en place tous les principes analytiques, chimiques et biologiques utilisés tout au long de la thèse pour répondre à la problématique. Le troisième chapitre présente une première comparaison des méthodes d'extraction. La première partie de chapitre concerne les trois méthodes d'extraction plus classiquement utilisées pour l'extraction des huiles dans les plantes (l'hydrodistillation et la PSE) et une méthode plus sélective pour les composés volatils (la HS). La deuxième partie présente la comparaison de deux méthodes d'extraction plus récentes : la HS-SPME et la HSSE. Le quatrième chapitre résume les résultats des tests biologiques *in vitro*, c'est-à-dire l'activité anti-inflammatoire des différents extraits de plantes. Enfin, le dernier chapitre expose une méthode d'extraction couramment utilisée pour l'extraction des composés volatils mais couplée à des solvants innovants. Dans ce chapitre, toutes les méthodes d'extraction utilisées dans la thèse seront comparées.



---

CHAPITRE I  
INTRODUCTION

---





## CHAPITRE I – INTRODUCTION

### I.1. LA DOULEUR CHRONIQUE

#### *I.1.1. Définition générale de la douleur chronique*

D'après l'Association Internationale pour l'étude de la douleur (IASP), la douleur est définie comme une « expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle, ou décrite en termes évoquant une telle lésion » [1]. La douleur est une sensation personnelle et subjective, elle peut être ressentie de manière différente selon les individus, mais aussi chez une même personne selon son environnement. La douleur a donc une double dimension : sensorielle et psychologique. La composante sensorielle représente la perception de la douleur qui dépend de la nature de l'agression, tandis que la dimension psychologique est fortement dépendante de l'individu et de son seuil de tolérance. Il existe deux types de douleur : la douleur aiguë et la douleur chronique. La douleur aiguë joue le rôle d'un signal d'alarme pour l'organisme face à une agression, elle fait partie de son système de défense. Un stimulus menaçant l'intégrité du corps va activer le déclenchement de réponses nociceptives, comme un comportement de retrait par exemple, en stimulant des terminaisons nerveuses spécifiques qui vont permettre de propager le signal de douleur le long des nerfs nocicepteurs pour ensuite le transmettre à la corne dorsale de la moelle épinière puis à la zone du cerveau impliquée dans le traitement de la douleur. La douleur aiguë est de courte durée, elle perdure durant le temps nécessaire à la guérison et disparaît dès lors que l'on supprime sa cause à l'aide de traitements adaptés. La douleur aiguë est par exemple la douleur ressentie lors d'une brûlure ou d'une fracture. Cependant, plus ces douleurs perdurent, plus elles risquent de devenir permanentes, on parle alors de douleur chronique. Une douleur est dite chronique lorsque la sensation de douleur revient épisodiquement et est persistante pendant au moins 3 mois (voir 6 mois dans certains cas) ou au-delà de la période de guérison prévue [2]. Cette douleur persiste même lorsque la cause a disparu. Son intensité peut diminuer, augmenter voir même disparaître et réapparaître sans vraiment en identifier sa cause, elle perd alors sa finalité de signal d'alarme. Les douleurs chroniques peuvent donc être dues à des douleurs aiguës mal soulagées mais elles peuvent aussi être la conséquence de séquelles non réparables ou encore de maladies à longue durée. Les migraines, l'arthrose, la polyarthrite rhumatoïde, la fibromyalgie ou encore toutes douleurs musculaires sont des exemples de douleurs chroniques. La douleur chronique est devenue un enjeu de santé publique. En effet, un sondage de 2011 recense qu'environ 30 % des adultes de la population française sont affectés par des douleurs chroniques qui ont des conséquences importantes sur la qualité de vie [3]. Ces douleurs peuvent conduire à une perte d'autonomie, à un handicap ou encore à un risque de dépression et ainsi contribuer à l'isolement de l'individu.

### *1.1.2. Classification des douleurs chroniques*

Trois grands types de douleurs chroniques peuvent être distingués : les douleurs neuropathiques, les douleurs inflammatoires, et les douleurs « dysfonctionnelles ».

- Les douleurs chroniques neuropathiques

Les douleurs chroniques neuropathiques sont dues à une lésion ou une maladie affectant le système nerveux somatosensoriel. Ce dernier répond à différents types de stimuli qui peuvent être tactiles, thermiques, nociceptifs ou proprioceptifs. L'atteinte au système somatosensoriel peut se caractériser par une hypoesthésie, une diminution de la sensibilité, mais aussi par une allodynie, douleur déclenchée par un stimulus qui est normalement non douloureux [4]. La cause de ces douleurs chroniques peut être une maladie métabolique comme par exemple une neuropathie diabétique, une tumeur, un traumatisme, une exposition à des toxines, une maladie héréditaire ou encore suite à une intervention chirurgicale (douleurs postopératoires).

- Les douleurs chroniques inflammatoires

Les douleurs chroniques inflammatoires recouvrent les douleurs associées aux phénomènes d'inflammation. Suite à une lésion tissulaire, les processus inflammatoires entraînent une hyperexcitabilité (sensibilisation) des nocicepteurs ce qui peut induire une hyperexcitabilité des systèmes nociceptifs centraux. Les douleurs liées à ces lésions sont donc associées à une stimulation persistante et excessive des récepteurs périphériques de la douleur, à savoir les nocicepteurs, c'est pourquoi elles sont également appelées « douleurs par excès de nociception ». Les douleurs postopératoires ainsi que les douleurs rhumatologiques sont des exemples de douleurs inflammatoires chroniques typiques.

- Les douleurs chroniques « dysfonctionnelles »

Les douleurs chroniques dites « dysfonctionnelles » sont des douleurs qui ne résultent ni d'une inflammation ni d'une lésion nerveuse évidente. Les mécanismes de ces douleurs sont encore mal connus. L'hypothèse la plus récente les lie à un dysfonctionnement des systèmes endogènes de modulation de la douleur. Elles regroupent des maladies complexes comme par exemple la fibromyalgie ou les troubles fonctionnels intestinaux.

Dans la suite de ce projet, seules les douleurs chroniques inflammatoires seront étudiées.

### *I.1.3. Acteurs des douleurs chroniques inflammatoires*

Suite à une agression mécanique (pression, étirement...), chimique ou thermique, les cellules sanguines (macrophages, lymphocytes, mastocytes...) vont libérer de nombreuses substances chimiques ayant différentes fonctions afin de répondre à l'agression et de protéger l'organisme.

#### *I.1.3.1 Mécanisme de la douleur*

Le cheminement du signal douloureux de la zone du stimulus au cerveau est complexe. Dans un premier temps, l'énergie du stimulus va être transformée en un message nerveux grâce aux nocicepteurs, les récepteurs sensoriels de la douleur. Les nocicepteurs peuvent être stimulés directement (stimuli mécanique ou thermique) ou indirectement suite à une inflammation par exemple. Dans ce dernier cas, les nocicepteurs sont stimulés par des algogènes (substances qui provoquent la douleur), comme par exemple les prostaglandines, l'histamine, la sérotonine ou encore les bradykinines, synthétisés par les cellules endommagées [5].

Une fois stimulés, ou « activés », les nocicepteurs, situés sur les terminaisons nerveuses d'un premier neurone du système nerveux périphérique, vont transmettre l'influx nerveux jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière au niveau de laquelle il fera synapse avec un second neurone du système nerveux central grâce à la libération d'un neurotransmetteur. L'influx nerveux part alors dans le second neurone et progresse dans la moelle. Au niveau du nerveu, le second neurone synapse avec un troisième neurone qui va transmettre l'influx nerveux à la région du cerveau qui correspond à la zone du corps ayant subi le stimulus : la douleur est alors localisée et perçue. Tout ce processus est appelé voie ascendante de la douleur : c'est la transmission du signal de la zone endommagée vers le cerveau.

Le message d'alarme de la douleur est véhiculé dans les neurones par différentes fibres. La nature de ces dernières varie selon leur taille, leur vitesse de conduction et leur quantité en myéline, une substance constituée de lipides qui recouvre les fibres pour les protéger et les isoler [6]. Ainsi l'information arrivera plus ou moins vite au cerveau suivant la fibre empruntée par l'influx nerveux, les fibres myélinisées conduisent plus vite l'information que les fibres amyéliniques par exemple. De même, plus le diamètre de la fibre est important, plus l'information sera conduite rapidement. Les différentes fibres permettent de différencier les douleurs perçues : une information transmise rapidement traduit une douleur aiguë et localisée tandis qu'une information transmise plus lentement reflète une sensation de douleur diffuse.

Toute voie ascendante s'accompagne d'une voie descendante. En effet, l'ascension de l'influx nerveux au cerveau va activer un neurone descendant du cerveau à la moelle épinière, les contrôles descendants diffus. Ces voies neuronales descendantes vont moduler la douleur selon deux voies différentes. Dans un premier temps, le neurone descendant va synthétiser et libérer des composés chimiques (sérotonine,

neuradrénaline...) qui vont permettre d'inhiber la communication entre le premier et le deuxième neurone ascendants en inhibant la libération de neurotransmetteur au niveau du premier neurone. A l'aide des mêmes substances chimiques, le neurone descendant permet aussi de moduler les interneuronnes de la corne dorsale de la moelle épinière, qui vont libérer des opiacés, notamment des enképhalines. Ces substances vont inhiber la libération de neurotransmetteur du premier neurone comme par exemple la substance P, un neuromodulateur pronociceptif [7], mais aussi inhiber la dépolarisation du second neurone empêchant ainsi l'influx nerveux d'arriver jusqu'au cerveau : la sensation de douleur est ainsi diminuée. C'est aussi selon un tel mécanisme qu'agissent les médicaments à base d'opioïdes comme la morphine par exemple [8].

La FIGURE I - 1 montre la voie ascendante ainsi que la voie descendante du mécanisme de la douleur.

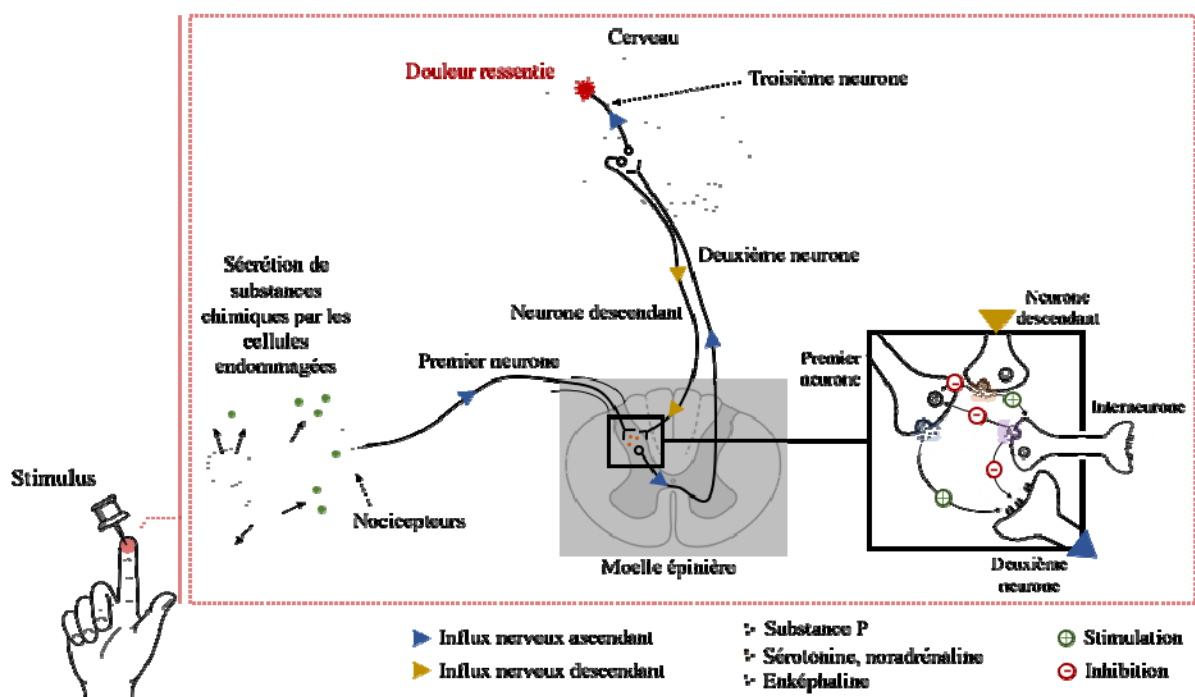


FIGURE I - 1 - Schéma simplifié du mécanisme de la douleur

Ainsi tant que l'inflammation persiste, les nocicepteurs sont stimulés et donc la douleur ressentie en continu, c'est une douleur chronique inflammatoire.

### I.1.3.2. Mécanisme de l'inflammation

L'inflammation est la somme des défenses mises en place par l'organisme contre une agression externe (infection, brûlure...) ou interne (cellules cancéreuses), c'est la mise en place du système immunitaire. Ce dernier va permettre de distinguer le « soi » du « non soi » afin de protéger l'organisme. Le « soi » est composé des cellules et des tissus de l'organisme tandis que le « non soi » fait référence aux agents étrangers à l'organisme, c'est-à-dire les microbes, les cellules tumorales...

Deux systèmes immunitaires peuvent être différenciés : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif ou acquis. Le premier est un mécanisme de défense non spécifique, qui permet une réponse locale et rapide contre les agents pathogènes tandis que le deuxième est un mécanisme de défense spécifique adapté au pathogène qui est plus lent à se mettre en place mais qui est doté de mémoire [9]. Suite à une agression, lésion tissulaire ou infection, la réponse immunitaire innée va avoir plusieurs rôles :

- Apporter des cellules immunitaires sur la zone atteinte
- Inactiver et/ou détruire les agents pathogènes invasifs
- Réparer la zone endommagée

Comme vu précédemment, le dommage tissulaire va être détecté par les nocicepteurs qui provoquent la sensation de douleur. De la même manière, cette même agression va être perçue par différents messagers de l'inflammation qui vont induire des réponses inflammatoires permettant de protéger l'organisme. Il existe deux types de messagers de l'inflammation, appelés médiateurs de l'inflammation : ceux circulant contenus dans le plasma (les protéines circulantes du sérum) et ceux provenant des cellules immunitaires (les cytokines). Les cellules immunitaires regroupent les cellules résidentes tissulaires (macrophages, mastocytes, cellules dendritiques) et les cellules sanguines circulantes telles que les monocytes et les lymphocytes (cellules de l'immunité adaptative). Les médiateurs de l'inflammation vont avoir pour but de remplir les différents rôles de la réponse immunitaire. L'inflammation est définie par quatre mots latins : calor (chaleur), dolor (douleur), rubor (rougeur) et tumor (tuméfaction). Ces symptômes sont directement liés aux effets des différents agents inflammatoires recrutés par le système immunitaire inné, c'est-à-dire les médiateurs de l'inflammation.

La FIGURE I - 2 montre un mécanisme simplifié de l'inflammation aiguë. Suite à une lésion tissulaire, des agents pathogènes peuvent pénétrer dans l'organisme. Ces corps étrangers vont exprimer à leur surface des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, Pathogen Associated Molecular Pattern) qui sont reconnus par les différentes cellules du système immunitaire inné possédant des récepteurs de reconnaissance de ces motifs moléculaires. Ce sont d'abord les cellules proches de l'agression qui vont se mobiliser pour protéger l'organisme. Les mastocytes, globules blancs présents dans les tissus, possèdent des récepteurs de reconnaissance des PAMPs et vont donc pouvoir détecter la présence de pathogènes qui ont infiltré l'organisme. Suite à la reconnaissance des agents pathogènes par leur PAMP, les mastocytes vont sécréter l'histamine, une molécule de signalisation du système immunitaire. L'histamine va engendrer une dilatation des vaisseaux sanguins (processus de vasodilatation) entraînant une augmentation du débit sanguin permettant ainsi un apport plus important de cellules immunitaires vers la zone endommagée. Cette augmentation du débit sanguin est responsable de la chaleur et de la rougeur de la zone inflammée. L'histamine va aussi provoquer une augmentation de la perméabilité vasculaire qui va avoir pour conséquence la formation de petites

brèches dues à la contraction des cellules endothéliales, cellules qui tapissent la paroi des vaisseaux sanguins.

Cette augmentation de la perméabilité vasculaire va permettre le transport des cellules immunitaires présentes dans le sang telles que les monocytes et les neutrophiles vers les tissus et plus précisément vers l'infiltration des pathogènes. Ce procédé de migration est appelé diapédèse. L'augmentation de la perméabilité vasculaire va aussi entraîner une infiltration des liquides plasmatiques et des protéines du sang vers les tissus causant ainsi un gonflement au niveau de la zone inflammée. Les monocytes, globules blancs présents dans le sang, vont se transformer en macrophages et en cellules dendritiques en passant dans les tissus biologiques. Les macrophages et les cellules dendritiques sont des phagocytes, aussi appelées « cellules mangeuses ». Tout comme les mastocytes, les phagocytes peuvent exprimer des récepteurs de reconnaissance des PAMPs du corps étranger leur permettant ainsi de reconnaître les agents pathogènes et de les détruire en les ingérant. Suite à la reconnaissance des corps étrangers, les macrophages vont sécréter des cytokines et notamment le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) et différentes interleukines et chimiokines. Ces cytokines vont avoir pour rôle de réguler l'inflammation en permettant une réparation des tissus endommagés. Les cellules immunitaires vont aussi sécréter des prostaglandines, des cytokines permettant d'activer les nocicepteurs et donc provoquer la sensation de douleur, lançant ainsi un signal d'alarme à l'organisme [5].

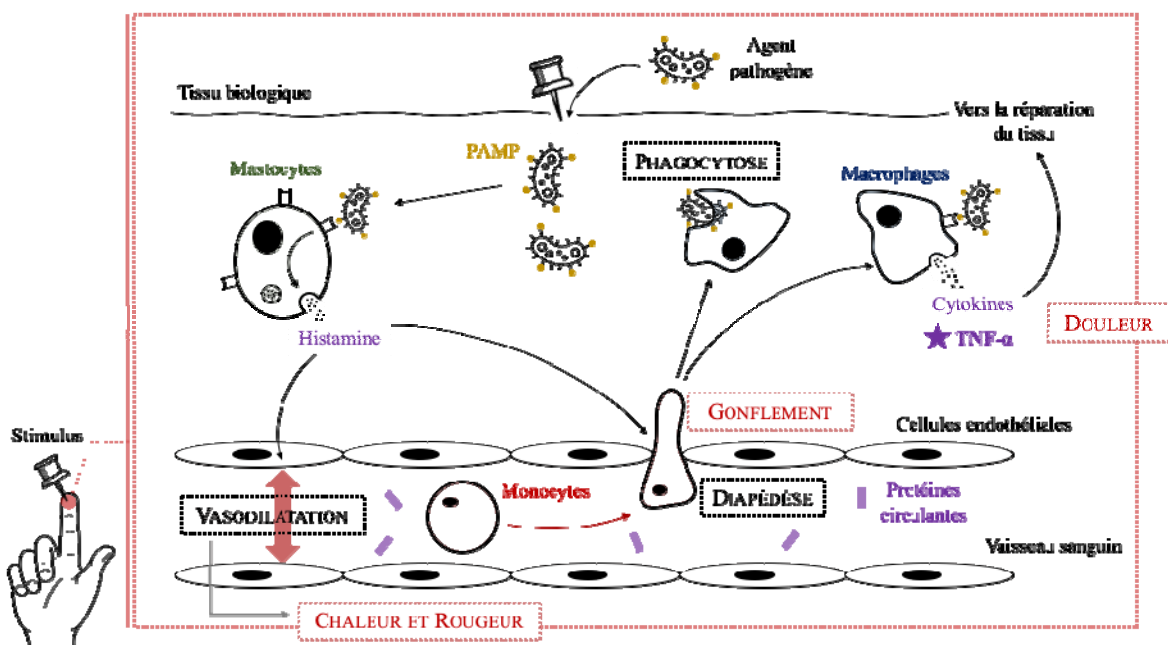


FIGURE I - 2 - Schéma simplifié du mécanisme de l'inflammation aiguë

Si l'inflammation persiste après l'intervention par le système immunitaire inné, le système immunitaire adaptatif peut être sollicité pour amplifier la réponse immunitaire en recrutant d'autres

molécules du système immunitaire, les lymphocytes. Le mécanisme du système immunitaire adaptatif ne sera pas présenté ici.

Lorsque tous les corps étrangers ont été éliminés par les cellules immunitaires, le système immunitaire retourne au repos. Des cytokines anti-inflammatoires vont remplacer les médiateurs pro-inflammatoires et inhiber leur sécrétion et leur action. Une fois que les cellules immunitaires ne sont plus requises sur le site inflammatoire, elles vont quitter le tissu ou mourir par apoptose (autodestruction cellulaire). C'est la phase de résolution de la réponse inflammatoire. La réaction inflammatoire devient chronique lorsqu'elle s'auto-entretient par notamment une hyper activation des cellules immunitaires ou encore la sécrétion intense de médiateurs pro-inflammatoires, correspondant à un échec de la résolution de l'inflammation aiguë. La cause de l'inflammation est alors maintenue localement et entretenue par les médiateurs inflammatoires, la douleur est alors ressentie de manière continue (FIGURE I - 3) [10].

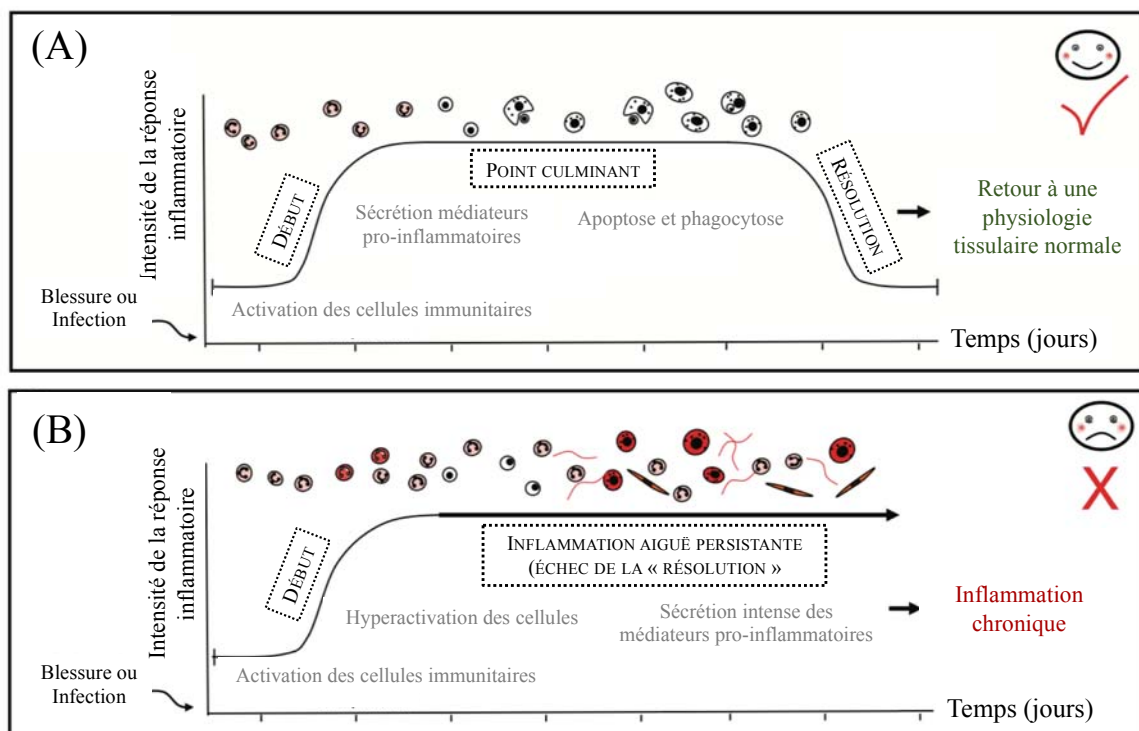


FIGURE I - 3 - Mécanismes de l'inflammation aiguë (A) et chronique (B) en fonction du temps (adapté de Serhan et al. [10])

Ainsi l'inhibition des médiateurs pro-inflammatoires, notamment des cytokines, permettrait un soulagement de cette douleur chronique inflammatoire.



### I.1.3.3. Les messagers de l'inflammation : les cytokines

Les cytokines sont des protéines qui peuvent être membranaires ou sécrétées suite à une stimulation. Chaque cytokine peut être synthétisée par plusieurs types cellulaires et agir sur un grand nombre de cellules cibles. Les cytokines sécrétées par les cellules immunitaires regroupent les chimiokines, le TNF- $\alpha$  et les interleukines. Ces cytokines peuvent avoir une action pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire sur leurs cellules cibles.

#### I.1.3.3.1. Les chimiokines

Les cytokines chimio-attractantes, aussi appelées chimiokines, sont de petites protéines ayant un poids moléculaire compris entre 8 et 12 kDa avec des séquences similaires et une structure commune maintenue par des ponts disulfures. Les chimiokines peuvent être classées en deux groupes fonctionnels, à savoir les chimiokines inflammatoires et les chimiokines homéostatiques. Les chimiokines inflammatoires sont produites lors du déclenchement de l'inflammation par les cellules résidentes de la zone inflammée en réponse à d'autres médiateurs pro-inflammatoires, mais aussi à la présence d'agents pathogènes dans l'organisme. La fonction principale des chimiokines est d'attirer les leucocytes, cellules immunitaires présentes dans le sang (monocytes, lymphocytes...), sur le site inflammatoire, à l'endroit où elles sont produites. Ce processus est appelé chimiotactisme. Ces chimiokines agissent lors de la réponse inflammatoire innée. Les chimiokines homéostatiques sont quant à elles exprimées dans la moelle osseuse et les tissus lymphoïdes, elles ont pour rôle de moduler la migration des cellules et jouent donc un rôle de surveillance immunitaire. Ces chimiokines agissent donc lors des réponses immunitaires adaptatives [11].

#### I.1.3.3.2. Les interleukines

Les interleukines sont produites par une large variété de cellules et chaque cellule peut synthétiser de nombreuses cytokines différentes. Malgré leur nom commun, les interleukines ne présentent aucune parenté fonctionnelle et biochimique les unes entre les autres. Elles sont classées par un numéro attribué lors de leur découverte. Ainsi cette famille de cytokines en constante augmentation s'étend pour l'instant de l'IL-1 (interleukines 1) à l'IL-40 (interleukines 40). En effet, l'IL-1 a été découverte au début des années 80 [12] tandis que l'IL-40 a été identifiée en 2017 [13]. Les interleukines ont toutes des rôles différents. Les interleukines sécrétées par les cellules du système immunitaire peuvent être pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires. L'IL-1 et l'IL-6 sont des interleukines pro-inflammatoires retrouvées en quantité abondante au sein de la zone inflammée. Après reconnaissance de PAMP, l'IL-1 est sécrétée par les leucocytes (monocytes, lymphocytes) mais aussi par les cellules endothéliales et les fibroblastes (cellules présentes dans les tissus biologiques). Cette interleukine agit directement sur les centres de l'hypothalamus (structure du système nerveux central) qui contrôlent la température corporelle afin d'induire la synthèse de prostaglandine qui est à

l'origine de la fièvre. L'IL-6 est produite par les phagocytes (macrophages et cellules dendritiques) et les cellules endothéliales en cas d'inflammation. Elle induit localement l'activation des phagocytes ainsi que la migration des monocytes sanguins vers les tissus et permet aussi d'activer la synthèse de molécules de la phase aiguë de l'inflammation au niveau du foie. L'IL-10 quant à elle est la principale interleukine anti-inflammatoire. Elle est produite par les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques mais aussi par les lymphocytes. Une de ses principales actions est la suppression des cellules Th1, un sous-type de lymphocyte qui produit des cytokines inflammatoires. De plus l'IL-10 inhibe la production de certaines cytokines produites par les cellules immunitaires. De par ses fonctions, l'IL-10 permet de réguler la réaction inflammatoire [14].

L'inflammation est donc un équilibre entre les interleukines pro-inflammatoires et les interleukines anti-inflammatoires, lorsque cet équilibre est perturbé, l'inflammation peut devenir chronique.

#### **I.1.3.3.3. Le facteur de nécrose tumorale $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

Historiquement, le facteur de nécrose tumorale (TNF) doit son nom à sa capacité à déclencher la nécrose de tumeurs. En effet, le Dr Williams B. Coley utilisait, dans les années 1890, des extraits bactériens bruts pour traiter les patients atteints de tumeurs. Il a ainsi découvert que les extraits bactériens avaient la capacité d'induire une nécrose tumorale. Cependant, ces régressions de tumeurs s'accompagnaient de réactions inflammatoires systématiques sévères chez les patients. Le principal stimulateur inflammatoire connu aujourd'hui pour provoquer cette réaction a alors été identifié en 1975 et a été nommé « facteur de nécrose tumorale » [15]. Les deux premiers membres de la famille des TNF à être identifiés sont le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et le facteur de nécrose tumorale  $\beta$  (TNF- $\beta$ ). Tous deux se lient aux mêmes récepteurs et ont des activités biologiques similaires mais ne sont pas produits par les mêmes cellules. En effet, le TNF- $\alpha$  est principalement sécrété par les macrophages et les monocytes mais aussi par les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules gliales (cellules qui forment l'environnement des neurones) tandis que le TNF- $\beta$  est essentiellement sécrété par les lymphocytes T, une catégorie de leucocytes qui jouent un rôle important dans la réponse immunitaire adaptative. Le TNF- $\alpha$  est l'une des premières cytokines sécrétées en réponse à un agent pathogène, elle est sécrétée dans la minute qui suit l'agression. Cette cytokine est capable d'exercer ses effets dans de nombreux organes et joue un rôle important dans la phase aiguë de l'inflammation [16]. Le TNF- $\alpha$  possède des propriétés pro-inflammatoires et des fonctions d'immuno-régulation. Suite à une lésion tissulaire provoquant une inflammation, la libération du TNF- $\alpha$  par les cellules immunitaires vues précédemment est stimulée par d'autres interleukines et notamment par l'IL-1. Le TNF- $\alpha$  joue alors un rôle pro-inflammatoire direct et indirect en stimulant la sécrétion d'autres médiateurs de l'inflammation tels que l'IL-1, l'IL-6 mais aussi les chimiokines. Le TNF- $\alpha$  permet ainsi de favoriser le recrutement et l'infiltration des cellules

immunitaires vers la zone infectée. Lorsque le système immunitaire fonctionne correctement, le TNF- $\alpha$  possède une action positive et protège l'organisme. Cependant, lors d'une défaillance du système immunitaire, la persistance du TNF- $\alpha$  à des concentrations élevées contribue à une inflammation chronique. Ainsi le TNF- $\alpha$  est largement impliqué dans les maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn.

Les endotoxines, des lipopolysaccharides (LPS) situées à la surface des membranes des bactéries qui se lient aux récepteurs membranaires des cellules immunitaires, peuvent induire la libération de cytokines pro-inflammatoires et principalement du TNF- $\alpha$  suite à une infection bactérienne [17]. Le TNF- $\alpha$  est alors l'une des principales cytokines responsables du choc septique, maladie liée à une défaillance circulatoire aiguë déclenchée par un agent infectieux et ayant un taux de mortalité élevé.

#### *1.1.4. Traitement des douleurs chroniques*

##### *1.1.4.1. Les traitements pour soulager les douleurs chroniques*

Différents traitements existent aujourd'hui afin de soulager la douleur chronique neuropathique ou inflammatoire suivant ses différentes composantes à savoir somatique, psychologique et sociale. Les moyens thérapeutiques utilisés peuvent être médicamenteux, physiques, psychologiques ou encore chirurgicaux [18]. Les traitements médicamenteux incluent en grande partie des analgésiques mais aussi des antidépresseurs et des anxiolytiques. Suivant le niveau de la douleur ressentie, les analgésiques préconisés vont des analgésiques non morphiniques (paracétamol et aspirine) aux analgésiques opioïdes mineurs (codéine, tramadol) et majeurs (morphine). Les analgésiques sont utilisés pour soulager les douleurs chroniques inflammatoires. Cependant, ces molécules de synthèse ont des effets secondaires importants non négligeables tels que nausées, vomissements, somnolence et peuvent surtout conduire à une dépendance (particulièrement dans le cas de la morphine). Les antidépresseurs sont utilisés pour leur caractère analgésique d'une part et d'autre part pour le traitement des symptômes psychiques. Ces médicaments sont préconisés pour la prise en charge des douleurs chroniques neuropathiques. Même si ces molécules ont des effets secondaires moins importants que les analgésiques morphiniques, ils n'en sont pas moins négligeables. Les effets secondaires des antidépresseurs incluent une prise de poids, des états de somnolence ou encore des constipations. Les anxiolytiques peuvent aussi être prescrits pour le traitement des douleurs chroniques neuropathiques, ils servent de relaxant pour remédier aux troubles du sommeil par exemple. Cependant la prise de ces médicaments peut s'accompagner de troubles cognitifs ne permettant pas à l'individu souffrant de douleur chronique de reprendre une activité normale. Différentes approches non médicamenteuses sont de plus en plus utilisées pour le traitement des douleurs chroniques à savoir l'acupuncture, la relaxation, la sophrologie, l'hypnose ou encore la kinésithérapie. Cependant ces

traitements restent bien moins efficaces dans la plupart des cas que les traitements à base de médicaments antidouleurs.

#### I.1.4.2. Les anti-TNF- $\alpha$ comme traitement contre les douleurs chroniques inflammatoires

De par sa définition, une concentration élevée de TNF- $\alpha$  induit localement la nécrose des cellules tumorales et améliore aussi l'efficacité de la chimiothérapie. Le TNF- $\alpha$  a été utilisé pour le traitement local du cancer de la peau (mélanome métastatique) et du cancer des tissus conjonctifs (sarcome des tissus mous) [15]. Cependant, il n'a jamais été considéré comme un médicament anticancéreux systématique car il est impliqué dans un large éventail de troubles systémiques et notamment dans les maladies inflammatoires chroniques. Ainsi des traitements à base de médicaments anti-TNF- $\alpha$  pour le traitement de ces maladies ont vu le jour. Il y a trois possibilités de s'opposer aux effets du TNF- $\alpha$  : diminuer sa production, le neutraliser après sa production et bloquer ses cibles. Les anti-TNF- $\alpha$  sont donc soit des anticorps monoclonaux qui se lient au TNF- $\alpha$ , le neutralisant et l'empêchant d'agir, soit des récepteurs solubles spécifiques au TNF- $\alpha$  qui miment sa cible provoquant ainsi une inhibition compétitive de la liaison du TNF- $\alpha$  aux récepteurs de surface cellulaire. Il existe aujourd'hui 5 anti-TNF- $\alpha$  autorisés sur le marché : 4 anticorps monoclonaux à savoir l'inflimab, l'adalimumab, le golimumab, et le certolizumab et 1 récepteur soluble, l'etanercept [19]. Cependant, ces anti-TNF- $\alpha$  ont entraîné de nombreux effets secondaires néfastes importants et en particulier des infections. Par exemple, la tuberculose est le principal effet secondaire de l'infliximab [20]. La piste de traitement des douleurs chroniques par anti-TNF- $\alpha$  semble prometteuse. Cependant, les anti-TNF- $\alpha$  de synthèse commercialisés aujourd'hui représentent un haut risque pour l'organisme.

**Ainsi pourquoi ne pas se tourner vers des molécules naturelles pouvant bloquer ou inhiber la sécrétion de TNF- $\alpha$  et ainsi soulager ces douleurs chroniques inflammatoires ?**

## I.2. LES PLANTES : SOURCES DE MOLECULES NATURELLES BIOACTIVES

### I.2.1. Les plantes médicinales

L'homme a recourt à la phytothérapie, thérapie par les plants, depuis des milliers d'années. Les premières traces écrites témoignant de l'existence de ce type de médecine datent de 2600 av. J.-C. en Mésopotamie. Parmi les plantes utilisées à cette époque figurent le cèdre (*Cedrus* spp.), la réglisse (*Glycyrrhiza glabra* (L.)) ou encore le jus de pavot (*Papaver somniferum* (L.)). Ces plantes sont encore utilisées aujourd'hui pour le traitement de maladies allant des infections parasitaires et inflammatoires aux toux et rhumes. Par la suite, les plantes ont continué à être utilisées en médecine.

Par exemple, dans la Grèce antique, Hippocrate (460-377 av. J.-C.), surnommé le père de la médecine, recommandait déjà l'asperge et l'ail pour leurs vertus diurétiques, le pavot comme hypnotique ou encore les feuilles de saule pour soulager douleurs et fièvres. Le premier herbier des plantes médicinales, « *De materia medica* », établi par Dioscoride, médecin, botaniste et pharmacologue grecque, date de 77 apr. J.-C. et recense l'utilisation médicale de 1600 remèdes utilisés par les Grecs à partir de plantes [21]. Aujourd'hui, 80 % de la population des pays en développement se soignent à partir de plantes médicinales et plus de 25 % des médicaments prescrits dans ces pays proviennent d'espèces végétales. La demande de traitements à base de plante est croissante et l'utilisation des plantes médicinales augmente rapidement dans le monde entier [22]. La phytothérapie a ainsi été appliquée pour le traitement de maladies chroniques inflammatoires. Par exemple, des plantes communes telles que le curcuma (*Curcuma longa* (L.)), également appelé safran des Indes, le gingembre (*Zingiber officinale* (Roscoe)), le romarin (*Rosmarinus officinalis* (L.)) ou encore le cassis (*Ribes nigrum* (L.)) peuvent être prescrites pour soulager les douleurs liées à la polyarthrite rhumatoïde. Différentes études *in vitro* et *in vivo* ont montrées que l'activité anti-inflammatoire de ces plantes est due à leur capacité à inhiber la sécrétion de TNF- $\alpha$  [23].

### 1.2.2. Les métabolites secondaires : principes actifs des plantes

La notion de principe actif dans les plantes n'apparaît qu'au début du XIX<sup>ème</sup> siècle avec l'isolement de la morphine à partir de l'opium par l'allemand Friedrich Sertürner. Ce dernier publie en 1817 un article sur les propriétés pharmacologiques de la morphine [24], donnant ainsi une explication scientifique aux différentes activités attribuées de manière empirique aux plantes médicinales. Cette découverte a déclenchée l'examen d'autres plantes médicinales et de nombreux produits bioactifs naturels ont été isolés de leurs sources naturelles au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle, tels que la quinine extraite de l'écorce du quinquina, la caféine extraite du café ou encore la nicotine extraite du tabac [25]. Les produits bioactifs des plantes ont alors été définis comme des composés produits par les plantes ayant des effets pharmacologiques ou toxicologiques chez l'homme [26]. Les molécules produites par les plantes sont appelées métabolites, ce sont des produits intermédiaires issus du métabolisme. Chez les plantes, il existe deux grandes classes de métabolites : les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Les métabolites primaires sont des molécules organiques localisées dans toutes les cellules de l'organisme de la plante et qui assurent sa survie. Ils sont impliqués dans sa croissance, son développement et sa reproduction. Ces métabolites regroupent entre autres, les glucides, les lipides et les acides aminés. Inversement, les métabolites secondaires sont très dispersés dans la plante et très différents selon les espèces. Ils se trouvent dans des compartiments particuliers de la plante et/ou à des moments précis de sa vie. Leurs fonctions dans l'organisme sont complexes et en élucidation constante mais il est cependant reconnu qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Certains de ces métabolites secondaires servent de défense pour la

plante contre des prédateurs (herbivores, virus, champignons...), au contraire d'autres permettent d'attirer certaines espèces ayant des rôles bénéfiques tels que les pollinisateurs [27]. Ce sont ces métabolites secondaires qui sont les principaux composés bioactifs des plantes.

Aujourd'hui, environ 200 000 métabolites secondaires issus de plantes ont été isolés et identifiés permettant ainsi à l'homme d'avoir une gamme importante de composés bioactifs naturels à sa disposition [28]. Les métabolites secondaires peuvent être divisés en trois grandes familles de composés naturels : les terpénoïdes, les composés phénoliques et les alcaloïdes (FIGURE I - 4).

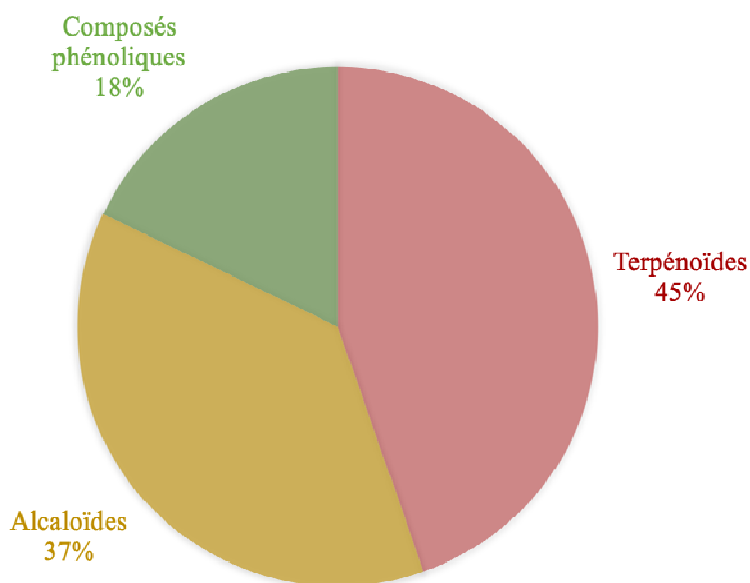


FIGURE I - 4 - Répartition des métabolites secondaires de plantes (adapté de Tissier et al. [29])

### I.2.3. La plus grande famille de molécules naturelles : les terpènes

#### I.2.3.1. Présentation et classification des terpènes

Avec environ 70 000 structures connues aujourd'hui (d'après le dictionnaire des molécules naturelles), les terpénoïdes sont considérés comme la plus grande famille de composés naturels [30]. Bien que « terpène » soit réservé aux composés oléfiniques et « terpénoïdes » aux terpènes oxydés, les deux termes sont généralement considérés comme équivalents et pourront donc être confondus dans cette thèse. La structure de base d'un terpène est composée d'un nombre variable d'unités de cinq carbones, appelées unités isoprènes, le nombre de carbones de n'importe quel terpène est alors un multiple de 5. Les produits de dégradation des terpénoïdes dans lesquels des atomes de carbone ont été perdus par des processus chimiques ou biochimiques peuvent contenir différents nombres d'atomes de carbone, mais leur structure globale indiquera leur origine terpénoïde et ils seront toujours considérés comme des terpénoïdes [31]. La classification de ces composés est basée sur le nombre d'unités

isoprènes contenu dans leur structure chimique (FIGURE I - 5). Les hémiterpènes contiennent une seule unité isoprène, le plus représentatif est donc l'isoprène lui-même, composé très volatil. Il est émis par certaines espèces d'arbres et environ  $5 \times 10^8$  tonnes sont libérées annuellement. Les monoterpènes sont composés de deux unités isoprènes, ce sont les composés principaux des huiles essentielles, des parfums et des épices. Les sesquiterpènes se composent de trois unités isoprènes et sont également fréquemment trouvés dans les huiles essentielles. Les monoterpènes ainsi que les sesquiterpènes sont des composés très volatils, même si les sesquiterpènes oxydés (sesquiterpénoïdes) ont tendance à être moins volatils, et jouent un rôle dans la défense des plantes ainsi que pour attirer les pollinisateurs. Par exemple, le capsidiol est un sesquiterpène synthétisé par le tabac et le piment rouge en réponse à une infection fongique [32]. Les diterpènes sont constitués de 4 unités isoprènes. Les diterpènes ne sont pas volatils, font partis des hormones de la plante comme par exemple l'acide gibbéréllique et peuvent intervenir dans le mécanisme de défense de la plante. Les triterpènes sont composés de 6 unités isoprènes, ce sont des molécules non volatiles qui peuvent être présentes dans les membranes cellulaires des plantes comme par exemple les stérols. Les triterpènes incluent aussi les saponines, les stéroïdes ainsi que les glycosides cardiotoniques. Enfin les tétратerpènes sont des molécules composées de 8 unités isoprènes. Cette dernière classe des terpènes regroupe les caroténoïdes, molécules possédant un grand nombre de doubles liaisons conjuguées (au moins une dizaine) et étant ainsi responsable des pigments jaune/orangé de la plante.

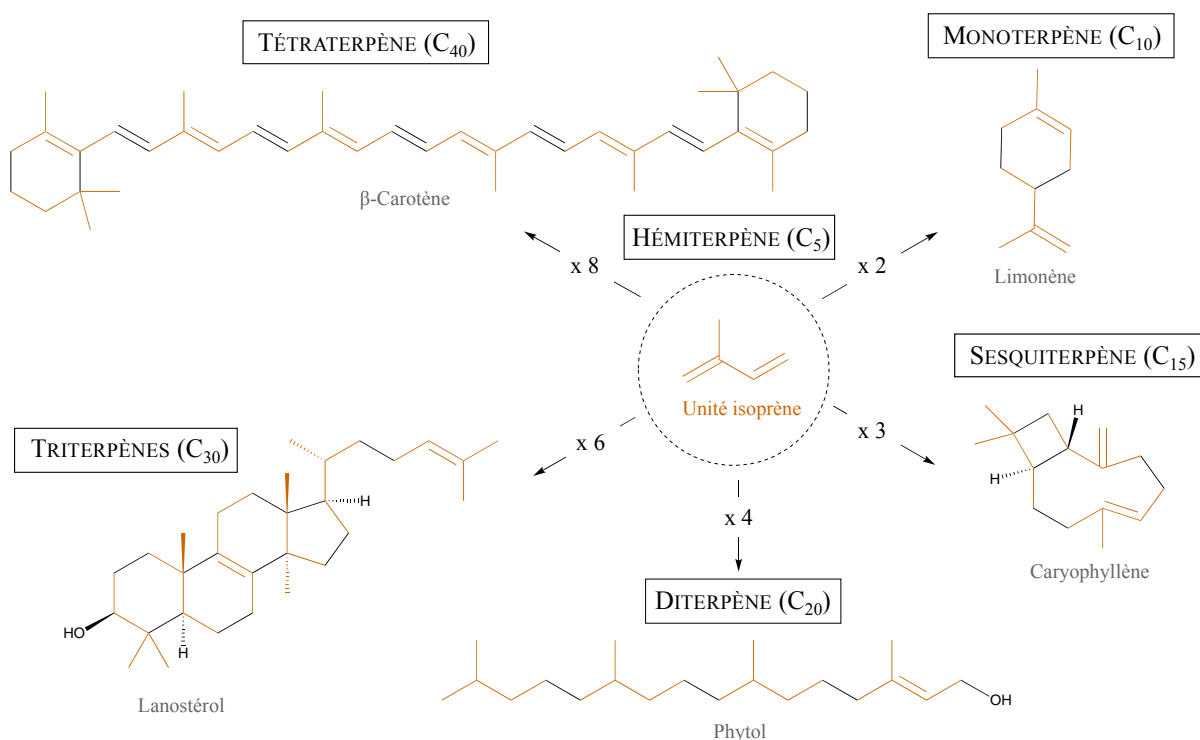


FIGURE I - 5 - Classification des terpènes suivant le nombre d'unités isoprènes dans leur structure chimique

### I.2.3.2. Biosynthèse des terpènes

#### I.2.3.2.1. Les précurseurs des terpènes : l'IPP et le DMAPP

Une caractéristique remarquable des terpènes est qu'ils sont tous dérivés des mêmes éléments constitutifs. L'unité isoprène présente dans toutes les structures chimiques des terpènes ne provient pas de l'isoprène mais de deux autres molécules isomères à 5 carbones : le diphosphate d'isopentényle (IPP) et le diphosphate de diméthallyle (DMAPP). La conversion de l'IPP en DMAPP est catalysée par la  $\Delta$ -isomérase de diphosphate d'isopentényle (IPP isomérase), une enzyme qui catalyse les changements au sein d'une molécule (FIGURE I - 6).

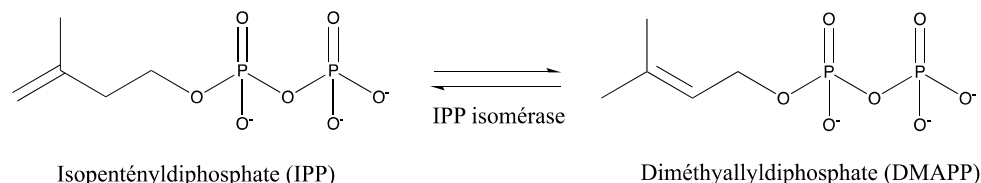


FIGURE I - 6 - Précurseurs des terpénoïdes

#### I.2.3.2.2. L'origine de l'IPP : la voie MVA et la voie MEP

Deux voies distinctes sont actuellement connues pour la biosynthèse de l'IPP et du DMAPP chez les plantes : la voie du mévalonate (MVA) et la voie du phosphate méthylérythritol (MEP) (FIGURE I - 7). La voie MVA consiste en six étapes dont les produits de départ sont deux molécules d'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA). Ces dernières correspondent à une forme acétylée de la coenzyme A, une coenzyme intervenant dans différentes voies du métabolisme. L'acide mévalonique (MVA) est un intermédiaire clé de cette première voie de biosynthèse. La voie MEP quant à elle consiste en sept étapes enzymatiques initiées par la condensation du pyruvate avec le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP). Cette première étape de condensation conduit à la formation du 1-désoxyxylulose-5-phosphate (DXP) qui est ensuite réduit en phosphate méthylérythritol (MEP). Ainsi cette voie s'appelle soit la voie MEP soit la voie DXP. Ces deux voies de biosynthèse des précurseurs des terpènes sont actives dans des compartiments différents des cellules végétales permettant à la plante de répondre à ses différents besoins et/ou agresseurs. La voie MVA prend place principalement dans le cytosol de la cellule végétale c'est-à-dire dans la fraction semi-liquide du cytoplasme. Tandis que la voie MEP est active principalement dans les plastides de la cellule végétale. La voie MAV fournit principalement les précurseurs de la biosynthèse des sesquiterpènes, triterpènes et diterpène et les unités isoprènes dérivées de la voie MEP sont utilisées de préférence pour la biosynthèse des hémiterpènes, des monoterpènes, des diterpènes et des sesquiterpènes [33].



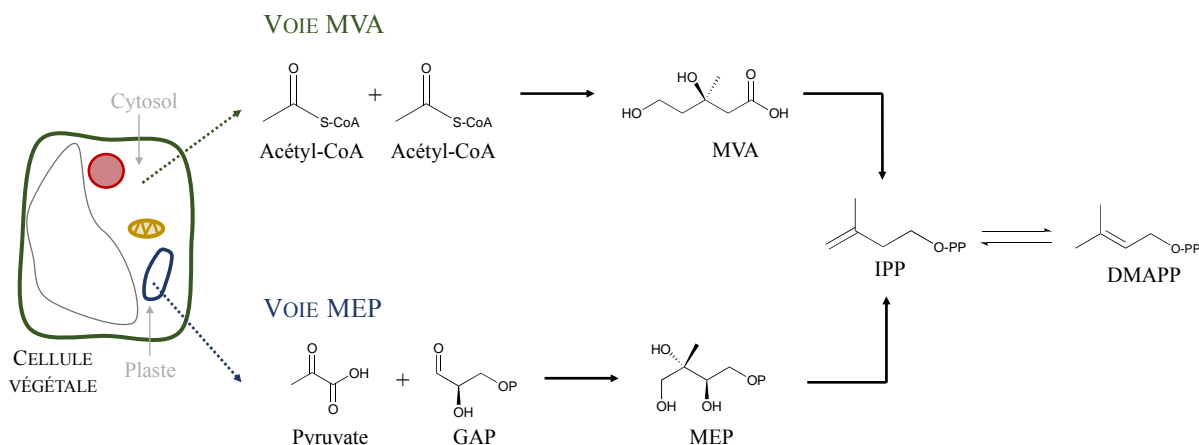


FIGURE I - 7 - Les deux voies simplifiées de biosynthèse du diphosphate d'isopentényl (IPP) dans la cellule végétale

### I.2.3.2.3. Assemblage tête-à-queue de l'IPP et DMAPP en C<sub>10</sub>, C<sub>15</sub> et C<sub>20</sub> diphosphates de prényle

L'IPP et le DMAPP, biosynthétisés à partir de l'une ou l'autre des deux voies présentées précédemment, peuvent ensuite être assemblés tête-à-queue pour générer des molécules de diphosphate d'isoprényle allylique de longueur croissante transformés eux-mêmes en différents composés terpéniques par des terpènes synthases (TPS) (FIGURE I - 8). Cette addition tête-à-queue du DMAPP sur l'IPP est réalisée par l'attachement du carbone fixant le groupement pyrophosphate (O-PP) du DMAPP avec le carbone opposé à celui fixant le groupement pyrophosphate de l'IPP. Ces réactions de condensations sont catalysées par des prényltransférases. Les plus petits terpènes, c'est-à-dire les hémiterpènes sont formés directement à partir du DMAPP par l'action de TPS. Une première réaction de condensation du DMAPP sur l'IPP conduit à la formation du diphosphate de géranyle (GPP) catalysée par la GPP-synthase (GPPS). Cette réaction est initiée par le départ du groupement O-PP du DMAPP hautement réactif suivi d'une addition électrophile de la double liaison de l'IPP sur le carbocation formé du DMAPP. La condensation s'accompagne de l'élimination d'un proton de l'IPP. Les monoterpènes sont alors obtenus par l'action de TPS sur le GPP. De même que pour la formation du GPP, l'addition d'un IPP sur un GPP conduit au diphosphate de farnésyle (FPP) catalysée par la FPP-synthase (FPPS). Le FPP est le précurseur des sesquiterpènes obtenus à l'aide de sesquiterpène synthases. La condensation de deux molécules de FPP conduit, après action de TPS, à la formation de triterpènes. Un couplage tête-à-queue de l'IPP sur le FPP permet d'obtenir le diphosphate de géranyle géranyle (GGPP), réaction catalysée par la GGPP-synthase (GGPPS). Le GGPP est ensuite métabolisé par des TPS pour former les diterpènes. Enfin, les tetraterpènes sont obtenus par action de TPS sur le produit obtenu suite à la réaction entre deux molécules de GGPP [34].

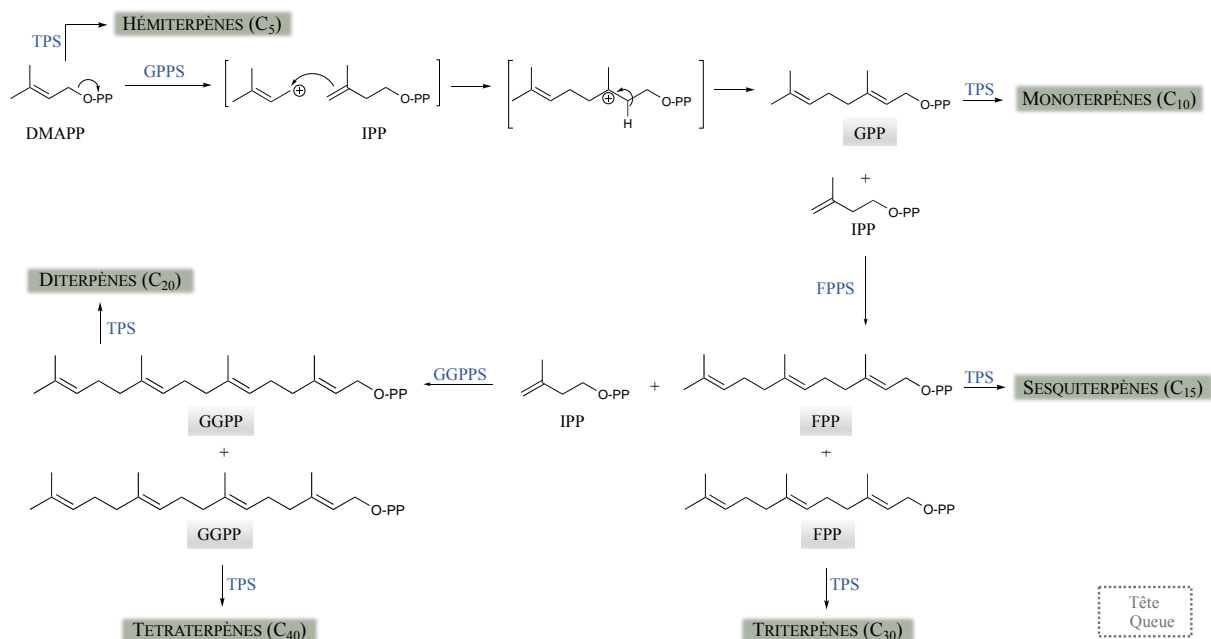


FIGURE I - 8 - Couplage tête-à-queue des unités isopréniques conduisant à la formation des différentes classes de terpènes

Dans ce projet, nous nous sommes limités à l'étude des monoterpènes et des sesquiterpènes volatils qui sont considérés comme l'essence de la plante et ont un large éventail d'activités biologiques. Dans la suite, le terme « terpène volatil » regroupera les monoterpènes et les sesquiterpènes volatils.

#### I.2.3.2.4. Les monoterpènes et sesquiterpènes synthèses

Le GPP et le FPP sont transformés respectivement en monoterpènes et sesquiterpènes par l'action de différentes terpènes synthase. La diversité de cette grande classe d'enzyme est la cause de la richesse de la famille des composés terpéniques. La biodiversité des terpènes résulte non seulement du nombre de terpènes synthases mais aussi de la capacité de ces catalyseurs à former plusieurs produits à partir d'un seul substrat. En effet, en plus de leur produit principal, près de la moitié de toutes les monoterpènes et sesquiterpènes synthases caractérisées forment également des quantités significatives de produits additionnels (définis comme au moins 10 % du total) [35]. Par exemple, l'une des premières monoterpènes synthases clonée, la (+)-sabinène synthase à partir de sauge (*Salvia officinalis*), produit 63 % de (+)-sabinène mais aussi 21 % de  $\gamma$ -terpinène, 7 % de terpinolène, 6,5 % de limonène et 2,5 % de myrcène dans des essais *in vitro* [36]. Ces produits secondaires sont aussi présents dans les huiles essentielles de plantes riches en terpènes volatils. Les TPS sont généralement nommées sur la base du produit majoritairement formé. La composition de l'essence de la plante dépend de son génome, les gènes expriment spécifiquement différentes TPS. Toutes les TPS ont des propriétés semblables et toutes fonctionnent par des mécanismes de réaction électrophile similaires. Dans un premier temps, les TPS libèrent le groupe diphosphate (O-PP) du GPP ou du FPP pour

générer un carbocation intermédiaire, le cation géranyle ou le cation farnésyle respectivement, très réactif. L'activité de ces enzymes est dépendante d'un cation métallique divalent, comme par exemple  $Mn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$  qui va déclencher le départ du groupe diphosphate (O-PP) du substrat [34].

- Les monoterpènes synthèses

Le cation géranyle, formé à partir du GPP, subit ensuite des réactions de cyclisations et différents réarrangements avant que la réaction ne se termine par une déprotonation ou une capture nucléophile (souvent l'eau) [37] (FIGURE I - 9). Les monoterpènes acycliques sont formés à partir du cation géranyle par perte de proton, tels que le myrcène et le  $\beta$ -ocimène, ou par addition avec une molécule d'eau, comme par exemple le géraniol et le linalol. Les monoterpènes cycliques et bicycliques quant à eux sont formés à partir d'un deuxième réactif intermédiaire obtenu suite à une isomérisation du cation géranyle afin de faciliter la cyclisation du carbocation en un cycle à 6 carbones : le diphosphate de linalyle (LPP) et son cation correspondant le cation linalyle. Ce carbocation intermédiaire peut aussi conduire à des monoterpènes acycliques.

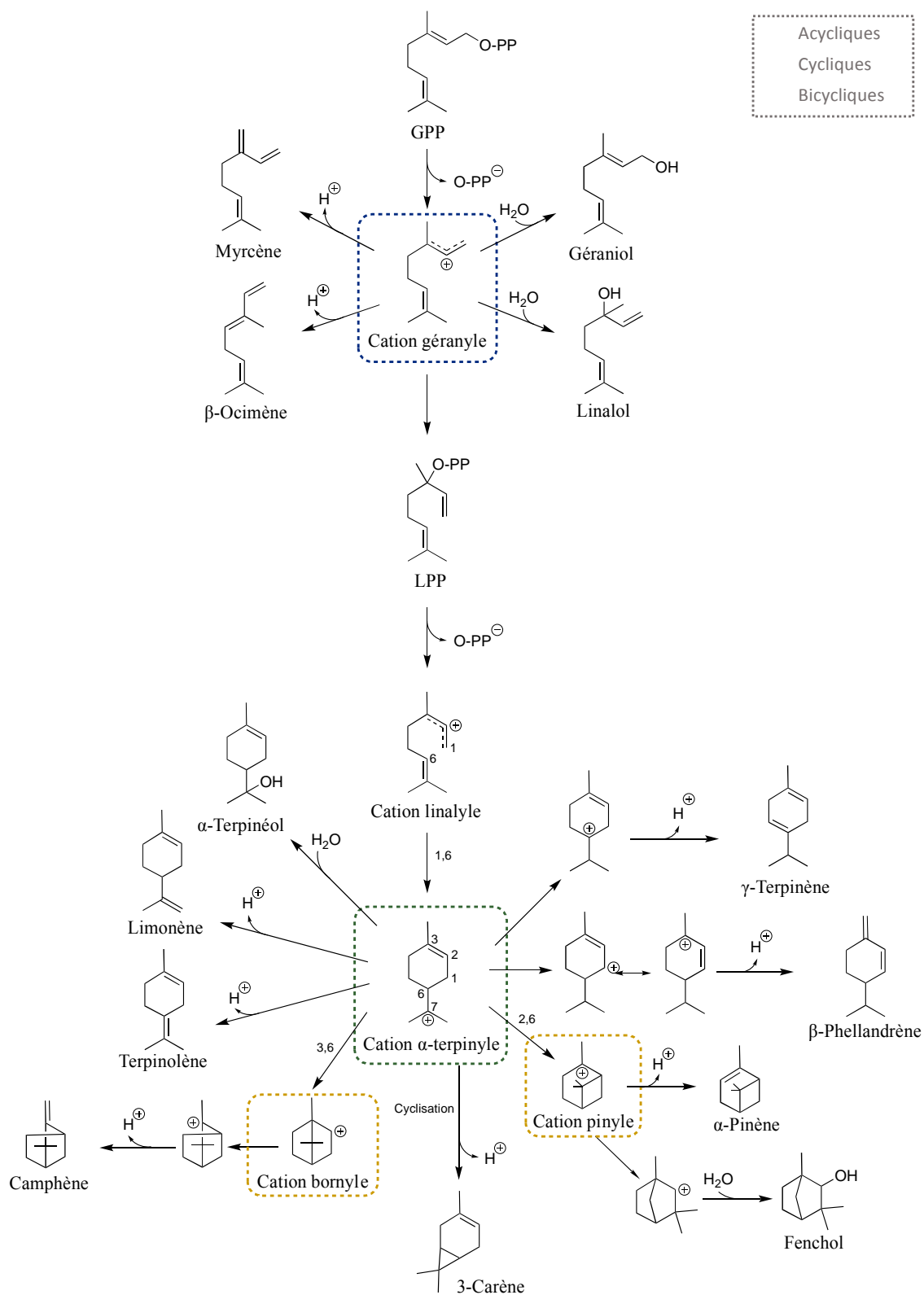


FIGURE I - 9 - Quelques voies de production de monoterpènes acycliques, cycliques et bicycliques par les TPS (adapté de Degenhardt et al.[35])

Une attaque électrophile du carbone C1 du cation linalyle sur le carbone C6 conduit au cation  $\alpha$ -terpinyle, un intermédiaire cyclique à partir duquel tous les monoterpènes cycliques sont formés par diverses réactions chimiques. Par exemple, les monoterpènes monocycliques sans atomes d'oxygène tels que le limonène ou le terpinolène, sont obtenus par perte d'un atome d'hydrogène du cation  $\alpha$ -terpinyle. Les monoterpènes monocycliques comportant un atome d'oxygène dans des fonctions alcools par exemple ( $\alpha$ -terpinéol), sont obtenus par addition d'une molécule d'eau sur l'intermédiaire cationique  $\alpha$ -terpinyle. Un déplacement de la charge positive du cation  $\alpha$ -terpinyle suivi d'une perte d'un atome d'hydrogène permet d'obtenir d'autres monoterpènes monocycliques tels que le  $\gamma$ -terpinène ou le  $\beta$ -phellandrène.

Les monoterpènes bicycliques sont formés suite à une attaque électrophile de l'atome de carbone du cation  $\alpha$ -terpinyle portant la charge positive sur un atome de carbone de la double liaison restante du même composé. Suivant si l'attaque se fait en C2 ou en C3 de la double liaison du carbocation, le cation pinyle et le cation bornyle bicycliques sont obtenus respectivement. Ces deux nouveaux intermédiaires cationiques conduisent à de nouvelles structures de monoterpènes bicycliques. Ainsi, l' $\alpha$ -pinène est obtenu par perte d'un proton du cation pinyle. Ce dernier peut aussi subir un réarrangement de la charge et conduire après addition d'une molécule d'eau au fenchol par exemple. De même pour le cation bornyle qui conduit à la formation du camphène. D'autres réactions peuvent encore avoir lieu pour former d'autres monoterpènes à partir du cation  $\alpha$ -terpinyle, par exemple le 3-carène est formé suite à une cyclisation entre les carbones C5 et C7 accompagnée de la perte d'un proton du carbocation. Une liste non exhaustive de ces réactions catalysées par les TPS a été présentée ici afin de montrer l'origine de la diversité des monoterpènes.

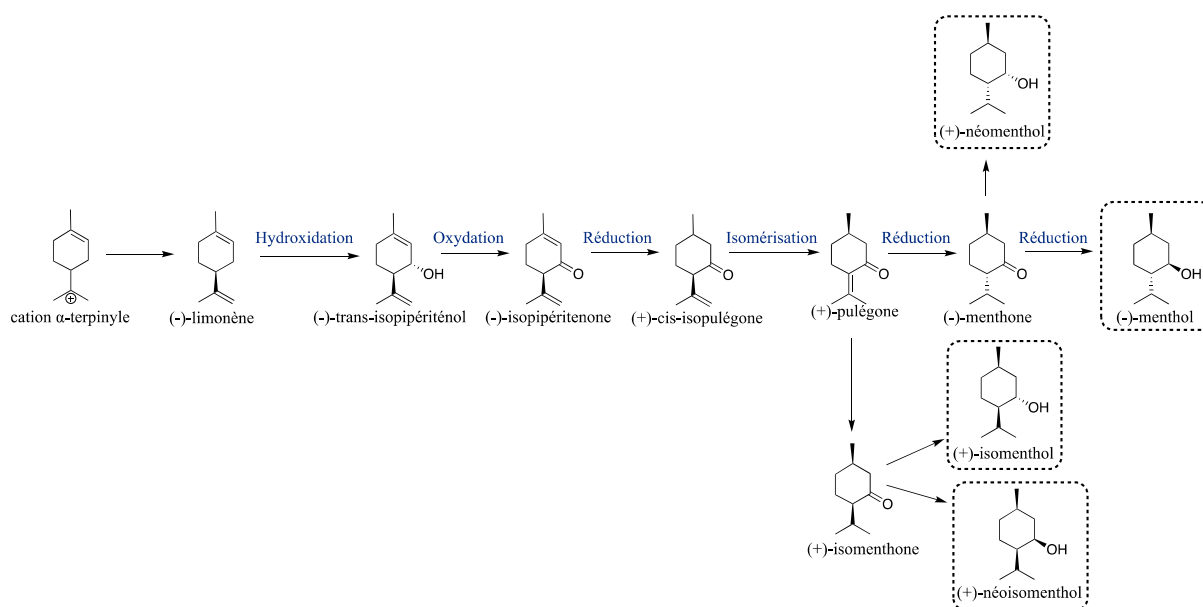


FIGURE I - 10 - Biosynthèse du menthol et de ses isomères dans la menthe (adapté de Turner & Croteau [38])

Tous ces composés formés à partir du cation  $\alpha$ -terpinyle peuvent ensuite subir d'autres réactions chimiques (oxydation, peroxydation, méthylation, acylation...) non catalysées par les TPS et donc former de nouveaux monoterpènes [37]. Par exemple, le menthol, composé majoritaire de l'huile essentielle de menthe, ainsi que ses isomères sont produits par différentes réactions chimiques successives sur le limonène obtenu à partir du cation  $\alpha$ -terpényle (FIGURE I - 10).

- Les sesquiterpènes synthèses

La formation de sesquiterpènes à partir du FPP est catalysée par les sesquiterpènes synthases qui utilisent les mêmes mécanismes de réactions que les monoterpènes synthases basés sur une haute réactivité des carbocations. Cependant, le squelette carboné du FPP plus grand que celui du GPP et la présence de trois doubles liaisons, au lieu de deux dans le cas du GPP, augmente considérablement la diversité structurelle des produits obtenus par l'action des TPS. En effet, de nombreux isomères différents peuvent être obtenus pour un même produit. Par exemple, le terme « farnesène », un sesquiterpène acyclique, regroupe six produits chimiques étroitement liés : deux isomères l' $\alpha$ -farnesène et le  $\beta$ -farnesène différant par l'emplacement d'une double liaison, 4 stéréoisomères de l' $\alpha$ -farnesène et 2 stéréoisomères du  $\beta$ -farnesène. Ainsi seulement les grandes étapes des mécanismes des FPP-synthases seront présentées ici (FIGURE I - 11), chaque isomère de chaque composé ne seront pas présentés. Comme pour la formation des monoterpènes acycliques à partir du cation géranyle, les sesquiterpènes acycliques sont obtenus à partir du cation farnésyle par déprotonation, formation de l' $\alpha$ -farnesène ou du  $\beta$ -farnesène, ou par addition d'une molécule d'eau, obtention des isomères du farnésol. Les réactions de cyclisation permettant d'obtenir les sesquiterpènes cycliques peuvent être divisées en deux types. Le premier implique la cyclisation du cation farnésyle. Deux fermetures du cation farnésyle sont possible : une entre C1 et C10 et une entre C1 et C11. La haute réactivité des carbocations intermédiaires formés après cyclisation du cation farnésyle permet d'obtenir différents produits par déprotonation : comme par exemple le germacrène D ou encore le  $\beta$ -sélinène après une fermeture 1,10 ou le  $\beta$ -caryophyllène obtenu suite à une fermeture 1,11 du cation farnésyle. Le deuxième type de cyclisation a lieu après isomérisation de la double liaison C2-C3 du cation farnésyle, formant un nouvel intermédiaire cationique : le cation nérolidyle. Ce carbocation permet d'obtenir d'autres sesquiterpènes suite à des fermetures 1,6 et 1,7 non obtenues avec le cation farnésyle. Ainsi des sesquiterpènes tels que le (-)-sesquithujène peuvent être obtenus par déprotonation des cations intermédiaires. De plus, les fermetures du cycle en 1,10 et 1,11 présentés pour le cation farnésyle restent possible pour le cation nérolidyle. Les intermédiaires cationiques obtenus suite à ces fermetures de cycle du cation nérolidyle sont des isomères de ceux obtenus par les mêmes fermetures de cycle du cation farnésyle. Différents composés possédant différents isomères peuvent être obtenus par déprotonation des carbocations intermédiaires comme le  $\delta$ -cadinène et le longifolène par exemple. Les

mécanismes de réaction présentés ici représentent une liste non exhaustive de la formation des sesquiterpènes.

En effet, comme pour la synthèse des monoterpènes, les carbocations intermédiaires obtenus à partir du cation farnésyle ou du cation nérolidyle peuvent subir un certain nombre de réactions à savoir des réarrangements, des cyclisations supplémentaires ou encore des additions nucléophiles avec des molécules d'eau. La possibilité de toutes ces réactions montre l'origine à nouveau de la diversité de la famille des sesquiterpènes.

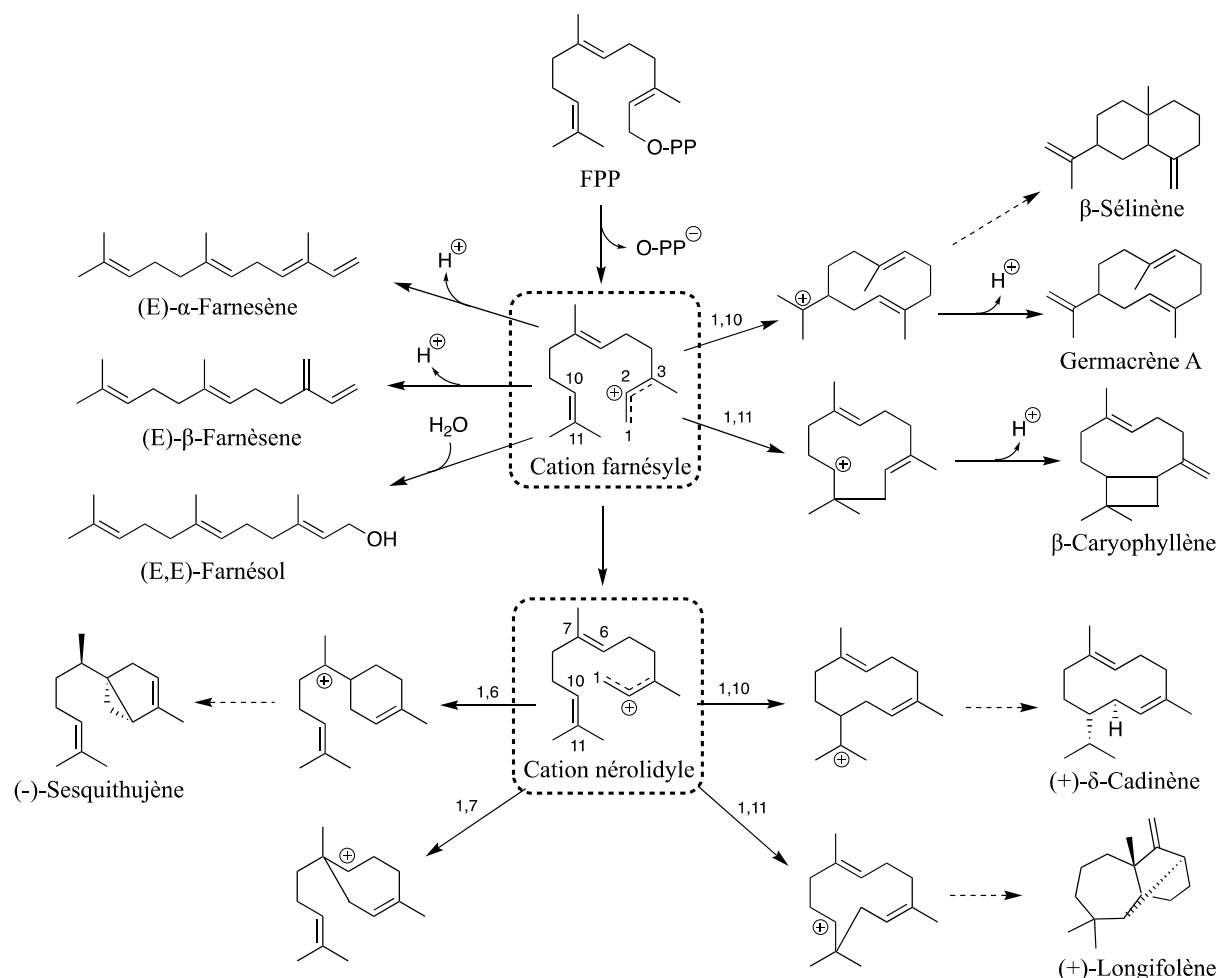


FIGURE I - 11 - Quelques voies de production de sesquiterpènes acycliques et cycliques par les TPS (adapté de Degenhardt et al. [35])

### I.2.3.3. Modulation de la voie du TNF-α par les terpènes volatils

Les différentes activités biologiques des monoterpènes ont fait l'objet de nombreuses études. Des activités antiépileptique, antidépresseur, antimicrobienne (antibactérienne, antivirale et antifongique), antioxydante, antitumorale, analgésique et anti-inflammatoire ont été attribuées aux monoterpènes acycliques, monocycliques et bicycliques quelques soit leurs fonctions chimiques

[39,40]. Guimarães *et al.* [41] ont inventoriés les études portant sur l'activité analgésique des monoterpènes. De Cássia Da Silveira e Sá *et al.* [42] ont recensé les monoterpènes ayant montré une activité anti-inflammatoire dans des études *in vitro* et/ou *in vivo*. Une revue plus récente de Quintans *et al.* [43] regroupe les monoterpènes modulant l'activité des cytokines, dont le TNF- $\alpha$ . Afin de montrer le potentiel des monoterpènes comme traitement pour les douleurs chroniques inflammatoires, les données de ces trois revues ont été résumés dans le TABLEAU I - 1.

Les monoterpènes, qu'ils soient acycliques, monocycliques, bicycliques, qu'ils comportent une fonction alcool, cétone, acide ou soient simplement des hydrocarbures, ont des propriétés analgésique et anti-inflammatoire mises en place à travers divers mécanismes dont l'inhibition du TNF- $\alpha$ . De plus, ces composés naturels présentent des activités biologiques comparables à celles de composés de synthèse aujourd'hui sur le marché pour le traitement de différentes douleurs chroniques. Par exemple, la dose minimale d' $\alpha$ -pinène (10 mg/kg) nécessaire pour diminuer une hypernociception et une inflammation provoquées chez la souris est équivalente à celle de l'indométacine (10 mg/kg) et de la gabapentine (70 mg/kg), qui sont respectivement un anti-inflammatoire et un analgésique commercialisés [44]. Certains de ces monoterpènes sont les composés majoritaires d'huiles essentielles préconisées dans le traitement de maladies chroniques. Par exemple, la thymoquinone est le principal monoterpène de l'huile essentielle obtenue à partir des graines de cumin noir (*Nigella sativa* (L.)) une plante utilisée en médecine traditionnelle pour traiter l'eczéma, l'asthme, la bronchite et l'inflammation [45]. De même, le carvacrol est présent dans l'huile essentielle de diverses plantes aromatiques et épices telles que le thym (*Thymus vulgaris* (L.)) et différentes espèces d'*Origanum* dont l'origan (*Origanum vulgare* (L.)), toutes utilisées dans le traitement de douleur, d'arthrite, d'asthme et de maux de tête [46]. Ainsi l'activité anti-inflammatoire et analgésique des huiles essentielles sont fortement liés aux activités biologiques de leurs composés majoritaires qui sont les monoterpènes et les sesquiterpènes volatils. Cependant, seulement un faible nombre de monoterpènes (une quarantaine sur environ plusieurs centaines de monoterpènes connus) a été étudié pour leurs capacités thérapeutiques malgré leurs forts potentiels (TABLEAU I - 1).

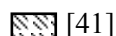
Parmi les sesquiterpènes volatils, quelques composés ont montré des activités analgésiques et anti-inflammatoire *in vitro* et/ou *in vivo*, à savoir l' $\alpha$ -humulène, le  $\beta$ -caryophyllène, l' $\alpha$ -bisabolol, le farnésol ou encore le nérolidol [42,47,48]. Ces sesquiterpènes sont aussi les composés majoritaires présents dans certaines plantes utilisées en phytothérapie. Par exemple, l' $\alpha$ -humulène, isolé pour la première fois dans le houblon (*Humulus lupulus*) d'où il doit son nom, et son isomère le  $\beta$ -caryophyllène sont présents dans la sauge noire (*Cordia verbenacea* (D.C.)) dont les parties aériennes sont utilisées en médecine traditionnelle pour leur propriétés antirhumatisme, anti-inflammatoire, analgésique et cicatrisante [49]. L' $\alpha$ -bisabolol, retrouvé dans les extraits de camomille sauvage (*Matricaria chamomilla* (L.)) par exemple, est largement utilisé dans le domaine pharmaceutique pour ses propriétés apaisantes, cicatrisantes ainsi que comme protection de la peau contre les stress récurrents



de l'environnement [50]. De même que pour les monoterpènes, cette famille de composés terpéniques reste elle aussi très peu étudiée. Ainsi l'intérêt pour étudier des plantes médicinales antidouleur potentiellement riches en terpènes volatils bioactifs est déterminant.

TABLEAU I - 1 - Monoterpènes acycliques, monocycliques et bicycliques étudiés pour leurs activités analgésique, anti-inflammatoire et anti-TNF- $\alpha$

Monoterpène	Analgésique	Anti-inflammatoire	Anti-TNF- $\alpha$
<b>ACYCLIQUES</b>			
(-)-Linalol	■	■	■
Acétate de linalyle	■		
Citral	■	■	■
Citronellal	■		
Citronellol	■	■	■
Géraniol		■	■
Myrcène	■		
<b>MONOCYCLIQUES</b>			
(-)-Menthol	■	■	■
4-Terpinéol			■
Acétate de thymol	■		■
Alcool périllique		■	■
Carvacrol	■	■	■
Carvone	■		
Epoxide de carvone	■		
Limonène	■	■	■
Menthone	■	■	■
Oxide de limonène	■		
Oxide de pulégone	■		
p-Cymène			■
Pulégone	■		
Thymol	■	■	■
Thymoquinone	■	■	■
$\alpha$ -Phellandrène	■		■
$\alpha$ -Terpinéol	■		
$\beta$ -Thujaplicine			■
$\gamma$ -Terpinène			■
<b>BICYCLIQUES</b>			
Acétate de bornyle			■
Bornéol	■	■	■
Eucalyptol	■		■
Fenchone	■	■	
Myrtenal			■
Myrtenol			■
$\alpha$ -Pinène	■	■	■
$\beta$ -Pinène	■		



[41]



[42]



[43]

#### I.2.4. Étude de deux plantes thérapeutiques peu caractérisées

##### I.2.4.1. *Calamintha nepeta* (L.) savi

Le genre *Calamintha* (Mill.), calament en français, comprend les plantes aromatiques appartenant à la famille des lamiacées. Les espèces de *Calamintha* sont des vivaces herbacées de taille moyenne à grande, représentées par huit espèces réparties en Europe, en Méditerranée orientale, en Asie centrale, en Afrique du Nord et en Amérique. Le genre est représenté par cinq espèces en Europe : *Calamintha grandiflora* (L.) Moench, *Calamintha sylvatica* (Bromf.), *Calamintha incana* (Sibth. & Sm.) Boiss, *Calamintha cretica* (L.) Lam., et *Calamintha nepeta* (L.) Savi. Ce dernier, également appelé petit calament, est une herbe buissonnante pourvue d'un rhizome et semblable à la menthe commune par sa morphologie et son parfum caractéristique. La plante pousse dans le sud, l'ouest et le centre de l'Europe et jusqu'à l'est de l'Angleterre. Selon la flore européenne, le *Calamintha nepeta* (L.) savi comprend deux sous-espèces : *nepeta* et *glandulosa*, qui se différencient dans le nombre de fleurs en cymes et dans la forme et la taille des feuilles. La sous-espèce *nepeta* est généralement trouvée dans les montagnes de l'Europe du Sud et du centre tandis que la sous-espèce *glandulosa* se trouve plutôt dans l'Europe du Sud et de l'Ouest. Dans notre étude, la sous espèce *nepeta* a été utilisée. Ainsi le terme « *Calamintha nepeta nepeta* (L.) Savi » désignant la sous espèce sera confondu au terme « *Calamintha nepeta* (L.) savi » pour alléger l'écriture.

Le *Calamintha nepeta* (L.) savi est connu pour ses utilisations médicinales comme stimulant, tonique, antiseptique et antispasmodique. Les propriétés antioxydante, antimicrobienne et anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* (L.) savi ont été étudiées [51]. Seulement une étude, basée sur un test enzymatique, a été conduite pour évaluer les propriétés anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta glandulosa* (L.) savi obtenue par hydrodistillation [52]. L'activité anti-inflammatoire d'extraits de la plante contenant des composés phénoliques et des flavonoïdes a été évaluée dans une étude *in vitro* [53] et une étude *in vivo* [54]. Les extraits de *Calamintha nepeta* (L.) savi n'ont pas été étudiés pour leur activité anti-TNF- $\alpha$ .

La composition chimique de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* (L.) savi a été rigoureusement étudiée. Les chémotypes décrits sont divers et varient selon l'origine géographique de la plante et des conditions environnementales. Cependant, les principaux composants des huiles appartiennent généralement aux p-menthanes oxygénés en C3 tels que le pulégone, le menthone, l'isomenthone, la pipéritone et la pipéritenone avec leurs oxydes ou, plus rarement, aux composés p-menthane oxygéné en C6 tels que le carvone (FIGURE I - 12) [51]. Le pulégone est considéré comme l'un des principaux constituants de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* (L.) savi dans laquelle il peut représenter

jusqu'à 85 % de la composition totale [55]. D'un point de vue biogénétique, le pulégone est synthétisé à partir de la pipéritone, elle-même dérivée du limonène. C'est aussi le précurseur de la menthone, de l'isomenthone et de l'isopulégone (FIGURE I - 10). Sa présence est donc souvent accompagnée d'un ou plusieurs des composés mentionnés précédemment ou avec son précurseur immédiat, la pipéritenone. Le ratio entre le pulégone et la menthone dans l'huile essentielle de la plante dépend du stade de développement de celle-ci [55]. Le pulégone est réduit en menthone pendant la période de reproduction de la plante, le pulégone sera donc présent à une concentration moins importante à ce stade-là. De même, pendant la période de fleuraison de la plante, la teneur en pulégone a tendance à diminuer tandis que celle de la menthone augmente, conduisant à des compositions dans lesquelles le pourcentage de menthone est parfois supérieur à celui du pulégone [56].

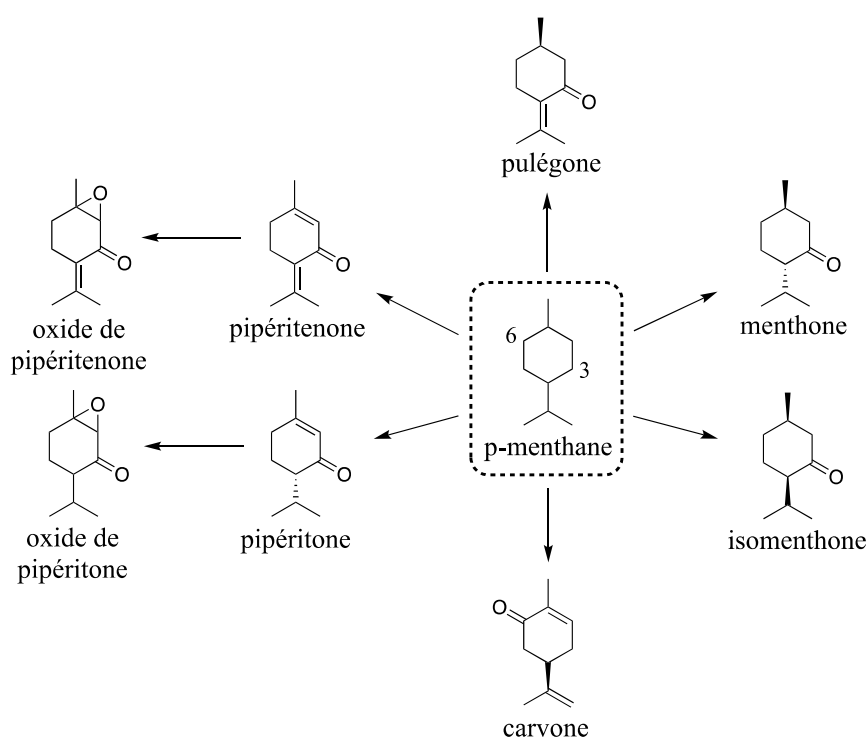


FIGURE I - 12 - Principaux composés de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* (L.) savi

Le pulégone a une odeur agréable et rafraîchissante décrite comme étant à mi-chemin entre la menthe poivrée et le camphre. Il est approuvé par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA, Food and Drug Administration) pour l'utilisation alimentaire et a été inclus par le Conseil de l'Europe en 1975 dans la liste des substances aromatisantes artificielles qui peuvent être ajoutées temporairement aux aliments sans danger pour la santé publique. Il est donc largement utilisé dans les aromatisants, la parfumerie et l'aromathérapie. Il n'existe actuellement aucune limite dans le domaine des médicaments pour son utilisation. En effet, ce monoterpène présente une multitude d'activités biologiques différentes telles qu'antimicrobienne, antihistaminique, antipyrétique, anti-inflammatoire et analgésique entre autres. Dans une étude *in vivo*, il a été montré que le pulégone

permet de diminuer significativement la sensation de douleur d'une manière similaire à la morphine [57].

Ainsi le *Calamintha nepeta* (L.) savi, une plante riche en un composé à fort potentiel analgésique et anti-inflammatoire, semble être une piste prometteuse pour le traitement de douleur chronique inflammatoire.

#### I.2.4.2. *Asarum europaeum* (L.)

Le genre *Asarum* (L.), asaret en français, fait partie de la famille des Aristolochiacées et regroupe environ 100 espèces répandues en Asie, en Europe et en Amérique du Nord. L'Europe compte un seul membre du genre : l'*Asarum europaeum* (L.), une plante vivace et basse qui pousse surtout en Europe centrale en climat montagnard. L'*Asarum europaeum* (L.) est connu depuis l'antiquité et est encore aujourd'hui utilisé contre l'hydropisie et la sciatique et comme purgatif et vomitif dans la médecine traditionnelle. Il n'est actuellement pas utilisé en pharmacie en raison de sa toxicité. En effet, l'*Asarum europaeum* (L.) est inclus dans la base de données sur les plantes toxiques de la FDA. Cependant, cette plante est utilisée en homéopathie depuis 1825 pour le traitement de maladies nerveuses, l'alcoolisme, la diarrhée... Peu d'études ont été conduites sur la composition de l'huile essentielle de l'*Asarum europaeum* (L.) et toutes datent des années 1960-1980. Les composés principaux identifiés dans l'huile essentielle de cette plante sont l' $\alpha$ -asarone, l'isoeugénol méthylique, l'isoélemicine et l' $\alpha$ -eudesmol (Figure I - 13). Ces composés peuvent être considérés comme des terpènes mais sont aussi classés comme phénylpropanoïdes, composés jouant un rôle important dans les défenses de la plante.

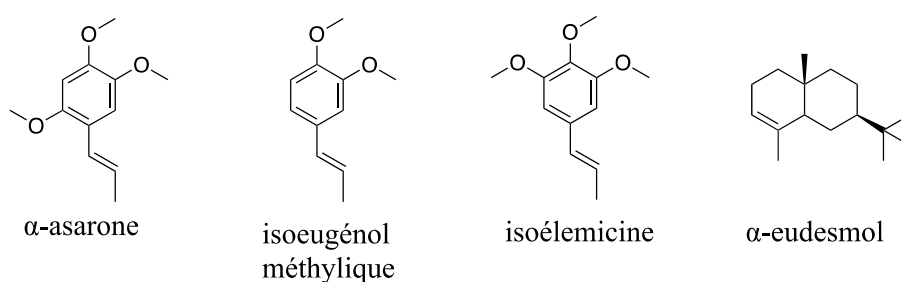


Figure I - 13 - Principaux composés de l'huile essentielle d'*Asarum europaeum* (L.)

Des monoterpènes ( $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène, camphène, limonène...) ainsi que des sesquiterpènes ( $\beta$ -gurjunène, verbénone...) ont aussi été identifiés dans l'huile essentielle de l'*Asarum europaeum* (L.). La toxicité de cette dernière vient potentiellement de la toxicité de son composé majoritaire, l' $\alpha$ -asarone. En effet, ce composé a des propriétés hépatotoxique (toxique pour le foie), génétoxique (toxique pour le génome) et mutagène, ce qui compromet son utilisation. De plus, des expériences *in vivo* ont montré que ce composé est un cancérigène potentiel induisant des tumeurs du foie. Cependant, ce composé nocif est très peu volatil ( $T^{\circ}$ (ébullition) = 296 °C) comparé aux monoterpènes et aux sesquiterpènes présents dans l'huile essentielle de l'*Asarum europaeum* (L.). Ainsi une méthode

d'extraction sélective envers les composés volatils permettrait de s'affranchir de ce composé toxique et d'évaluer l'activité anti-inflammatoire ainsi que sa toxicité de cette plante sans son composé majoritaire très peu étudiée.

### I.3. L'EXTRACTION DES TERPENES VOLATILS

Les monoterpènes et les sesquiterpènes volatils sont les composés principaux de l'essence d'une plante. Cependant la composition de cette dernière peut varier suivant de nombreux facteurs, dont les conditions environnementales (température, humidité, vent) et la localisation géographique de la plante. De plus, la proportion de ses différents constituants peut varier tout au long du développement de la plante. De nombreux gènes codant pour les monoterpène et sesquiterpène synthase ont été isolés et caractérisés. Certains de ces gènes TPS sont plus exprimés dans les fruits et les fleurs, tandis que d'autres sont spécifiquement exprimés lors du développement ou de la maturation des fruits [58]. La composition en terpènes volatils est alors variable dans les différentes parties de la plantes (fleurs, tiges, feuilles, racines...). Ces composés naturels sont secrétés dans différents compartiments de la plante en réponse à ses besoins (FIGURE I - 14). Ils peuvent jouer un rôle de défense suite à des actions néfastes d'un organisme vivant (stress biotique) ou à un changement d'environnement (stress abiotique) mais interviennent aussi dans les interactions entre les végétaux (agent allélopathique) et dans les interactions végétale-animale comme par exemple pour attirer des pollinisateurs. Ces divers stress que peut subir la plante influencent aussi la composition de son essence. Ces variations de composition non contrôlées peuvent induire une variation de l'activité biologique de la plante. Ainsi les propriétés anti-inflammatoire et anti-TNF- $\alpha$  étant fortement dépendantes de la composition en terpènes volatils dans la plante au moment de sa récolte, le choix de la méthode d'extraction permettant de quantifier cette composition est crucial. L'extraction est en effet la première étape de toute étude sur les plantes médicinales, elle joue un rôle important sur le résultat final.

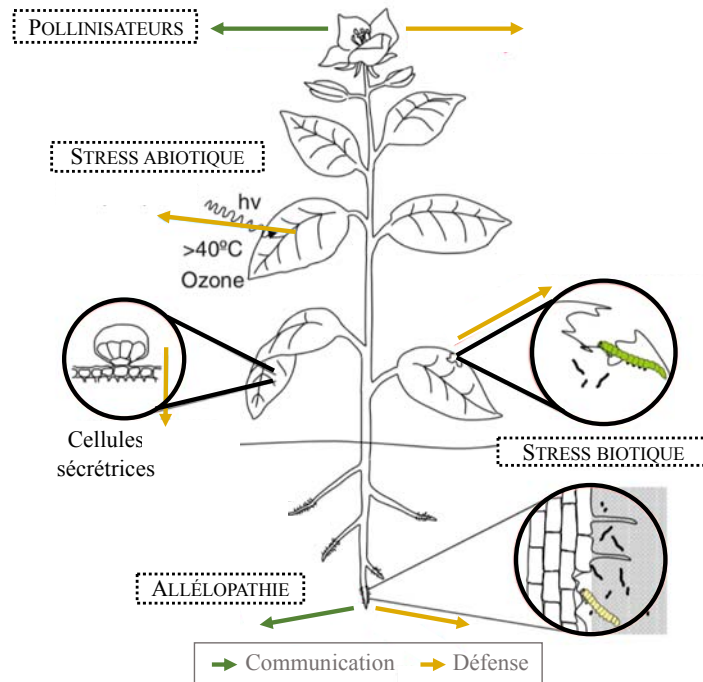


FIGURE I - 14 - Expression des TPS en réponse à différents stress dans les organes et tissus de la plante (adapté de Tholl [56])

Différentes méthodes d'extraction, dont certaines existent depuis plus de 100 ans, peuvent être utilisées pour extraire les terpènes volatils à partir de diverses sources naturelles mais leurs objectifs principaux sont les mêmes [59] :

- Extraire les composés bioactifs ciblés d'un échantillon de plante complexe
- Augmenter la sélectivité de la méthode en éliminant les interférents potentiels de l'échantillon
- Augmenter la concentration en composé d'intérêt afin d'augmenter la sensibilité du test biologique
- Fournir une méthode robuste, reproductible et indépendante des variations de la matrice de l'échantillon
- Convertir les composés bioactifs en une forme plus appropriée pour la détection et la séparation, si nécessaire.

### I.3.1. Les méthodes d'extraction conventionnelles pour l'obtention d'huiles essentielles

#### I.3.1.1. Définitions

Une huile essentielle est définie par la Pharmacopée européenne (6<sup>e</sup> éd. 01/2008 :2098) comme étant un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique sans chauffage. Une huile essentielle est le plus

souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ». Cette définition est cependant très restrictive : elle exclut les produits obtenus par extraction à l'aide de solvants non aqueux ainsi que ceux obtenus par tout autre procédé (par gaz sous pression par exemple). Ces derniers sont très utilisés sur les marchés de la pharmacie, de l'industrie cosmétique, de la parfumerie mais aussi de l'industrie agroalimentaire. Le terme « huile concrète » ou encore « essence » est alors utilisé pour caractériser ces extraits [60]. Même si elles diffèrent de par leur technique de production, les composés majoritaires des huiles essentielles et des huiles concrètes sont les monoterpènes et sesquiterpènes volatils.

### I.3.1.2. Les méthodes d'extractions dites conventionnelles

Les méthodes d'extraction utilisées pour la production d'huiles essentielles sont des méthodes dites conventionnelles et regroupent trois types de distillation : la distillation par entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion et l'hydrodistillation [61]. Les compositions des différentes huiles essentielles obtenues à l'aide de ces trois méthodes sont différentes. La méthode d'extraction conventionnelle utilisée pour obtenir une huile concrète est l'extraction par solvants non aqueux.

#### I.3.1.2.1. La distillation par entraînement à la vapeur d'eau

La distillation par entraînement à la vapeur d'eau est la méthode la plus utilisée pour l'extraction d'huiles essentielles de plantes. Dans cette technique, la matière végétale n'est pas en contact avec l'eau : la vapeur d'eau traverse la matière végétale disposée sur des plaques perforées. La vapeur d'eau détruit la structure des cellules végétales pour libérer les molécules volatiles. Ces dernières sont ensuite entraînées par la vapeur d'eau et condensées par refroidissement dans un condenseur. L'huile essentielle non miscible à l'eau doit ensuite être extraite de la solution aqueuse par simple décantation ou par une extraction liquide-liquide avec un solvant hydrophobe. Tout au long de la distillation, le ballon contenant la matière végétale est lui-même chauffé pour que la vapeur d'eau ne se liquéfie pas.

#### I.3.1.2.2. L'hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est un type de distillation par entraînement à la vapeur d'eau qui ne diffère que par la manière dont la vapeur est introduite dans le récipient. Pour l'hydrodiffusion, la vapeur est appliquée par le haut du matériel végétal, tandis que la vapeur est introduite par le bas pour la distillation par entraînement à la vapeur d'eau. L'hydrodiffusion a l'avantage d'être plus rapide et d'obtenir un rendement en huile essentielle plus important avec moins de vapeur d'eau utilisée.

### **I.3.1.2.3. L'hydrodistillation**

L'hydrodistillation est la méthode standard pour l'extraction d'huile essentielle à partir de matériel végétal. Dans cette technique, la matière végétale est complètement immergée dans de l'eau qui est ensuite portée à ébullition. L'eau environnante agit comme une barrière contre la surchauffe de l'échantillon permettant ainsi une certaine protection de l'huile essentielle extraite. De même que précédemment, les composés volatils sont ensuite entraînés par la vapeur d'eau, puis le mélange est condensé et l'huile essentielle contenue dans l'eau peut être récupérée par extraction liquide-liquide ou simple décantation.

### **I.3.1.2.4. L'extraction par solvants non aqueux**

Différents solvants tels que l'hexane, l'éther de pétrole, le méthanol, l'éthanol peuvent être utilisés pour l'extraction de l'huile concrète contenue dans les plantes. La technique d'extraction peut être une simple macération (chauffage d'un mélange de la matière végétale avec un solvant) ou peut prendre place dans différentes installations qui ne seront pas détaillées ici telles que le Soxhlet ou autres types d'extracteurs (statiques, mobiles...). Quelle que soit la technique utilisée, après extraction l'extrait est filtré puis le solvant distillé afin d'obtenir l'huile.

### **I.3.1.2.5. Les désavantages de ces méthodes conventionnelles**

Mêmes si ces méthodes d'extraction conventionnelles décrites précédemment sont toujours très utilisées pour l'obtention d'huiles riches en terpènes volatils à partir de matrice végétale, elles présentent néanmoins de nombreux désavantages. Tout d'abord, les techniques d'extraction par distillation ont une faible efficacité d'extraction, elles nécessitent une grande quantité de matière première pour ne récupérer qu'une faible quantité d'huile essentielle. L'inconvénient majeur de l'extraction par solvants non aqueux est son manque de sélectivité : de nombreuses substances lipophiles autres que les terpènes volatils (telles que les phospholipides, les caroténoïdes ainsi que des coumarines) peuvent se retrouver dans l'extrait et imposer une purification ultérieure. De plus cette méthode utilise une grande quantité de solvant organique toxique pour l'homme et pour l'environnement, pouvant se retrouver sous forme de traces dans l'extrait final. Après extraction, l'évaporation du solvant peut aussi conduire à des pertes des composés fortement volatils. De plus, le temps d'extraction de ces méthodes conventionnelles est relativement long, l'extraction dure souvent plusieurs heures [61]. Pour surmonter les limites de ces méthodes d'extraction conventionnelles, de nouvelles techniques d'extraction prometteuses sont introduites, appelées méthodes d'extraction non conventionnelles.

L'hydrodistillation étant la méthode standard pour l'extraction d'huile essentielle à partir de matière végétale et étant facile à mettre en place, elle sera utilisée dans notre étude comme méthode



d'extraction conventionnelle de référence à laquelle seront comparées d'autres méthodes d'extraction plus récentes présentées dans les parties suivantes.

### *I.3.2. Les techniques non conventionnelles pour l'extraction des terpènes volatils*

#### I.3.2.1. Descriptions des méthodes d'extractions non conventionnelles

Les extraits obtenus par les techniques d'extraction non conventionnelles ne peuvent plus s'appeler « huile essentielle », ils peuvent alors être simplement appelés extrait, ou extrait riche en composés terpéniques ou en encore extrait naturel. Les objectifs du développement de ces méthodes d'extraction sont de réduire le temps d'extraction, utiliser des solvants écoresponsables ainsi qu'augmenter le rendement d'extraction. Ces techniques non conventionnelles regroupent l'extraction par fluide supercritique, l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par microondes ainsi que l'extraction par solvant pressurisé.

##### **I.3.2.1.1. L'extraction par fluide supercritique (SFE, Supercritical Fluid Extraction)**

Les extraits obtenus par extraction par fluide supercritique (SFE) sont aussi compris dans l'appellation « huile concrète ». La SFE sur une plante correspond à une extraction solide-liquide en utilisant un fluide supercritique comme solvant d'extraction.

Un fluide supercritique est un fluide chauffé au-delà de sa température critique et comprimé au-dessus de sa pression critique. Ce fluide peut alors avoir la densité d'un liquide et la viscosité d'un gaz, ce qui se traduit par une bonne diffusibilité dans les solides et un bon pouvoir solvateur. Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est le fluide supercritique le plus couramment utilisé même si l'eau peut aussi être utilisée. Sous haute pression, le CO<sub>2</sub> se transforme en liquide qui est utilisé comme solvant pour extraire les molécules d'intérêt de la matière première. Après l'extraction, aucun résidu de solvant ne reste dans le produit final puisque le CO<sub>2</sub> liquide redevient un gaz et s'évapore sous pression atmosphérique et température ambiante, l'huile concrète est alors obtenue. L'extraction par SFE a été appliquée à de nombreuses plantes pour l'obtention de leurs huiles riches en terpènes volatils telles que le basilic (*Ocimum basilicum* (L.)), l'eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis* (Dehn.)), la lavande (*Lavandula angustifolia* (Mill.)), la menthe verte (*Mentha spicata* (L.)) ou encore le thym (*Thymus vulgaris* (L.)) [62].

##### **I.3.2.1.2. L'extraction assistée par ultrasons (UAE, Ultrasound-Assisted Extraction)**

Comme son nom l'indique, l'extraction assistée par ultrasons (UAE) consiste à une extraction solide-liquide dans un bain à ultrasons ou dans un récipient dans lequel une sonde à ultrasons est

immergée. Les ondes utilisées pour l'UAE ont une fréquence qui varie de 20 KHz à 100 MHz [63]. Les solvants d'extractions utilisés dans cette technique sont les mêmes que pour l'extraction conventionnelle par solvants c'est-à-dire l'hexane, l'éther de pétrole, le méthanol... Les ultrasons permettent de diminuer significativement le temps d'extraction en permettant une meilleure diffusion du solvant dans la matière végétale tout en augmentant le rendement par rapport aux méthodes conventionnelles. Cette méthode a été appliquée pour l'extraction de terpènes volatils dans différentes plantes telles que le sauge (*Salvia* (L.)), les graines de cumin (*Cuminum* (L.)) ou encore le curcuma (*Curcuma longa* (L.)) [64].

#### **I.3.2.1.3. L'extraction assistée par microondes (MAE, Microwaves-Assisted Extraction)**

La mise en place de l'extraction assistée par microondes (MAE) est similaire à l'UAE, elles ne diffèrent seulement par la nature des ondes envoyées sur l'échantillon. En effet, les microondes de la MAE ont une fréquence entre 300 MHz et 300 GHz [63]. Le phénomène physique de l'extraction n'est alors pas le même. L'énergie diffusée par les microondes va permettre de chauffer le solvant d'extraction au contact de la matière végétale, solubilisant ainsi les composés d'intérêt dans le solvant. La matrice solide peut elle aussi être sensible aux microondes, c'est alors elle qui sera chauffée préférentiellement ce qui conduira à la libération des substances à extraire dans le solvant. La MAE a été appliquée à l'extraction des terpènes volatils dans différentes matrices comme par exemple le laurier (*Laurus nobilis* (L.)), le sauge (*Salvia triloba* (L.)), le cumin noir (*Nigella sativa* (L.)) ou encore le géranium des bois (*Geranium sylvaticum* (L.)) [64].

#### **I.3.2.1.4. L'extraction par liquide pressurisé (PLE, Pressurized Liquid Extraction)**

L'extraction par liquide pressurisé est une extraction solide-liquide sous pression. Dans ces conditions, le solvant reste liquide au-delà de son point d'ébullition sous pression atmosphérique. Cela permet alors de travailler à des températures plus élevées et donc de diminuer considérablement le temps d'extraction. Les solvants d'extraction utilisés en PLE sont les mêmes que pour les méthodes précédentes (hexane, éthanol, méthanol...). L'eau peut aussi être utilisée. L'un des principaux avantages de cette méthode d'extraction par rapport aux précédentes est son automatisation. La PLE a été utilisée pour l'extraction des terpènes volatils à partir du romarin (*Rosmarinus officinalis* (L.)), de la citronnelle (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), du laurier (*Laurus nobilis* (L.)), des zestes de citron ou encore de différentes plantes médicinales chinoises [65].

### I.3.2.2. Les limites de ces techniques non conventionnelles

Les 4 techniques d'extraction présentées représentent une liste non exhaustive des méthodes d'extraction non conventionnelles utilisées pour l'obtention d'huile riche en terpénoïdes volatils. D'autres méthodes dérivées de ces techniques ont été développées comme par exemple l'hydrodistillation couplée aux ultrasons ou aux microondes afin de diminuer le temps d'extraction de l'hydrodistillation. La SFE, l'UAE, la MAE ainsi que la PLE ont de nombreux avantages communs. Ces méthodes d'extraction plus récentes non conventionnelles permettent de diminuer significativement le temps d'extraction : de plusieurs heures pour la distillation à moins d'une heure voire plusieurs minutes pour ces techniques. De plus ces méthodes ne nécessitent pas une grande quantité de matière première ni une grande quantité de solvant organique pour l'obtention de rendements similaires voir même dans la plupart des cas supérieurs à ceux obtenus par les méthodes conventionnelles. Cependant, dans toutes ces méthodes le solvant d'extraction est en contact direct avec le matériel végétal, même en choisissant un solvant de polarité préférable à l'extraction des terpènes volatils, les extraits sont susceptibles de contenir des molécules interférentes non volatiles. L'inconvénient majeur de ces méthodes d'extraction est leur non sélectivité aux molécules volatiles. De plus ces méthodes représentent tout de même un investissement de matériel technique, notamment pour la SFE et la PLE.

Parmi ces 4 techniques, la PLE permettant d'automatiser l'extraction et étant disponible au laboratoire a été choisi comme technique non conventionnelle de référence pour comparaison avec l'hydrodistillation mais aussi avec des méthodes plus sélectives aux molécules volatiles.

### I.3.3. Les méthodes de microextraction dans l'espace de tête

Ces dernières années, afin de surmonter les limites des méthodes utilisées couramment pour l'extraction de terpènes volatils à partir de matrices végétales, les méthodes de microextraction ont attiré beaucoup d'attention de par leur nombreux avantages : elles sont très sensibles, simples à utiliser et à mettre en place, avec un temps de prétraitement des échantillons très court et un facteur d'enrichissement élevé, nécessitant de faibles volumes de solvant (parfois sans solvant), et pouvant être automatisées. De plus ces techniques peuvent être appliquées aux échantillons gazeux, liquides et solides. Par conséquent, les techniques de microextraction deviennent un outil intéressant pour l'extraction des composés volatils à partir de matrices végétales [66]. Ces techniques peuvent être réalisées directement sur l'échantillon ou suite à une extraction classique par PLE, MAE ou encore SFE afin de concentrer les molécules volatiles et d'augmenter la sensibilité de la méthode. Pour augmenter la sélectivité de la méthode vers les composés volatils, les méthodes de microextraction peuvent aussi être mises en place directement dans l'espace de tête de l'échantillon solide, permettant

ainsi de limiter les prétraitements de l'échantillon solide au préalable et donc limiter la perte de composés d'intérêt. De plus, l'utilisation de la microextraction dans l'espace de tête permet d'éliminer tout interférent non volatil. La méthode d'extraction dans l'espace de tête (HS, Headspace) la plus simple et la plus ancienne repose simplement sur le prélèvement à l'aide d'une microseringue du gaz présent dans l'espace de tête de l'échantillon. Le gaz contenu dans la microseringue est ensuite directement injecté dans l'analyseur. Cette méthode d'extraction a été appliquée pour l'extraction de composés volatils dans de nombreuses plantes médicinales dans les années 80 [67]. Bien que cette méthode soit sélective des composés volatils, elle n'est pas très sensible due à la dispersion des molécules dans l'espace gazeux. En effet, au minimum 1 mL de l'espace de tête doit être prélevé afin d'obtenir une réponse suffisamment importante dans l'analyseur. Ainsi différentes méthodes de microextraction dans l'espace de tête (HS-ME, Headspace Microextraction) se sont développées plus récemment afin d'augmenter cette sensibilité envers les composés volatils. Les méthodes de HS-ME peuvent être divisées en deux catégories : les techniques de microextraction à base d'absorbants et les techniques de microextraction en phase liquide.

### I.3.3.1. Les techniques de microextraction à base d'absorbants

#### I.3.3.1.1. La microextraction sur phase solide (SPME, Solid Phase Microextraction)

Basée sur la théorie de la sorption (adsorption/absorption), la microextraction en phase solide (SPME) a été développée par le groupe de Pawliszyn en 1990 comme une technique d'extraction sans solvant [68]. La SPME consiste à extraire les composés d'intérêt d'une matrice liquide, solide ou gazeuse par sorption sur une fibre polymérique. Une fois le temps d'extraction nécessaire écoulé, la fibre peut être désorbée directement dans l'injecteur de l'analyseur. Bien qu'il s'agisse d'une technique d'extraction non exhaustive (limitée par des équilibres), la SPME a rapidement été acceptée comme une technique simple, miniaturisée, écoresponsable et qui associe échantillonnage, extraction, et concentration en une seule étape. Grâce à ses avantages, la SPME est rapidement devenue l'une des techniques les plus utilisées dans divers domaines de la chimie analytique dont pour l'extraction de terpènes volatils bioactifs dans les plantes. La SPME peut être utilisée en immersion directe (la fibre est complètement immergée dans la matrice liquide) ou suspendue dans l'espace de tête (la fibre est exposée à la phase gazeuse au-dessus de l'échantillon liquide ou solide). La SPME dans l'espace de tête (HS-SPME) est la plus adaptée pour l'extraction de composés volatils à partir de matrices solides sans prétraitement nécessaire. Belliardo *et al.* [69] ont recensé une centaine d'articles portant sur l'extraction par HS-SPME des composés volatils dans les plantes aromatiques et médicinales dont le thym (*Thymus vulgaris* (L.)), le romarin (*Rosmarinus officinalis* (L.)), différentes espèces d'eucalyptus, le sauge (*Salvia officinalis* (L.)), le gingembre (*Zingiber officinale* (Roscoe)), l'ail (*Allium sativum* (L.)) ou encore la camomille (*Matricaria recutita* (L.)). Dans certaines études,

l'extraction par HS-SPME a été comparé à des méthodes d'extraction plus classiques et conventionnelles. Une étude sur les composés volatils (principalement les monoterpènes et les sesquiterpènes) du poivre noir a montré que la HS-SPME pourrait être une alternative à l'hydrodistillation. En effet, la composition de l'extrait obtenu par HS-SPME était similaire à celle de l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation. En 2 min d'extraction par HS-SPME tous les monoterpènes de l'huile essentielle correspondante étaient extraits (à comparer à 2 h de distillation) [70]. De même une étude comparant l'hydrodistillation, la SFE et la HS-SPME pour l'extraction de composés volatils de deux espèces de plante chinoise (*Perilla frutescens* (L.) Britton) a montré que les trois méthodes permettaient d'obtenir des extraits de composition très proche mais pour des temps d'extraction très différents : 6 h pour l'hydrodistillation, 60 min pour la SFE et 20 min pour la HS-SPME [71]. La HS-SPME s'introduit alors comme une alternative aux méthodes d'extractions conventionnelles fastidieuses pour l'extraction des volatils à partir de matières végétales.

#### **I.3.3.1.2. L'extraction par sorption dans l'espace de tête (HSSE, Headspace Sorptive Extraction)**

L'extraction par sorption sur barreau magnétique (SBSE, Stir Bar Sorptive Extraction) est comme la SPME une méthode basée sur la sorption des composés d'intérêt mais cette fois-ci sur un barreau magnétique recouvert d'une phase polymérique à la place de la fibre de la SPME. Cette méthode, plus récente que la SPME, fut introduite par Baltussen *et al.* en 1999 [72]. Comme la technique précédente, le barreau extracteur peut soit être placé directement dans l'échantillon liquide soit être disposé dans l'espace de tête au-dessus d'un échantillon solide ou liquide, la méthode est alors appelée extraction par sorption dans l'espace de tête (HSSE, Headspace Sorptive Extraction). De par la taille du barreau supérieure à celle de la fibre, la surface et la quantité de revêtement du barreau HSSE sont supérieures à celles du revêtement de la fibre SPME, c'est là le principal avantage de la HSSE. Par conséquent, l'efficacité d'extraction est améliorée par rapport à la SPME [66].

Cependant, les temps d'extraction de l'HSSE reportés dans la littérature sont souvent plus longs que ceux pour la SPME dû à la diffusion des composés d'intérêts dans un volume plus important de revêtement. Après extraction, le barreau magnétique peut être soit désorbé thermiquement dans une unité spéciale appelée unité de désorption thermique (TDU, Thermal Desorption Unit) fixée sur l'injecteur de l'analyseur soit désorbé chimiquement dans un solvant approprié. Malgré la sélectivité de la HSSE pour les composés volatils par rapport à la SBSE, peu de travaux utilisant cette approche sont décrits dans la littérature. En effet, Prieto *et al.* [73] ont inventorié en 2010 les articles concernant l'extraction par SBSE et HSSE dans différents domaines. Sur environ 200 articles cités, seulement 14 utilisent l'HSSE. Cette technique a néanmoins été utilisée dans de nombreux domaines, à savoir dans l'environnement pour l'extraction de contaminants dans l'eau par exemple, dans l'agroalimentaire pour l'extraction de composés aromatiques dans différents aliments mais aussi pour l'extraction de

composés volatils dans les plantes. Depuis 2010, une dizaine d'articles sont parus pour l'extraction par HSSE de composés volatils dans le miel, le vin, les fraises, le jus de fruits, les levures, les tisanes, le café, le fromage... Cette méthode reste aujourd'hui encore très peu utilisée malgré des résultats prometteurs. En effet, certains auteurs ont comparé l'HSSE à la SPME. Par exemple, Barba *et al.* [74] ont montré que la HSSE était plus sensible pour l'extraction de composés volatils dans les jus de fruits que la HS-SPME. De même, dans le cadre d'une étude portant sur l'extraction des composés volatils dans le café torréfié, l'HSSE a montré une meilleure efficacité d'extraction, ainsi qu'une sensibilité et même une sélectivité plus élevées, par rapport à la HS-SPME. L'HSSE a permis d'extraire plus de composés dans une abondance plus importante [75]. De plus, tout comme la HS-SPME, mais contrairement à la SBSE, l'HSSE ne nécessite pas de préparation d'échantillon à partir de la matière végétale, l'extraction peut être réalisée directement sur la matière sous sa forme solide. L'application de l'HSSE pour l'extraction des terpènes volatils bioactifs dans les plantes semble alors intéressante à étudier et à comparer avec la HS-SPME.

### I.3.3.2. Les techniques de microextraction en phase liquide

#### **I.3.3.2.1. La microextraction en phase liquide assistée par fibre creuse (HF-LPME, Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction)**

La microextraction en phase liquide assistée par fibre creuse (HF-LPME, Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction), développée en 1999 par Pedersen-Bjergaard et Rasmussen [76], repose sur l'utilisation d'une fibre creuse poreuse dans laquelle est inséré un solvant pour l'absorption des composés d'intérêt. Cette technique peut être réalisée en mode biphasique avec le même solvant organique contenu dans les pores et au centre de la fibre ou en mode triphasique en remplissant le centre de la fibre et ses pores de deux solvants différents. La fibre creuse contenant le ou les solvants est plongée dans l'échantillon liquide et les molécules s'absorbent dans le solvant par affinité.

Le solvant utilisé pour remplir la fibre ne doit pas être miscible au solvant de l'échantillon. Après extraction, le solvant contenu dans la fibre est récupéré et analysé. Il faut attendre jusqu'en 2005 avant de voir une version de la HF-LPME dans l'espace de tête. Dans cette étude, une fibre creuse dont les pores sont remplies avec du 1-octanol est suspendu dans l'espace de tête d'un échantillon de terre pour l'extraction de 6 hydrocarbures aromatiques polycycliques [77]. Aujourd'hui, cette méthode est encore très peu utilisée et son application se limite surtout au domaine de l'environnement [78]. Cette méthode de microextraction en phase liquide étant fastidieuse à mettre en place, n'a pas été développée dans cette étude pour l'extraction des terpènes volatils à partir de matières végétales.

#### **I.3.3.2.2. La microextraction liquide sur une goutte (SDME, Single Drop Microextraction)**

La microextraction liquide sur une goutte (SDME, Single Drop Microextraction) est l'une des techniques de microextraction en phase liquide la plus simple et donc la plus utilisée. Cette méthode, développée en 1996, était connue à l'origine sous le nom d'extraction par solvant dans une microgoutte [79] ou de microextraction par solvant dans une goutte unique [80]. Comme son nom l'indique, en SDME, l'extraction s'effectue par dissolution des analytes dans une goutte de liquide (de quelques microlitres) en suspension à l'extrémité d'une aiguille d'une microseringue immergée dans l'échantillon (le solvant d'extraction ne peut être miscible avec l'échantillon) ou placée dans l'espace de tête au-dessus de l'échantillon (HS-SDME). Après l'extraction, la goutte peut être injectée directement dans la GC. L'un des avantages de la HS-SDME par rapport à la SDME, autre que sa sélectivité des composés volatils, est la meilleure stabilité de la goutte. En effet le fait de suspendre la goutte dans l'espace de tête plutôt que l'immergée dans l'échantillon permet de limiter les risques que la goutte ne tombe. De plus, le choix du solvant pour la HS-SDME n'est pas contraint par la nature du solvant de l'échantillon, contrairement à la SDME en immersion. En HS-SDME, tout comme en HS-SPME et en HSSE, l'échantillon solide ne nécessite pas de prétraitement, ce qui n'est pas le cas pour la SDME. La première utilisation de la HS-SDME était appliquée à l'extraction de solutions de benzène, toluène, éthylbenzène et xylène dans une goutte de 1  $\mu$ L d'octanol [81]. Depuis, la HS-SDME a été utilisée dans de nombreux domaines dont pour l'extraction de composés volatils dans les plantes médicinales telles que le myrte (*Myrtus communis* (L.)), les fleurs de chrysanthème (*Chrysanthemum* (L.)) ou encore le *Mosla chinensis* (Maxim.) [66]. Dans une étude, la HS-SDME a été comparée à la HS-SPME ainsi qu'à l'hydrodistillation pour l'extraction de composés volatils dans *Myrtus communis* (L.). Les résultats ont montré que la HS-SDME pouvait être utilisée au même titre que la HS-SPME pour l'extraction de composés volatils dans les plantes aromatiques, et que ces techniques sont plus facile à mettre en œuvre et plus efficace que l'hydrodistillation pour l'extraction d'un plus grand nombre de composés volatils [82]. Le grand avantage de la HS-SDME par rapport à la HS-SPME est qu'elle n'est pas seulement une méthode d'analyse, elle est une méthode de préparation d'échantillon.

En effet, après extraction, la goutte peut être récupérée pour réaliser des tests biologiques par exemple. Tout comme pour la HSSE couplée à une désorption chimique. Aucune étude comparant l'efficacité de la HS-SDME et de la HSSE n'a été réalisée pour l'extraction des terpènes volatils dans les plantes. Ainsi notre étude porte sur l'application de deux méthodes de microextraction (HSSE et HS-SDME) dont l'efficacité semble similaire à la HS-SPME pour l'obtention d'extraits riches en molécules terpéniques à partir de différentes plantes.

Le TABLEAU I - 2 compare les avantages et les inconvénients établis à partir de la littérature des 4 méthodes de microextraction décrites précédemment.

TABLEAU I - 2 - Comparaison des avantages et inconvénients des méthodes de microextraction à partir de la littérature (adapté de Yang et al. [64])

	Microextraction à base d'absorbants		Microextraction en phase liquide	
	HS-SPME	HSSE	HF-LPME	HS-SDME
Extractant	Fibre	Barreau magnétique	Fibre creuse	Goutte de solvant
Temps d'extraction (min)	5-120	30-240	10-120	10-30
Coût	Modéré	Modéré	Faible	Faible
Potentiel pour automatisation	Elevé	Modéré	Faible	Modéré
Avantages	Sans solvant ; bonne efficacité	Bonne efficacité	Nombre infini de phases d'extraction ; grande stabilité	Nombre infini de phases d'extraction
Inconvénients	Faible diversité de phases d'extraction ; faible robustesse	Faible diversité de phases d'extraction ; temps d'extraction long	Besoin d'un préconditionnement de la fibre ; possibilité d'effets mémoire	Faible stabilité du solvant

#### I.3.4. Des solvants d'extraction émergents : les solvants eutectiques profonds (DES)

L'un des paramètres le plus important de la HS-SDME est le choix du solvant. En effet, ce dernier doit répondre à un certain nombre de critères afin d'assurer une bonne stabilité de la goutte suspendue à l'aiguille. Les solvants utilisés classiquement en SDME sont le toluène, l'isooctane ou encore l'octanol, des solvants organiques suffisamment visqueux pour permettre la suspension de la goutte. Cependant ces solvants, même s'ils sont utilisés en très faible quantité, sont pour la plupart toxiques pour l'environnement et peuvent représenter un danger pour l'être humain. Ainsi, à partir des années 2000, les liquides ioniques ont commencé à être utilisés dans l'extraction par SDME.

Les liquides ioniques sont des sels sous forme liquide à température ambiante, ils sont généralement constitués de cations organiques volumineux et asymétriques et d'anions organiques ou inorganiques. La première étude reportant l'utilisation des liquides ioniques pour la HS-SDME a montré que ces solvants permettaient d'augmenter le facteur d'enrichissement par trois par rapport aux solvants organiques classiques utilisés pour l'extraction d'hydrocarbures aromatiques polycycliques [83]. Les liquides ioniques se caractérisent par un ensemble unique de propriétés physico-chimiques qui comprennent : une pression de vapeur négligeable, une stabilité thermique, une viscosité et une densité élevées ainsi qu'une affinité aux composés organiques et inorganiques. De plus ces solvants semblent avoir une toxicité moins importante que les solvants organiques. Les liquides ioniques ont alors été



utilisés comme solvant d'extraction pour la SDME et la HS-SDME pour l'extraction de diverses molécules (métaux, composés volatils, arômes, chlorobenzènes...) dans le domaine de l'environnement (contaminants dans l'eau) et de l'agroalimentaire (fruits, plantes, lait...) [84].

Cependant, ces solvants présentent des inconvénients majeurs qui sont aujourd'hui bien connus à savoir une toxicité non négligeable pour l'homme et l'environnement ainsi qu'un coût de synthèse et de purification très élevé [85]. Des solvants émergents appelés solvants eutectiques profonds (DES, Deep Eutectic Solvents) se présentent alors non seulement comme une alternative aux solvants organiques mais aussi comme une amélioration des liquides ioniques.

#### I.3.4.1. Présentation des solvants eutectiques profonds (DES, Deep Eutectic Solvents)

En 2001, Abbot *et al.* [86] ont démontré qu'un mélange de chlorure de choline (ChCl) et d'un sel métallique (chlorure de zinc) pouvait former un liquide à des températures inférieures à 100 °C, les températures de fusion de chacun de ces composés étant bien supérieures à 100 °C (proche de 300 °C pour les deux composés). Deux ans plus tard, le même groupe a mis au point un mélange de ChCl avec un donneur de liaison d'hydrogène (l'urée) liquide à température ambiante, et ont désigné ce mélange comme un solvant eutectique profond (DES) [87]. Un DES est alors défini comme un mélange eutectique composé de deux ou trois composants, généralement peu chers et non toxiques, qui sont capables de s'associer entre eux par des interactions entre liaisons hydrogènes. Les DESs, contrairement aux liquides ioniques, sont des mélanges et non des composés purs. Un DES serait donc, en principe, le résultat de la combinaison au bon ratio molaire d'un donneur de liaison hydrogène (HBD, Hydrogen Bond Donor) et d'un accepteur de liaison hydrogène (HBA, Hydrogen Bond Acceptor) (FIGURE I - 15).

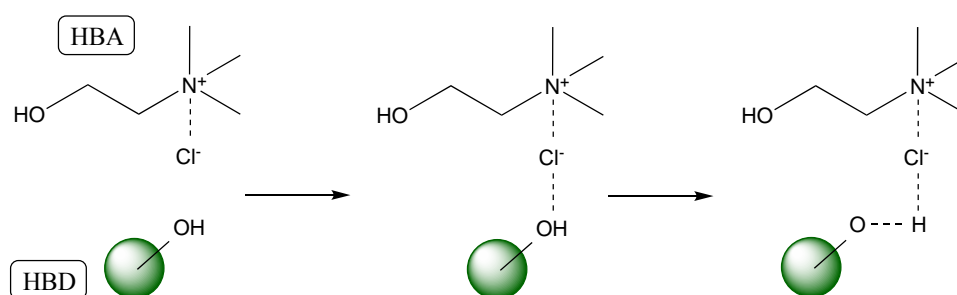


FIGURE I - 15 - Interaction d'un HBD avec l'ammonium quaternaire chlorure de choline (adapté de Francisco *et al.* [86])

Ce « bon » ratio molaire correspond au ratio du point eutectique. A ce ratio molaire, un refroidissement du mélange en dessous de sa température eutectique conduira à un solide. A tout autre ratio molaire, un refroidissement du mélange conduira à un mélange solide-liquide des deux composants du DES avant de conduire à un solide en diminuant encore la température. Le point

eutectique est remarquable dans la mesure où deux composés peuvent se combiner dans des proportions précises pour devenir mutuellement compatibles de manière à abaisser considérablement le point de fusion du mélange (FIGURE I - 16). Le point de fusion du DES est alors bien plus bas que le point de fusion de chacun des composés purs.

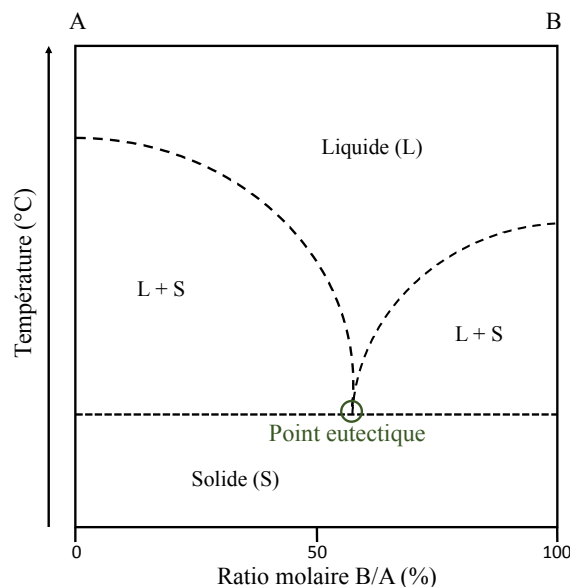


FIGURE I - 16 - Diagramme de phase d'un mélange de deux composés (A et B) (adapté de Liu *et al.* [87])

L'idée d'obtenir des liquides simplement en mélangeant des composés solides avec des points de fusions élevés a été très bien accueillie par la communauté scientifique et, par la suite, le nombre de publications portant sur la synthèse de DES, leur caractérisation ainsi que leur utilisation a considérablement augmenté depuis les dix dernières années. Au début, les DESs étaient généralement des mélanges de sel d'ammonium quaternaire avec des sels métalliques ou un HBD ayant la capacité de former une liaison hydrogène avec l'anion halogénure du sel d'ammonium quaternaire.

L'un des HBA les plus répandus était alors le ChCl. En effet, ce dernier est un sel d'ammonium quaternaire peu coûteux, biodégradable et non toxique qui peut être soit extrait de la biomasse, soit facilement synthétisé à partir de réserves fossiles [90]. D'autres halogénures ont été utilisés comme HBA tels que le bromure de méthyltriphenylphosphonium, le chlorure de benzyltriphenylphosphonium, le chlorure d'acétylcholine, ou encore le chlorure de tétraméthylammonium. Les HBDs les plus couramment utilisés étaient des amines, des acides carboxyliques, des alcools ou encore des polyols. Plus récemment, Choi *et al.* [91] ont exploré les produits naturels, dont les métabolites primaires, comme source pour la formation de nouveaux DESs appelés solvants eutectiques profonds naturels (NADES, Natural Deep Eutectic Solvents). Depuis, plus d'une centaine de NADESs résultants de composition de produits naturels ont vu le jour [89]. Les composants des NADESs sont des amines (ChCl, chlorure d'ammonium) ou des acides aminés (alanine, proline, glycine, bétaïne) comme principaux HBAs tandis que les acides organiques (acide

oxalique, acide lactique, acide malique...) ou les glucides (glucose, fructose, maltose...) sont plus courants comme HBDs. Puis des NADESs ont été formés à partir de métabolites secondaires comme par exemple les terpènes. Martins *et al.* [92] ont synthétisé et étudié les diagrammes de phase de 12 nouveaux NADESs obtenus en combinant des terpènes volatils (le thymol et le menthol) et des acides carboxyliques (l'acide caprylique, l'acide caprique, l'acide laurique, l'acide palmitique...). Ainsi, comparés aux liquides ioniques, les DESs et les NADESs présentent de nombreux avantages tels qu'un prix faible, une inertie chimique avec l'eau (les liquides ioniques quant à eux ont tendance à se charger rapidement en eau) facilitant ainsi leur stockage, une synthèse rapide et facile (aucune purification nécessaire), une biocompatibilité et une non-toxicité renforçant ainsi le caractère « vert » de ces solvants [90].

#### I.3.4.2. Méthode de préparation d'un DES

Contrairement aux liquides ioniques, la synthèse des DESs est très facile et rapide. Il existe trois méthodes aujourd'hui pour former un DES [93]:

- Par chauffage et agitation : les composants constituant le DES sont placés dans un flacon fermé et agité à l'aide d'un agitateur magnétique à une température comprise entre 80 et 100 °C jusqu'à l'obtention d'un liquide clair.
- Par évaporation : après le mélange et la dissolution des composants du DES dans l'eau, celle-ci est évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif à 50 °C. Le solvant ainsi obtenu est ensuite maintenu dans un dessiccateur jusqu'à masse constante.
- Par lyophilisation : les composants du DES sont mélangés et dissout dans l'eau. Le DES est ensuite refroidi à -80 °C avant d'être lyophilisé pendant environ 18 h afin de permettre l'évaporation de l'eau.

#### I.3.4.2. Propriétés physicochimiques des DESs

Comme les liquides ioniques, les DESs sont des solvants dont les propriétés physicochimiques sont adaptables puisqu'ils peuvent être conçus en combinant correctement divers HBA et HBD. Ces solvants émergents correspondent ainsi à des solvants fait sur mesure. En effet, en fonction de l'utilisation souhaitée, la viscosité, la densité, la conductivité, la température de fusion, et la polarité du solvant peuvent être facilement modifiés en changeant l'un des deux composants du DES. Même si il est difficile d'évaluer l'influence du changement du HBA ou du HBD sur les propriétés physicochimiques du DES résultant, quelques généralités ont été démontrées dans la littérature [90].

La température de fusion du DES dépend directement de ses composants et de leur rapport molaire. Par exemple, le point de fusion d'un DES dérivé de sel de choline combiné à l'urée varie suivant la

nature du contre ion du sel et diminue dans l'ordre de  $F^- > NO_3^- > Cl^- > BF_4^-$ . La densité de la plupart des DESs est plus élevée que celle de l'eau et que celles des HBDs purs. Elle est directement liée à l'organisation des molécules et dépend donc fortement de la nature des composants du DES. La viscosité des DESs est généralement assez élevée, supérieure à 100 cP à température ambiante, c'est-à-dire 100 fois plus élevée que la viscosité de l'eau qui est d'environ 1 cP à 20 °C. De même que pour la température de fusion et la densité, la viscosité d'un DES est fortement dépendante de la nature chimique de ses constituants ainsi que du ratio molaire HBA/HBD. Par exemple, la viscosité d'un DES basé sur le ChCl est plus faible lorsque le HBD correspondant est l'éthylène glycol et est plus élevée lorsque ce sont des sucres (xylitol, sorbitol...) ou des acides carboxyliques (acide malonique) utilisés comme HBDs. En effet, ces derniers forment des structures intermoléculaires plus robustes, augmentant ainsi la viscosité du mélange eutectique. La large gamme de polarité couverte par les DESs est dépendante de leur composition. La polarité du DES est directement liée à celle de son HBA et son HBD.

Les propriétés physicochimiques des DESs sont aussi dépendantes de la température. En effet, la densité et la viscosité d'un DES diminue avec une augmentation de la température [88].

La toxicité des DESs dépend de sa composition, de sa viscosité ainsi que de la concentration du DES [94]. La toxicité du DES est directement lié à la toxicité de ses deux composants. Ainsi, l'utilisation de métabolites primaires ou secondaires naturels pour la synthèse de NADES permet de diminuer significativement la toxicité du solvant et d'augmenter sa biodégradabilité. Cette faible toxicité du NADES est l'un des avantages majeurs de ces solvants émergents par rapport aux liquides ioniques.

#### I.3.4.3. Utilisation des DESs pour l'extraction de molécules bioactives

Grâce à leurs nombreux avantages, les DESs sont aujourd'hui utilisés dans de nombreux domaines de la chimie : synthèse organique, catalyse, électrochimie, préparation de matériaux et de nanoparticules, biochimie et en chimie analytique [95].

Les DESs peuvent être utilisés comme phase mobile, phase stationnaire ou comme additif/modificateur en chromatographie. Par exemple, Tan *et al.* [96] ont montré qu'un ajout d'une petite quantité de DES dans une phase mobile composée d'acétonitrile permet une meilleure séparation de 4 alcaloïdes quaternaires par HPLC sur une colonne  $C_{18}$ . De plus une amélioration de la résolution ainsi qu'une diminution de l'élargissement des pics ont été observés (FIGURE I - 17).

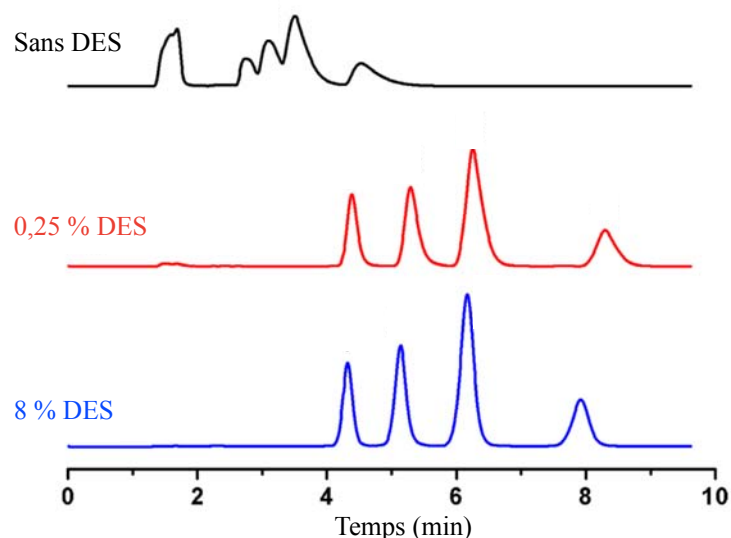


FIGURE I - 17 - Influence de l'ajout de DES composé de ChCl et éthylène glycol à un ratio molaire de 1 :3 dans la phase mobile pour la séparation d'alkaloïdes sur une colonne C18 (adapté de Tan *et al.* [94])

L'une des principales fonctionnalités du DES est la possibilité d'être utilisé comme solvant d'extraction pour une large gamme de composés chimiquement différents. En effet, les DESs présentent des propriétés physico-chimiques appropriées en tant que solvant pour la préparation d'échantillon : une volatilité négligeable, un état liquide même à des températures inférieures à la température ambiante, une viscosité ajustable, une bonne biodégradabilité, et un pouvoir solubilisant élevé des composés polaires et apolaires [97]. Ces solvants émergents ont été utilisés pour extraire différents composés bioactifs tels que des composés phénoliques (flavonoïdes), des polysaccharides, des protéines, des tanshinones, de la kératine, de l'astaxanthine ou encore des terpénoïdes [85]. Les DESs sont utilisés comme solvants extracteurs dans des techniques d'extraction classiques comme l'extraction assistée par ultrasons (UAE), l'extraction assistée par microondes (MAE), l'extraction liquide-liquide ou encore une simple extraction par chauffage et agitation. Ces solvants ont souvent montré une efficacité d'extraction des composés d'intérêt plus importante que les solvants utilisés traditionnellement. Par exemple, Chen *et al.* [98] ont étudié 25 DESs basés sur ChCl pour l'extraction de composés hydrophiliques et hydrophobiques dans les racines de saule rouge (*Salviae miltiorrhizae*). Trois méthodes d'extraction ont été comparées : UAE, MAE et distillation. Pour chaque méthode, le rendement d'extraction en utilisant le meilleur DES pour l'extraction des composés d'intérêts (ChCl/1,2-propanediol (1:1)) était comparable voire supérieur à celui des méthodes conventionnelles utilisant des solvants organiques.

De même, García *et al.* [99] ont étudié la capacité de 11 DESs pour l'extraction de composés phénoliques dans l'huile d'olive vierge. L'extraction liquide-liquide a été réalisée sous agitation à 40 °C. Dans les conditions d'extraction utilisées dans cet article, presque tous les DESs étudiés ont montré une efficacité d'extraction des composés d'intérêts plus importante que le solvant

conventionnel (méthanol/eau). Les DESs se sont avérés être d'excellents solvants d'extraction pour une large gamme de composés ayant différentes polarités, de ceux très solubles dans l'eau à ceux peu solubles dans l'eau. Ces études montrent que les DESs sont potentiellement de bons solvants d'extraction non toxiques, facile à synthétiser et dont les propriétés chimiques sont facilement modifiables, pour l'extraction de composés bioactifs. Seulement 4 articles ont étudié les DESs pour l'extraction des terpènes dans les plantes, dont 2 concernent l'extraction des terpènes trilactones dans le Ginkgo Biloba [100,101]. Les 2 autres articles étudient l'extraction des terpènes volatils par les DESs. Jeong *et al.* [102] ont montré que les DESs pouvaient être utilisés pour l'extraction simultanée des monoterpènes et des composés phénoliques dans les feuilles de menthe poivrée (*Mentha piperita* (L.)) par UAE. Enfin, le potentiel des DESs comme solvant extracteur pour la HS-SDME a été étudié par Tang *et al.* [103]. Cette étude compare le HS-SDME couplée à un DES à des méthodes d'extraction conventionnelles (UAE et distillation) pour l'extraction de trois terpénoïdes volatils (linalol,  $\alpha$ -terpinéol et acétate de terpényle) dans les feuilles de cyprès du Japon (*Chamaecyparis obtusa* (Siebold & Zucc.) Endl.). La technique HS-SDME couplée au DES ChCl/éthylène glycol a permis une meilleure extraction des composés ciblés comparé aux deux autres méthodes étudiées. Ainsi, les DESs se présentent comme des solvants alternatifs possible pour la HS-SDME. De plus ces solvants possèdent un avantage majeur pour leur utilisation en SDME : leur viscosité élevée. En effet, une viscosité élevée facilite la suspension de gouttes plus grosses à l'extrémité d'une aiguille tout en assurant leur stabilité.

Dans cette thèse, nous nous sommes alors intéressés à l'utilisation de solvants « verts » émergents pour l'extraction de terpènes volatils dans différentes plantes par HS-SDME. Ces solvants présentent de nombreux avantages à être utilisé à la place des solvants organiques actuels. Ils n'ont encore été que très peu étudiés pour l'extraction des terpènes volatils ainsi que pour leur couplage avec la HS-SDME. De plus, leur faible toxicité permet un couplage rapide entre l'étape d'extraction et les tests biologiques.

#### I.4. OBJECTIFS DU PROJET DE THESE « TER-PAIN »

Les objectifs de ce projet peuvent être séparés en deux : un objectif purement axé chimie analytique et un autre dont le but est de répondre à des problématiques biologiques.

L'objectif « chimie analytique » de cette thèse est de mettre en place une technique pour l'extraction des terpènes volatils de différentes polarités à partir de matières végétales. Afin de surmonter les limites et les inconvénients des méthodes conventionnelles pour l'obtention d'huiles riches en terpénoïdes volatils (hydrodistillation et PLE), des méthodes plus récentes et plus sélectives seront étudiées pour l'extraction des terpènes volatils telles que la HS, la HS-SPME, la HSSE ainsi que la HS-SDME couplée aux DESs.

Le deuxième challenge de ce projet de thèse est de trouver un moyen de soulager les personnes atteintes de douleurs chroniques inflammatoires à l'aide de nouvelles plantes médicinales contenant des terpènes volatils. Cela permettrait de diminuer la consommation de médicament et de soigner la population par des méthodes considérées aujourd'hui comme étant plus douces. Ainsi la technique ayant montré la plus grande efficacité d'extraction pour l'extraction des monoterpènes et sesquiterpènes volatils dans la première partie du projet, pourra être appliquée pour produire des extraits de plantes riches en terpènes volatils. L'activité anti-inflammatoire des extraits de plantes sera alors évaluée à l'aide d'un test biologique cellulaire anti-TNF- $\alpha$ .

L'enjeu majeur de cette thèse est donc de combiner les deux objectifs en développant une technique efficace pour l'extraction des terpènes volatils mais qui soit directement compatible avec les tests biologiques *in vitro*, c'est-à-dire en utilisant des solvants non toxiques et en limitant la dilution des extraits pour ne pas perdre leur activité anti-inflammatoire.

## I.5. RÉFÉRENCES

- [1] J.D. Loeser, L. Arendt-Nielsen, R. Baron, A. Basbaum, M. Bond, H. Breivik, D. Clauw, A. De Laat, R. Dworkin, M.A. Giamberardino, P. Goadsby, M. Haanpaa, A. Okifuji, J. Paice, A. Woda, Part III - Pain Terms, in: *Classif. Chronic Pain*, **2011**: pp. 209–214.
- [2] R.-D. Treede, W. Rief, A. Barke, Q. Aziz, M.I. Bennett, R. Benoliel, M. Cohen, S. Evers, N.B. Finnerup, M.B. First, M.A. Giamberardino, S. Kaasa, B. Korwisi, E. Kosek, P. Lavand'homme, M. Nicholas, S. Perrot, J. Scholz, S. Schug, B.H. Smith, P. Svensson, J.W.S. Vlaeyen, S.-J. Wang, Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP classification of chronic pain for the international classification of diseases (ICD-11), *Pain*. 160 (2019) 19–27.
- [3] N. Attal, M. Lanteri-Minet, B. Laurent, J. Fermanian, D. Bouhassira, The specific disease burden of neuropathic pain: Results of a French nationwide survey, *Pain*. 152 (2011) 2836–2843.
- [4] J. Scholz, N.B. Finnerup, N. Attal, Q. Aziz, R. Baron, M.I. Bennett, R. Benoliel, M. Cohen, G. Cruccu, K.D. Davis, S. Evers, M. First, M.A. Giamberardino, P. Hansson, S. Kaasa, B. Korwisi, E. Kosek, P. Lavand'homme, M. Nicholas, Tu. Nurmikko, S. Perrot, S.N. Raja, A.S.C. Rice, M.C. Rowbotham, S. Schug, D.M. Simpson, B.H. Smith, P. Svensson, J.W.S. Vlaeyen, S.-J. Wang, A. Barke, W. Rief, R.-D. Treede, The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain, *Pain*. 160 (2019) 53–59.
- [5] J. Scholz, C.J. Woolf, The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia, *Nat. Neurosci.* 10 (2007) 1361–1368.
- [6] A.J. Todd, Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn, *Nat. Rev. Neurosci.* 11 (2010) 823–836.
- [7] W. Zieglgänsberger, Substance P and pain chronicity, *Cell Tissue Res.* 375 (2019) 227–241.
- [8] R.D. Mellon, B.M. Bayer, Evidence for central opioid receptors in the immunomodulatory effects of morphine: Review of potential mechanism(s) of action, *J. Neuroimmunol.* 83 (1998) 19–28.
- [9] D.D. Chaplin, Overview of the immune response, *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010) S3–S23.
- [10] C.N. Serhan, S.D. Brain, C.D. Buckley, D.W. Gilroy, C. Haslett, L.A.J. O'Neill, M. Perretti, A.G. Rossi, J.L. Wallace, Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms, *FASEB J.* 21 (2007) 325–332.
- [11] J. Choi, C. Selmi, P.S.C. Leung, T.P. Kenny, T. Roskams, M.E. Gershwin, Chemokine and chemokine receptors in autoimmunity: the case of primary biliary cholangitis, *Expert Rev. Clin. Immunol.* 12 (2016) 661–672.
- [12] W.P. Arend, M. Malyak, C.J. Guthridge, C. Gabay, Interleukin-1 receptor antagonist: Role in biology, *Annu. Rev. Immunol.* 16 (2002) 27–55.
- [13] J. Catalan-Dibene, M.I. Vazquez, V.P. Luu, S.-P. Nuccio, A. Karimzadeh, J.M. Kastenschmidt, S.A. Villalta, I. Ushach, E.J. Pone, P. Casali, M. Raffatellu, A.M. Burkhardt, M. Hernandez-Ruiz, G. Heller, P.A. Hevezi, A. Zlotnik, Identification of IL-40, a novel B cell-associated cytokine, *J. Immunol.* 47 (2017) 549–562.
- [14] M. Akdis, S. Burgler, R. Cramer, T. Eiwegger, H. Fujita, E. Gomez, S. Klunker, N. Meyer, L. O'Mahony, O. Palomares, C. Rhyner, N. Quaked, A. Schaffartzik, W. Van De Veen, S. Zeller, M. Zimmermann, C.A. Akdis, Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : Receptors, functions, and roles in diseases, *J. Allergy Clin. Immunol.* 127 (2011) 701-721.e70.
- [15] W.-M. Chu, Tumor necrosis factors, *Cancer Lett.* 328 (2013) 222–225.
- [16] G.A. Duque, A. Descoteaux, Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases, *Front. Immunol.* 5 (2014) 1–12.
- [17] P.E. Wakefield, W.D. Jarnes, C.P. Samlaska, M.S. Meltzer, Tumor necrosis factors, *J. Am. Acad. Dermatol.* 24 (1991) 675–685.
- [18] C. Guy-Coichard, S. Rostaing-Rigattieri, J.F. Doubrère, F. Boureau, Assessment and management of chronic pain, *EMC - Anesth.* 2 (2005) 1–22.
- [19] C. Monaco, J. Nanchahal, P. Taylor, M. Feldmann, Anti-TNF therapy: Past, present and future, *Int. Immunol.* 27 (2015) 55–62.
- [20] J. Keane, S. Gershon, R.P. Wise, E. Mirabile-Levens, J. Kasznica, W.D. Schwietzman, J.N. Siegel, M.M. Braun, Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor  $\alpha$ -neutralizing agent, *N. Engl. J. Med.* 345 (2001) 1098–1104.
- [21] A. Gurib-Fakim, Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow, *Mol. Aspects Med.* 27 (2006) 1–93.
- [22] S.L. Chen, H. Yu, H.M. Luo, Q. Wu, C.F. Li, A. Steinmetz, Conservation and sustainable use of medicinal plants: Problems, progress, and prospects, *Chin. Med.* 11 (2016) 1–10.
- [23] M. Ghasemian, S. Owlia, M.B. Owlia, Review of anti-Inflammatory herbal medicines, *Adv. Pharmacol. Sci.* 2016



- (2016) 1–11.
- [24] F. Sertürner, Ueber das Morphium, eine neue salzfähige Grundlage, und die Mekonsäure, als Hauptbestandtheile des Opiums, *Ann. Phys.* 25 (1817) 56–90.
- [25] A.G. Atanasov, B. Waltenberger, E.M. Pferschy-Wenzig, T. Linder, C. Wawrosch, P. Uhrin, V. Temml, L. Wang, S. Schwaiger, E.H. Heiss, J.M. Rollinger, D. Schuster, J.M. Breuss, V. Bochkov, M.D. Mihovilovic, B. Kopp, R. Bauer, V.M. Dirsch, H. Stuppner, Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 1582–1614.
- [26] A. Bernhoft, Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals, *Nor. Acad. Sci. Lett.* 50 (2010) 1–255.
- [27] M. Wink, Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites, *Medicines.* 2 (2015) 251–286.
- [28] A. Tissier, J. Ziegler, T. Vogt, Specialized plant metabolites: Diversity and biosynthesis, in: *Ecol. Biochem. Environ. Interspecies Interact.*, 2015: pp. 14–37.
- [29] A. Kessler, A. Kalske, Plant secondary metabolite diversity and species interactions, *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 49 (2018) 115–138.
- [30] K. Vavitsas, M. Fabris, C.E. Vickers, Terpenoid metabolic engineering in photosynthetic microorganisms, *Genes (Basel).* 9 (2018) 1–19.
- [31] C.S. Sell, A fragrant introduction to terpenoid chemistry, 2003.
- [32] L.D. Maldonado-Bonilla, M. Betancourt-Jiménez, E. Lozoya-Gloria, Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves, *Eur. J. Plant Pathol.* 121 (2008) 439–449.
- [33] D. Tholl, Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 148 (2015) 63–106.
- [34] R. Rehman, M.A. Hanif, Z. Mushtaq, A.M. Al-Sadi, Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review, *Food Rev. Int.* 32 (2016) 117–160.
- [35] J. Degenhardt, T.G. Köllner, J. Gershenzon, Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants, *Phytochemistry.* 70 (2009) 1621–1637.
- [36] M.L. Wise, T.J. Savage, E. Katahira, R. Croteau, Monoterpene Synthases from Common Sage ( *Salvia officinalis* ), *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14891–14899.
- [37] F. Chen, D. Tholl, J. Bohlmann, E. Pichersky, The family of terpene synthases in plants: A mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom, *Plant J.* 66 (2011) 212–229.
- [38] G.W. Turner, R. Croteau, Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase, *Plant Physiol.* 136 (2004) 4215–4227.
- [39] N.F. Salakhutdinov, K.P. Volcho, O.I. Yarovaya, Monoterpenes as a renewable source of biologically active compounds, *Pure Appl. Chem.* 89 (2017) 1105–1117.
- [40] A. Koziol, A. Stryjewska, T. Librowski, K. Sałat, M. Gawel, A. Moniczewski, S. Lochyński, An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes, *Mini-Reviews Med. Chem.* 14 (2014) 1156–1168.
- [41] A.G. Guimarães, J.S.S. Quintans, L.J. Quintans-Júnior, Monoterpenes with analgesic activity - A systematic review, *Phyther. Res.* 27 (2013) 1–15.
- [42] R. De Cássia Da Silveira E Sá, L.N. Andrade, D.P. De Sousa, A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes, *Molecules.* 18 (2013) 1227–1254.
- [43] J.S.S. Quintans, S. Shanmugam, L. Heimfarth, A.A.S. Araújo, J.R.G. d. S. Almeida, L. Picot, L.J. Quintans-Júnior, Monoterpenes modulating cytokines - A review, *Food Chem. Toxicol.* 123 (2019) 233–257.
- [44] N.L.M. Quintão, G.F. da Silva, C.S. Antonialli, L.W. Rocha, V. Chechinel Filho, J.F. Cicció, Chemical composition and evaluation of the antihypernociceptive effect of the essential oil extracted from the leaves of *Ugni myricoides* on inflammatory and neuropathic models of pain in mice, *Planta Med.* 76 (2010) 1411–1418.
- [45] B.H. Ali, G. Blunden, Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*, *Phyther. Res.* 17 (2003) 299–305.
- [46] K.H.C. Baser, Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils., *Curr. Pharm. Des.* 14 (2008) 3106–3120.
- [47] E.S. Fernandes, G.F. Passos, R. Medeiros, F.M. da Cunha, J. Ferreira, M.M. Campos, L.F. Pianowski, J.B. Calixto, Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*, *Eur. J. Pharmacol.* 569 (2007) 228–236.

- [48] G.P.P. Kamatou, A.M. Viljoen, A review of the application and pharmacological properties of  $\alpha$ -bisabolol and  $\alpha$ -bisabolol-rich oils, *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* 87 (2010) 1–7.
- [49] M. Božović, R. Ragno, *Calamintha nepeta* (L.) Savi and its main essential oil constituent pulegone: Biological activities and chemistry, *Molecules*. 22 (2017) 1–50.
- [50] B. Demirci, H. Edip Teml, T. Portakal, H. Kirmizibekmez, F. Demirci, K. Hüsnü Can Baser, Inhibitory effect of *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* essential oil on lipoxygenase, *Turkish J. Biochem.* 36 (2011) 290–295.
- [51] S. Pacifico, S. Galasso, S. Piccolella, N. Kretschmer, S.P. Pan, S. Marciano, R. Bauer, P. Monaco, Seasonal variation in phenolic composition and antioxidant and anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* (L.) Savi, *Food Res. Int.* 69 (2015) 121–132.
- [52] S. Amira, M. Dade, G. Schinella, J.L. Ríos, Anti-inflammatory, anti-oxidant, and apoptotic activities of four plant species used in folk medicine in the Mediterranean basin, *Pak. J. Pharm. Sci.* 25 (2012) 65–72.
- [53] M. Božovic, S. Garzoli, M. Sabatino, F. Pepi, A. Baldissarotto, E. Andreotti, C. Romagnoli, A. Mai, S. Manfredini, R. Ragno, Essential oil extraction, chemical analysis and anti-candida activity of *calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.) ball-new approaches, *Molecules*. 22 (2017) 1–12.
- [54] C. Negro, S. Notarnicola, L. De Bellis, A. Miceli, Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* from Southern Italy (Apulia), *Nat. Prod. Res.* 27 (2013) 331–339.
- [55] D.P. de Sousa, F.F.F. Nóbrega, M.R. V. de Lima, R.N. de Almeida, Pharmacological activity of (R)-(+)-Pulegone, a chemical constituent of essential oils, *Verlag Der Zeitschrift Für Naturforsch.* 66 (2011) 353–359.
- [56] D. Tholl, Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism, *Curr. Opin. Plant Biol.* 9 (2006) 1–8.
- [57] R.M. Smith, Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques, *J. Chromatogr. A.* 1000 (2003) 3–27.
- [58] J. Bruneton, Huiles essentielles, in: *Pharmacogn. Phytochim. Plantes Médicinales*, 2009: pp. 565–691.
- [59] P. Tongnuanchan, S. Benjakul, Essential oils: Extraction, bioactivities, and their uses for food preservation, *J. Food Sci.* 79 (2014) R1231–R1249.
- [60] T. Fornari, G. Vicente, E. Vázquez, M.R. García-Risco, G. Reglero, Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction, *J. Chromatogr. A.* 1250 (2012) 34–48.
- [61] J. Azmir, I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman, K.M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, A. Jahurul, K. Ghafoor, N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *J. Food Eng.* 117 (2013) 426–436.
- [62] R. Waseem, K.H. Low, Advanced analytical techniques for the extraction and characterization of plant-derived essential oils by gas chromatography with mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 483–501.
- [63] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, J. Hernández-Méndez, Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples, *J. Chromatogr. A.* 1089 (2005) 1–17.
- [64] C. Yang, J. Wang, D. Li, Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review, *Anal. Chim. Acta.* 799 (2013) 8–22.
- [65] C. Bicchi, D. Joulain, Review headspace-gas chromatographic analysis of medicinal and aromatic plants and flowers, *Flavour Fragr. J.* 5 (1990) 131–145.
- [66] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148.
- [67] F. Belliardo, C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, B. Sgorbini, Headspace-solid-phase microextraction in the analysis of the volatile fraction of aromatic and medicinal plants, *J. Chromatogr. Sci.* 44 (2006) 416–429.
- [68] H.H. Jeleń, A. Gracka, Analysis of black pepper volatiles by solid phase microextraction-gas chromatography: A comparison of terpenes profiles with hydrodistillation, *J. Chromatogr. A.* 1418 (2015) 200–209.
- [69] B. Huang, Y. Lei, Y. Tang, J. Zhang, L. Qin, J. Liu, Comparison of HS-SPME with hydrodistillation and SFE for the analysis of the volatile compounds of Zisu and Baisu, two varietal species of *Perilla frutescens* of Chinese origin, *Food Chem.* 125 (2011) 268–275.
- [70] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737–747.
- [71] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2642–2666.
- [72] C. Barba, T. Thomas-Danguin, E. Guichard, Comparison of stir bar sorptive extraction in the liquid and vapour

- phases, solvent-assisted flavour evaporation and headspace solid-phase microextraction for the (non)-targeted analysis of volatiles in fruit juice, *LWT - Food Sci. Technol.* 85 (2017) 334–344.
- [73] C. Rodrigues, F.C.M. Portugal, J.M.F. Nogueira, Static headspace analysis using polyurethane phases – Application to roasted coffee volatiles characterization, *Talanta*. 89 (2012) 521–525.
- [74] S. Perderson-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-liquid-liquide microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis., *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650–2656.
- [75] X. Jiang, C. Basheer, J. Zhang, K.L. Hian, Dynamic hollow fiber-supported headspace liquid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A*. 1087 (2005) 289–294.
- [76] M.R.A. Mogaddam, A. Pazhohan, F. Khodadadeian, A. Mohebbi, M.A. Farajzadeh, Headspace mode of liquid phase microextraction: A review, *TrAC Trends Anal. Chem.* 110 (2019) 8–14.
- [77] H. Liu, P.K. Dasgupta, Analytical chemistry in a drop. solvent extraction in a microdrop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1817–1821.
- [78] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent microextraction into a single drop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236–2240.
- [79] A.L. Theis, A.J. Waldack, S.M. Hansen, M.A. Jeannot, Headspace solvent microextraction, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5651–5654.
- [80] M. Moradi, M. Kaykhai, A.R. Ghiasvand, S. Shadabi, A. Salehinia, Comparison of headspace solid-phase microextraction, headspace single-drop microextraction and hydrodistillation for chemical screening of volatiles in *Myrtus Communis* L, *Phytochem. Anal.* 23 (2011) 379–386.
- [81] J.F. Liu, G. Bin Jiang, Y.G. Chi, Y.Q. Cai, Q.X. Zhou, J.T. Hu, Use of ionic liquids for liquid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5870–5876.
- [82] Ł. Marcinkowski, F. Pena-Pereira, A. Kloskowski, J. Namieśnik, Opportunities and shortcomings of ionic liquids in single-drop microextraction, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 72 (2015) 153–168.
- [83] M.H. Zainal-Abidin, M. Hayyan, A. Hayyan, N.S. Jayakumar, New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review, *Anal. Chim. Acta.* 979 (2017) 1–23.
- [84] A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, H.L. Munro, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah, Preparation of novel, moisture-stable, lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains, *Chem. Commun.* 1 (2001) 2010–2011.
- [85] A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah, Novel solvent properties of choline chloride urea mixtures, *Chem. Commun.* (2003) 70–71.
- [86] M. Francisco, A. Van Den Bruinhorst, M.C. Kroon, Low-Transition-Temperature Mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents, *Angew. Minireviews.* 52 (2013) 3074–3085.
- [87] Y. Liu, J.B. Friesen, J.B. McAlpine, D.C. Lankin, S.N. Chen, G.F. Pauli, Natural deep eutectic solvents: Properties, applications, and perspectives, *J. Nat. Prod.* 81 (2018) 679–690.
- [88] Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, J. François, Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 7108–7146.
- [89] Y.H. Choi, J. van Spronsen, Y. Dai, M. Verberne, F. Hollmann, I.W.C.E. Arends, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?, *Plant Physiol.* 156 (2011) 1701–1705.
- [90] M.A.R. Martins, E.A. Crespo, P.V.A. Pontes, L.P. Silva, M. Bülow, G.J. Maximo, E.A.C. Batista, C. Held, S.P. Pinho, J.A.P. Coutinho, Tunable hydrophobic eutectic solvents based on terpenes and monocarboxylic acids, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6 (2018) 8836–8846.
- [91] S. Şahin, Tailor-designed deep eutectic liquids as a sustainable extraction media: An alternative to ionic liquids, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 174 (2019) 324–329.
- [92] A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, M. Martins, R.L. Reis, A.R.C. Duarte, Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2 (2014) 1063–1071.
- [93] B. Tang, K.H. Row, Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences, *Monatshefte Fur Chemie.* 144 (2013) 1427–1454.
- [94] T. Tan, M. Zhang, Y. Wan, H. Qiu, Utilization of deep eutectic solvents as novel mobile phase additives for improving the separation of bioactive quaternary alkaloids, *Talanta*. 149 (2016) 85–90.
- [95] M. Espino, M. de los Ángeles Fernández, F.J. V Gomez, M.F. Silva, Natural designer solvents for greening analytical chemistry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 76 (2016) 126–136.
- [96] J. Chen, M. Liu, Q. Wang, H. Du, L. Zhang, Deep eutectic Solvent-Based Microwave-Assisted method for extraction of hydrophilic and hydrophobic components from radix salviae multiorrhizae, *Molecules.* 21 (2016) 1–13.

- [97] A. García, E. Rodríguez-Juan, G. Rodríguez-Gutiérrez, J.J. Ríos, J. Fernández-Bolaños, Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs), *Food Chem.* 197 (2016) 554–561.
- [98] E. Su, M. Yang, J. Cao, C. Lu, J. Wang, F. Cao, Deep eutectic solvents as green media for efficient extraction of terpene trilactones from Ginkgo biloba leaves, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 40 (2017) 1–7.
- [99] J. Cao, L. Chen, M. Li, F. Cao, L. Zhao, E. Su, Two-phase systems developed with hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents for simultaneously extracting various bioactive compounds with different polarities, *Green Chem.* 20 (2018) 1879–1886.
- [100] K.M. Jeong, Y. Jin, D.E. Yoo, S.Y. Han, E.M. Kim, J. Lee, One-step sample preparation for convenient examination of volatile monoterpenes and phenolic compounds in peppermint leaves using deep eutectic solvents, *Food Chem.* 251 (2018) 69–76.
- [101] B. Tang, W. Bi, H. Zhang, K. Ho Row, Deep Eutectic Solvent-Based HS-SME coupled with GC for the analysis of bioactive terpenoids in Chamaecyparis obtusa leaves, *Chromatographia.* 77 (2014) 373–377.



---

## CHAPITRE II

### DEMARCHE EXPERIMENTALE

---



## CHAPITRE II – DEMARCHE EXPERIMENTALE

### II.1. L'EXTRACTION DES TERPENES VOLATILS

Lors du développement d'une démarche analytique, le choix de l'étape d'extraction est crucial. Le choix de la méthode d'extraction est dépendant de la nature des composés à extraire ainsi que des matrices étudiées. De nombreuses méthodes existent aujourd'hui pour l'extraction des composés volatils. Différentes méthodes ont été optimisées et appliquées à l'extraction des terpènes volatils afin de trouver la plus efficace pour notre étude. Des méthodes dites conventionnelles comme par exemple l'hydrodistillation (HD), l'extraction par liquide pressurisé (PLE, Pressurized Liquid Extraction) et l'extraction dans l'espace de tête (HS, Headspace extraction) ont été comparées à des méthodes plus récentes à savoir la microextraction sur phase solide (SPME, Solid Phase Microextraction), l'extraction par sorption dans l'espace de tête (HSSE, Headspace Sorptive Extraction) et la microextraction liquide sur une goutte dans l'espace de tête couplée aux solvants eutectiques profonds (HS-SDME-DES). Un tableau récapitulatif des paramètres d'extraction des différentes méthodes est présenté en ANNEXE 1.

#### II.1.1. L'HydroDistillation (HD)

L'hydrodistillation est l'une des méthodes les plus anciennes utilisée pour l'extraction d'huile essentielle de plantes. Historiquement, l'hydrodistillation prenait place dans un alambic, aujourd'hui elle est réalisée dans un ballon avec un réfrigérant à eau. Le protocole utilisé a été adapté de celui préconisé par la Pharmacopée Européenne pour l'extraction d'huile essentielle de cannelle (réf 04/2011:0387). Dans un ballon, 20 g d'échantillon sont placés avec 200 mL d'une solution acide hydrochlorique à 0,1 M. Le chauffage du ballon à une température d'environ 100 °C va permettre aux composés d'intérêts de se volatiliser. Ces composés vont ensuite se recondenser dans le réfrigérant à eau dû à la diminution de température et l'huile essentielle pourra être récupérée dans une éprouvette à la sortie du réfrigérant (FIGURE II - 1). Afin d'obtenir le maximum d'extrait, le reflux est maintenu pendant 4 heures. Dans l'éprouvette, des gouttes d'huile essentielle se retrouvent à la surface de l'eau qui a elle aussi subi la distillation. L'huile essentielle est récupérée par extraction liquide-liquide en ajoutant 1 mL d'hexane. L'huile essentielle étant hydrophobe, la phase organique est récupérée. Cette méthode d'extraction permet d'obtenir des huiles essentielles très concentrées en terpènes volatils et plus précisément en monoterpènes. Cependant, c'est une méthode fastidieuse utilisant une grande quantité de matière première pour n'obtenir seulement quelques gouttes d'huile essentielles.



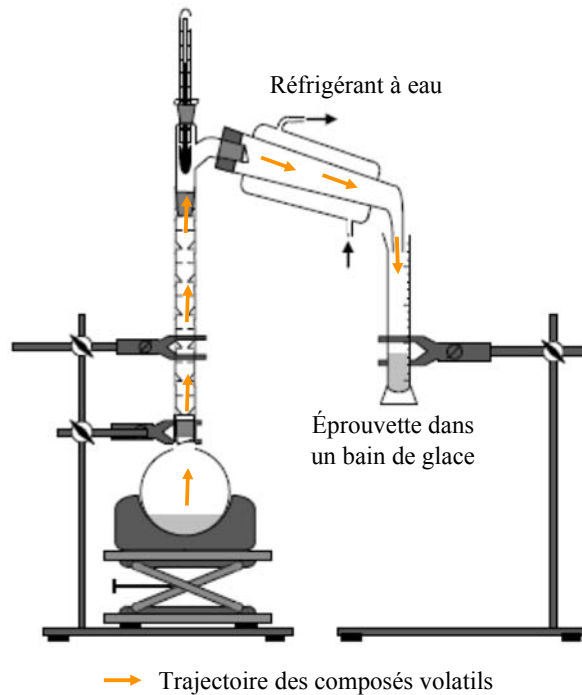


FIGURE II - 1 - Principe et montage de l'extraction par hydrodistillation

### II.1.2. L'Extraction par liquide pressurisé (PLE)

L'extraction par liquide pressurisé (PLE) est une technique d'extraction solide-liquide sous pression à haute température, souvent au-dessus du point d'ébullition du solvant utilisé. Réaliser l'extraction sous pression permet de diminuer considérablement le temps d'extraction ainsi que le volume de solvant utilisé. La PLE a été réalisée sur un système appelé extraction par solvant accélérée (ASE, Accelerated Solvent Extraction) commercialisé par la société Dionex. Le principe de fonctionnement de l'ASE est schématisé sur la FIGURE II - 2. L'échantillon, souvent mélangé à un agent dispersif (ici le sable de Fontainebleau préalablement calciné pendant 4h à 600 °C), est placé dans une cellule en inox de 10 mL (16 x 51 mm). Le volume de solvant utilisé pour l'extraction dépend du volume de la cellule utilisée. Deux filtres en cellulose sont placés aux extrémités de la cellule et cette dernière est installée automatiquement dans le four de l'ASE. Le solvant choisi est ensuite délivré dans la cellule par une pompe, puis une arrivée d'azote permet de maintenir la cellule sous pression et le four est chauffé. Une fois les conditions de consignes atteintes, une phase d'extraction statique commence et est maintenue pendant un temps donné. A la fin de celle-ci, une partie du contenu de la cellule est pompé à travers la cellule et est récupéré dans un flacon. Il est possible de réaliser un second cycle : du solvant neuf est de nouveau pompé dans la cellule qui est remise sous pression, une deuxième phase d'extraction statique a lieu, puis le solvant de la cellule est récupéré dans le même flacon que le premier cycle. Et ainsi de suite. Lorsque les cycles programmés sont terminés, la totalité du solvant est éjectée de la cellule par une purge d'azote.

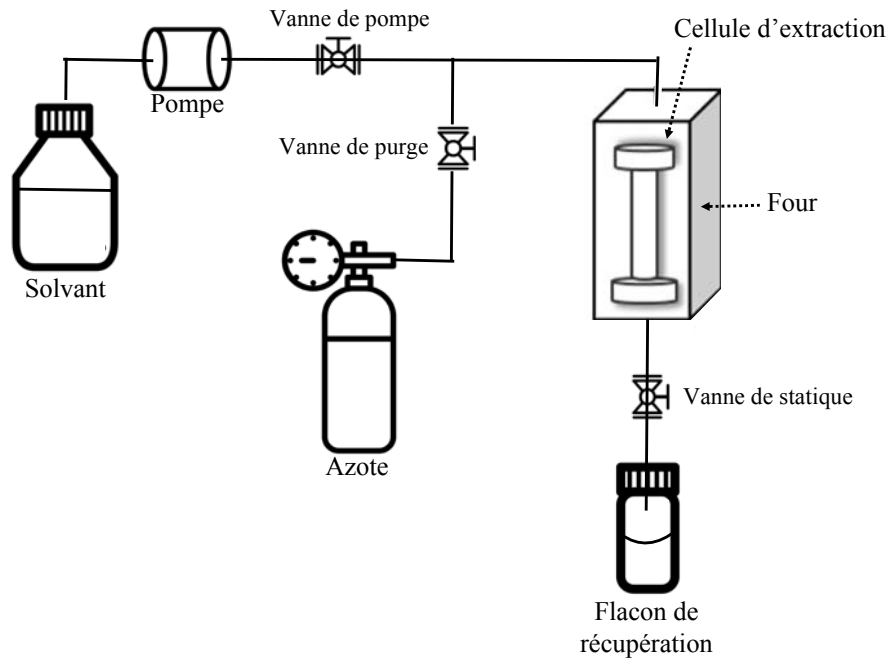


FIGURE II - 2 - Schéma de fonctionnement du système d'extraction par liquide pressurisé (PLE)

Les différents paramètres ajustables sur ce système sont : la température, la durée d'un cycle statique, le nombre de cycles statiques ainsi que la nature du solvant d'extraction. La valeur de la pression est automatiquement réglée et peut varier suivant la nature du solvant (dépendant de sa viscosité) ainsi que la température utilisée.

Après optimisation, un mélange eau/éthanol 50/50 est choisi pour une extraction d'une durée de 7 min à 125 °C sur 3 g d'échantillon. L'extraction est réalisée sur un seul cycle statique avec une pression fixée d'environ 100 bar.

Cette méthode d'extraction est rapide grâce à la possibilité de travailler sous pression et à température élevée. Cependant, la PLE n'est pas sélective des composés volatils. En effet, des composés non volatils présents dans les plantes et solubles dans le solvant utilisé pourront être extraits.

### II.1.3. L'extraction dans l'espace de tête (HS)

Comparée aux deux méthodes décrites précédemment, l'extraction dans l'espace de tête (HS) permet d'être sélectif envers les composés volatils. En effet, comme l'indique son nom, le principe de cette méthode est d'extraire et d'analyser les composés présents dans l'espace de tête au-dessus d'un échantillon solide ou liquide. Pour ce faire, l'échantillon, placé dans un flacon fermé de façon étanche, est chauffé pendant un certain temps, permettant le transfert des molécules volatiles de l'échantillon vers la phase gazeuse. L'espace de tête est ensuite prélevé à l'aide d'une microseringue et injecté directement dans la GC-MS (FIGURE II - 3). La microseringue est maintenue à une température suffisamment élevée à l'aide d'un four pour que les composés extraits restent sous leur forme volatile.

Cette technique d'extraction est souvent automatisée et couplée directement à une GC. Dans notre cas, l'extraction HS est réalisée directement sur l'échantillon sous sa forme solide.

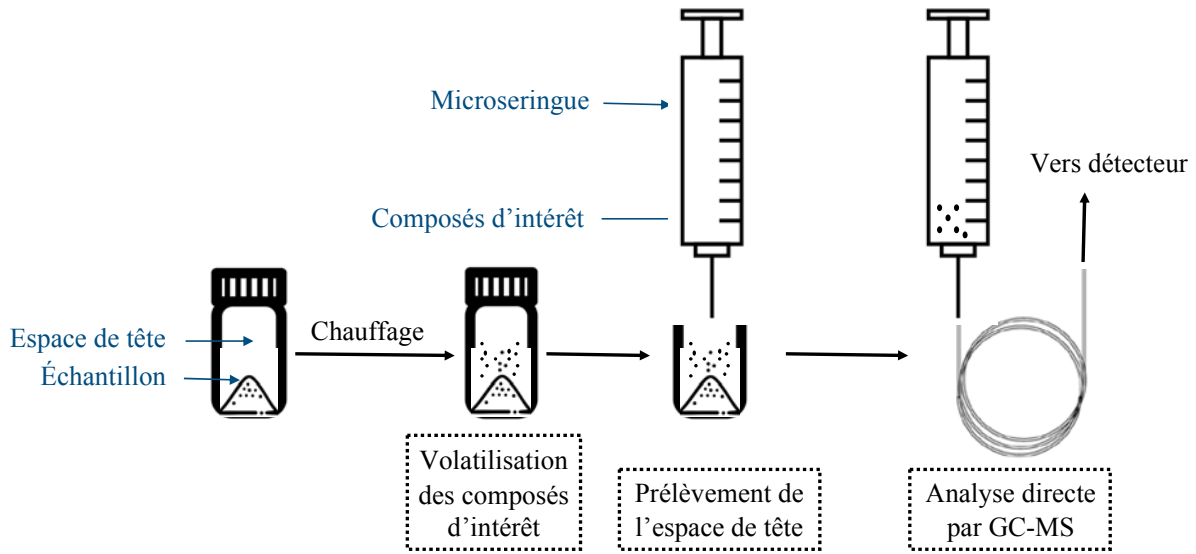


FIGURE II - 3 - Principe de l'extraction dans l'espace de tête (HS)

La distribution des composés volatils dans l'espace de tête dépend de leurs coefficients de partage ( $K$ ) entre l'échantillon et la phase gazeuse.  $K$  représente le ratio entre la concentration de l'analyte dans l'échantillon ( $C_E$ ) et celle dans l'espace de tête ( $C_G$ ) [1] :

$$\text{Echantillon (E)} \xleftrightarrow{K} \text{Espace de tête (G)} \text{ avec } K = C_E / C_G \quad (\text{ÉQUATION II - 1})$$

La valeur de la constante  $K$  est propre à chaque composé et à leur température d'ébullition. Les composés avec une constante  $K$  relativement basse auront plus facilement tendance à se distribuer dans l'espace de tête, ce qui se traduira par des limites de détection plus basses d'un point de vue analytique que des composés avec des constantes  $K$  plus élevées. La distribution d'un composé entre l'échantillon et l'espace de tête peut être modifiée en augmentant la température d'extraction, ce qui se traduira par une diminution de  $K$ . D'après l'ÉQUATION II - 1, la concentration de composés volatils dans l'espace de tête est inversement proportionnelle à la constante  $K$ , ainsi plus la constante  $K$  est faible plus la concentration en analyte dans l'espace de tête sera élevée. D'autres paramètres peuvent influencer l'efficacité d'extraction à savoir le temps d'extraction et l'agitation de l'échantillon qui peuvent faciliter le passage des analytes dans l'espace de tête.

Dans notre étude, pour réaliser l'extraction par HS, 20 mg d'échantillon sont introduits dans un flacon HS de 20 mL fermé de façon hermétique. Le flacon est ensuite placé automatiquement dans un incubateur à 125 °C pour un temps de pré-extraction de 30 min sous une agitation de 250 rpm. Ce temps de pré-extraction permet aux molécules d'intérêt de se distribuer dans l'espace de tête. Une fois ce temps écoulé, 1 mL de l'espace de tête est prélevé à l'aide de la microseringue HS du chromatographe et est directement introduit dans l'injecteur de la GC-MS.

L'extraction par HS est rapide, utilise peu de matière première et est écoresponsable car aucun solvant n'est utilisé. Même si cette méthode permet d'extraire des molécules volatiles et de s'affranchir des interférences dues aux composés non volatils, il est nécessaire de prélever un volume de l'espace de tête important (environ 1 mL) afin d'injecter une concentration d'analytes suffisamment élevée pour leur détection en GC-MS.

#### II.1.4. La microextraction sur phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME)

La microextraction sur phase solide (SPME) a été introduite par Pawliszyn et al. en 1990 [2]. Cette méthode repose sur le même équilibre échantillon/gaz de l'extraction HS présenté précédemment mais à la place de prélever l'espace de tête, les molécules présentes dans la phase gazeuse vont s'absorber dans une fibre polymérique. L'extraction par SPME n'est pas exhaustive, un équilibre supplémentaire s'établit entre l'échantillon et la phase stationnaire. Comme précédemment, l'échantillon déposé dans un flacon va être chauffé afin de distribuer les molécules volatiles dans l'espace de tête pendant un certain temps appelé temps d'équilibrage. Puis la fibre est soit introduite directement dans l'échantillon si il s'agit d'un liquide ou soit exposée à l'espace de tête pour les échantillons liquides ou solides pendant un temps donné. Le second cas permet de favoriser l'extraction des composés volatils. De plus, réaliser une extraction SPME par immersion de la fibre diminue significativement la durée de vie de celle-ci [3]. Après extraction, la fibre est désorbée directement dans l'injecteur de la GC pendant un certain temps à une température déterminée. Dans notre étude, l'échantillon étant solide et afin de favoriser la sensibilité envers l'extraction des composés volatils, la SPME dans l'espace de tête (HS-SPME) est utilisée (FIGURE II - 4). Cette méthode est souvent automatisée de l'équilibrage à la désorption dans l'injecteur de la GC.

Lors de la HS-SPME, trois équilibres entrent en jeu :



Il y a donc deux coefficients de partage à prendre en compte : celui entre l'échantillon et l'espace de tête ( $K_{EG}$ ) et celui entre l'espace de tête et la fibre ( $K_{EF}$ ) [4] :

$$K_{EG} = C_G/C_E \text{ et } K_{GF} = C_F/C_G \quad (\text{ÉQUATION II - 2})$$

Avec  $C_E$  la concentration en analyte dans l'échantillon,  $C_G$  la concentration en analyte dans l'espace de tête et  $C_F$  la concentration en analyte dans la phase greffée sur fibre.

Une constante de partage globale entre l'échantillon et la fibre ( $K_{EF}$ ) peut être définie par :

$$K_{EF} = K_{GF} * K_{EG} \quad (\text{ÉQUATION II - 3})$$

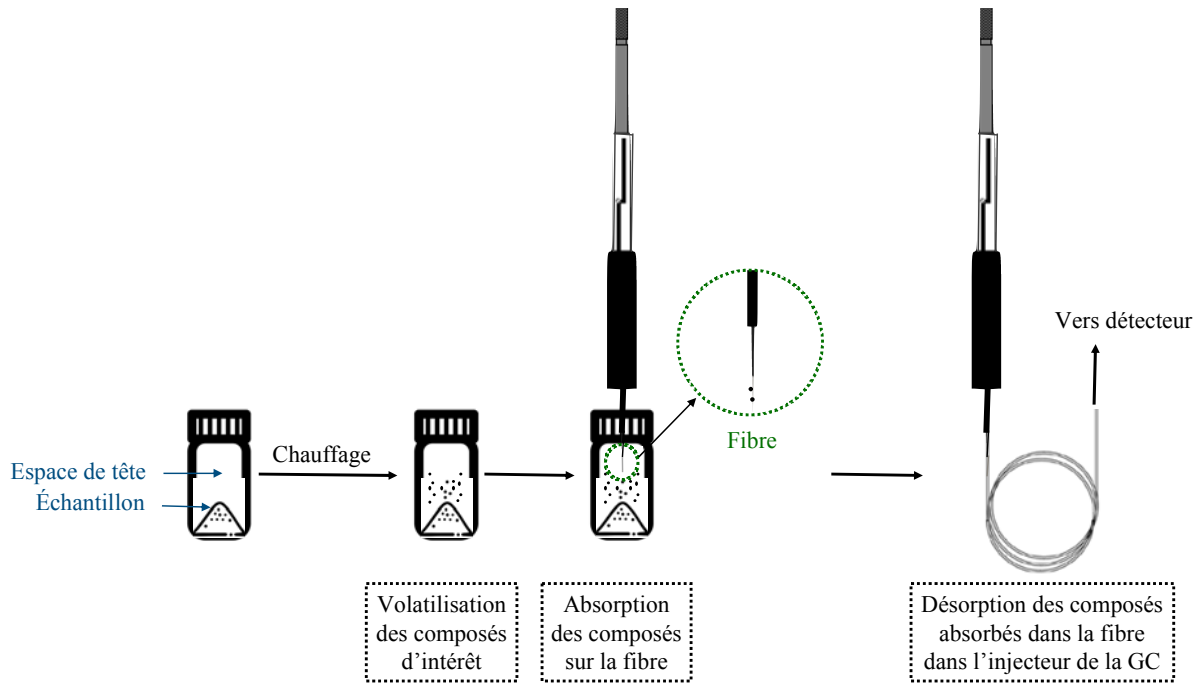


FIGURE II - 4 - Principe de la microextraction sur phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME)

La constante  $K_{EG}$  est définie inversement à la constante  $K$  définie pour l'extraction par HS (II.1.3.) et dépend des mêmes paramètres, c'est-à-dire la température d'extraction et l'agitation de l'échantillon. La valeur de la constante  $K_{GF}$  dépend fortement de la nature du polymère utilisé pour le revêtement de la fibre ainsi que son volume. Adapter la nature du polymère aux analytes d'intérêts est aussi important que le choix de solvants dans l'extraction liquide-liquide. Il existe différentes natures de phases stationnaires en fonction des composés à extraire. La phase la plus couramment utilisée est la PDMS (polydiméthylsiloxane), c'est une phase apolaire utilisée pour extraire toute sorte de composés apolaires de volatils à non-volatils. Le PDMS étant considéré comme un polymère liquide, les composés volatils vont s'absorber dans la fibre. Il existe aussi des phases bipolaires composées de divinylbenzène (PDMS-DVB) ou encore des phases polaires composées de carboxen, un carbone très poreux (CAR-PDMS). Dans le cas d'une fibre composée de carboxen, les composés vont s'adsorber dans les cavités de la fibre. Les deux paramètres permettant d'augmenter le volume de revêtement de la fibre sont son épaisseur ainsi que sa longueur. L'épaisseur du revêtement de la fibre peut varier entre 7 et 100  $\mu\text{m}$ . Les composés volatils requièrent une épaisseur importante de revêtement tandis que les composés non volatils ne nécessitent qu'une fine épaisseur. Cependant, augmenter l'épaisseur du revêtement de la fibre, augmente nécessairement le temps d'extraction car un plus grand nombre d'analytes peuvent pénétrer dans la phase stationnaire [5]. La longueur standard d'une fibre est de 1 cm mais il existe aussi des fibres de 2 cm de long.

L'efficacité de la fibre choisie peut être évaluée en calculant le facteur de concentration (CF) correspondant [6] :

$$CF = A_F/A_G \quad (\text{ÉQUATION II - 4})$$

Avec  $A_F$  l'aire du pic de l'analyte obtenu par HS-SPME et  $A_G$  l'aire du même pic obtenue par HS.

Ainsi plus le facteur de concentration est élevé, plus la fibre choisie est adéquate pour le type de composés analysés dans les conditions d'extraction fixées.

La température d'extraction a aussi une forte influence sur l'efficacité de l'extraction par HS-SPME. En effet, une augmentation de la température va permettre d'augmenter la concentration en analytes dans l'espace de tête, la constante de partage  $K_{EG}$  augmente. De plus, l'efficacité d'extraction de composés peu volatils et à haute masse moléculaire augmente avec l'augmentation de la température. Cependant,  $K_{GF}$  étant inversement proportionnel à  $K_{EG}$  (ÉQUATION II - 3), une augmentation de température conduit à une augmentation de  $K_{EG}$  et donc à une diminution de  $K_{GF}$ , les composés à l'équilibre auront donc une affinité plus grande pour la phase gazeuse que pour la fibre. Ce paramètre doit donc être attentivement étudié pour optimiser la HS-SPME.

Les différents paramètres ajustables de la HS-SPME sont : la nature de la fibre, le volume du revêtement de la fibre, la température d'extraction, le temps d'équilibre, le temps d'extraction, la vitesse d'agitation, le temps de désorption ainsi que la température de désorption.

Dans notre étude, une fibre de 1 cm avec un revêtement de 100  $\mu\text{m}$  de PDMS a été utilisée pour l'extraction de terpènes volatils dans différentes matrices par HS-SPME. Pour l'extraction, 70 mg d'échantillon sont pesés dans un flacon HS fermé hermétiquement. Le flacon est ensuite placé automatiquement dans un incubateur à 80 °C pendant un temps d'équilibre de 10 min sous une agitation de 250 rpm. La fibre est ensuite suspendue dans l'espace de tête en perçant le septum du bouchon du flacon. Le temps d'extraction des composés volatils dans la fibre est de 60 min. La fibre est rétractée dans son support, retirée du flacon et désorbée directement dans l'injecteur de la GC à 210 °C pendant 2 min.

L'extraction par HS-SPME est rapide, ne nécessite aucun solvant, consomme peu de matière première et est automatisée. Comparée à l'extraction par HS, cette méthode permet de concentrer les analytes sur une fibre polymérique avant de les analyser et d'être sélective en termes de famille de composés étudiés. La HS-SPME est une méthode d'analyse robuste pour l'analyse de composés volatils, cependant sa capacité de concentration est limitée par sa faible quantité de phase stationnaire (100  $\mu\text{m}$  au maximum).

### II.1.5. L'extraction par sorption dans l'espace de tête (HSSE)

Dans la catégorie des techniques de microextraction par sorption, une autre méthode est de plus en plus utilisée : l'extraction par sorption sur barreau magnétique (SBSE, Stir Bar Sorptive Extraction) introduite par Baltussen et al. en 1999 [7]. Dans la SBSE, la fibre de la SPME est remplacée par un barreau magnétique recouvert d'une phase polymérique, le plus souvent du PDMS, appelé stir bar. Comme la SPME, le barreau peut être immergé directement dans l'échantillon (SBSE) ou suspendu dans son espace de tête, la méthode est alors appelée extraction par sorption dans l'espace de tête (HSSE) (FIGURE II - 5).

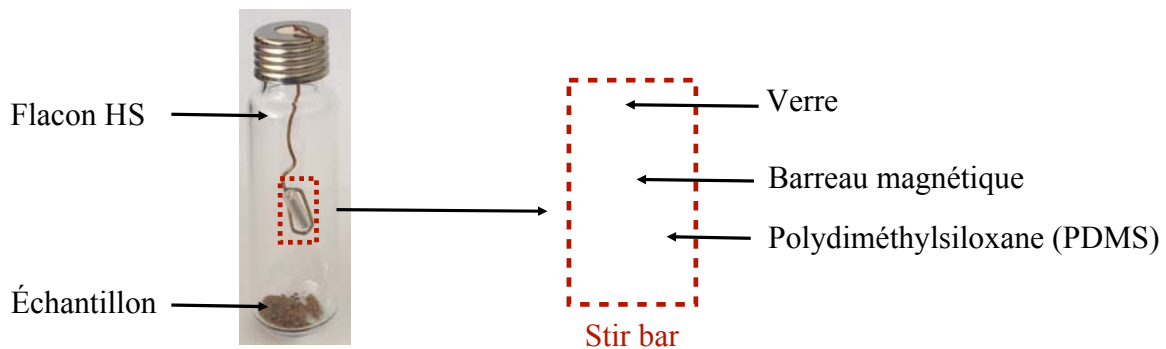


FIGURE II - 5 - Montage de l'extraction par sorption dans l'espace de tête (HSSE)

De la même façon que les méthodes d'extraction dans l'espace de tête présentées précédemment, le flacon contenant l'échantillon ainsi que le barreau suspendu dans son espace de tête est chauffé pendant un certain temps. A la fin de ce temps d'extraction, les composés absorbés sur le barreau sont désorbés thermiquement ou chimiquement. Pour la désorption thermique, le barreau est directement désorbé dans un module couplé à l'injecteur de la GC appelé unité de désorption thermique (TDU, Thermal Desorption Unit). Après désorption, les composés sont concentrés dans l'injecteur par cryogénie puis injecté dans la GC. Pour la désorption chimique, le barreau est placé dans un minimum de solvant et soumis aux ultrasons pendant un temps donné. Le barreau est ensuite retiré du solvant, et l'extrait peut être analysé soit par GC en injection liquide soit par HPLC (FIGURE II - 6). Ne disposant pas de TDU au laboratoire, l'extraction HSSE est couplée à une désorption chimique dans notre étude.

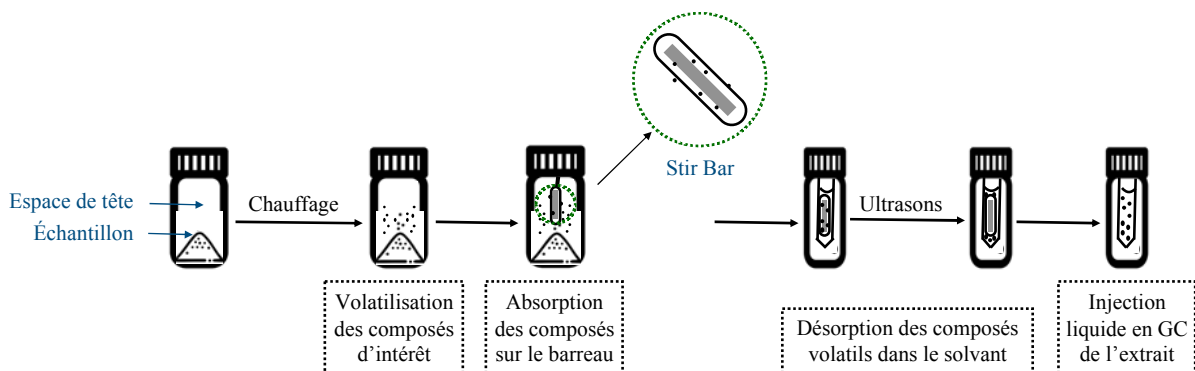


FIGURE II - 6 - Principe de l'extraction par sorption dans l'espace de tête (HSSE)

Comme la SPME, la nature de la phase du barreau ainsi que son volume sont parmi les paramètres les plus importants pour optimiser au mieux l'extraction par HSSE. En effet, les équilibres présentés précédemment (II.1.4.) se retrouvent pour la HSSE. Le système HSSE peut donc être caractérisé par les mêmes équations et donc par les mêmes principes. Ainsi la constante de partage entre l'espace de tête et le barreau est fortement dépendante des caractéristiques de ce dernier. La grande majorité des barreaux commercialisés aujourd'hui sont recouverts de polydiméthylsiloxane (PDMS). Cette phase apolaire permet d'extraire en grande majorité des composés apolaires et est très peu sensible envers les composés polaires. Cependant certains auteurs ont essayé de développer de nouvelles phases pour étendre le domaine d'application des barreaux comme par exemple des phases biphasiques PDMS/carbone [8] ou encore des phases composées de nanoparticules [9]. Le volume de PDMS sur les barreaux commercialisés varie suivant la longueur du barreau ainsi que l'épaisseur du revêtement de PDMS. Deux longueurs de barreaux sont disponibles, 1 et 2 cm, ainsi que deux épaisseurs de film PDMS, 0,5 et 1 cm. Le volume moyen de PDMS sur une fibre est d'environ 0,5  $\mu\text{L}$  tandis que pour un barreau ce volume est 10 fois plus important (environ 50  $\mu\text{L}$ ) [10]. Ce volume élevé de PDMS permet d'augmenter considérablement la capacité de concentration de la méthode, cependant le temps d'extraction est aussi nécessairement augmenté.

Les différents paramètres ajustables de la HSSE sont : la nature du barreau, le volume du revêtement du barreau, la température d'extraction, le temps d'extraction, le solvant de désorption ainsi que le temps de désorption. De manière similaire à la SPME, une augmentation de la température augmente le coefficient de partage entre l'échantillon et l'espace de tête mais diminue le coefficient de partage entre l'espace de tête et le barreau. Ce paramètre doit donc être attentivement étudié pour optimiser la méthode d'extraction.

Dans notre étude, un barreau magnétique de 1 cm recouvert d'un film de 1 mm d'épaisseur de PDMS a été utilisé pour réaliser les extractions par HSSE. Ce barreau est suspendu dans l'espace de tête d'un flacon contenant 80 mg d'échantillon pendant 90 min dans un incubateur à 80 °C. Après extraction, le barreau est ensuite placé dans un insert de 250  $\mu\text{L}$  dans un flacon de 2 mL afin de minimiser le volume nécessaire de solvant pour recouvrir la totalité du barreau. 100  $\mu\text{L}$  d'éthanol sont ajoutés dans le flacon contenant le barreau et ce dernier est soumis aux ultrasons pendant 30 min. Le barreau est retiré du flacon et l'extrait obtenu par HSSE est injecté dans la GC.

Cette deuxième méthode de microextraction est plus longue que la précédente dû à l'augmentation du volume de phase stationnaire, elle reste néanmoins plutôt rapide, sélective des composés volatils et écoresponsable. Cependant, la limite majeure de la HSSE est son manque de diversité au niveau du revêtement du barreau magnétique ayant pour conséquence l'extraction exclusive de composés plutôt apolaires.



### II.1.6. La microextraction liquide sur une goutte dans l'espace de tête couplée aux solvants eutectiques profonds (DES-HS-SDME)

Il existe deux grandes catégories de microextraction : celles à base d'absorbants et celles à base de solvants [11]. Les deux premières méthodes présentées, la HS-SPME ainsi que la HSSE, font parties de la première catégorie de techniques de microextraction. La microextraction liquide sur une goutte (SDME), introduite par Jeannot et al. en 1996 [12], fait partie de la deuxième catégorie. Cette méthode d'extraction reste très proche des deux précédentes. Pour la SDME, la fibre de la SPME et le barreau magnétique de la HSSE sont remplacés par une micro-goutte d'un solvant d'extraction. Cette micro-goutte est suspendue à la pointe de l'aiguille d'une microseringue et est soit plongée directement dans l'échantillon, soit maintenue dans l'espace de tête de l'échantillon (HS-SDME). La HS-SDME a de nombreux avantages comparé à son équivalent en immersion : elle est sélective des composés volatils mais permet aussi une meilleure stabilité de la goutte de solvant. Après extraction, la goutte est rétractée dans la microseringue pour ensuite être directement injectée en GC. Elle peut aussi être diluée avant injection (FIGURE II - 7).

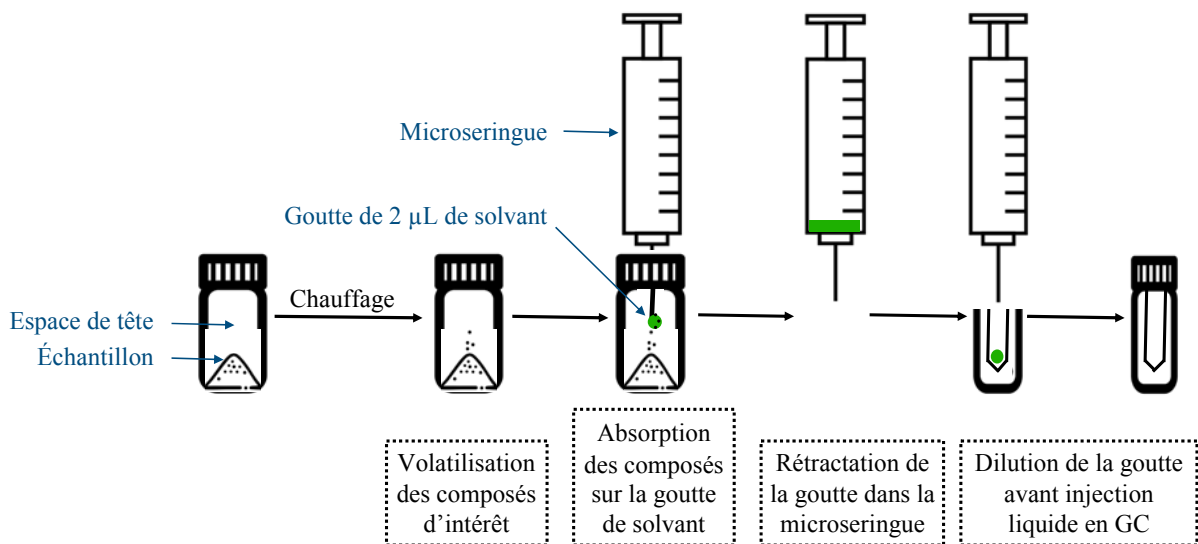


FIGURE II - 7 - Principe de la microextraction liquide sur une goutte dans l'espace de tête (HS-SDME)

La HS-SDME est régie par les deux équilibres décrits précédemment : un équilibre entre l'échantillon et l'espace de tête et un deuxième entre l'espace de tête et la micro-goutte. La constante de partage entre l'espace de tête et la micro-goutte de solvant est fortement dépendante de la nature du solvant utilisé. Le choix de ce solvant est déterminé par le type de molécules à extraire mais aussi par différents critères imposés par la méthode d'extraction. En effet, afin de maximiser la stabilité de la micro-goutte, le solvant doit avoir une faible volatilité, une faible pression de vapeur, être stable thermiquement et être suffisamment visqueux. Les solvants les plus couramment utilisés pour la HS-SDME sont des solvants organiques comme par exemple le toluène, l'hexane, l'isooctane, le n-octanol...

Cependant ces solvants sont toxiques pour l'environnement et ont souvent une volatilité à basse température non négligeable pouvant entraîner l'évaporation de la micro-goutte. Les solvants eutectiques profonds (DESS) peuvent alors être utilisés comme une alternative à ces solvants pour la HS-SDME. En effet, les DESS, solvants émergents composés de deux ou trois produits, sont facilement modulables pour répondre aux différents critères de la HS-SDME. Les propriétés physico-chimiques des DESS sont déterminées par celles de chacun des produits qui le compose. Par exemple, pour obtenir un DES hydrophobe, il suffit d'associer deux produits hydrophobes. Avec un nombre illimité de combinaisons possible pour former un DES, l'utilisation de ce solvant permet d'augmenter significativement la portée de l'extraction par HS-SDME. Mise à part la nature du solvant, d'autres paramètres sont à prendre en compte pour l'optimisation de la HS-SDME, à savoir la température d'extraction, le temps d'extraction, la taille de la micro-goutte ainsi que l'agitation de l'échantillon. Comme pour les précédentes méthodes d'extraction dans l'espace de tête, une augmentation de la température va augmenter la diffusion des composés volatils dans l'espace de tête mais va conduire à une diminution du coefficient de partage entre l'espace de tête et la micro-goutte, augmentant ainsi la concentration en analyte dans l'espace de tête et non dans la micro-goutte [13].

Dans notre étude, le DES utilisé pour la HS-SDME était un mélange eutectique de bromure de tétrabutylammonium ( $N_{4444}Br$ ) et de dodécanol au ratio molaire 1:2. Une micro-goutte de 1,5  $\mu L$  de  $N_{4444}Br$ -dodécanol est suspendue à la pointe de l'aiguille d'une microseringue dans l'espace de tête d'un flacon contenant 50 mg d'échantillon pendant 90 min dans un incubateur à 80 °C. La micro-goutte est ensuite rétractée dans la microseringue, retirée du flacon et est diluée dans un faible volume d'éthanol (dilution d'environ 100) avant injection en GC. La dilution est nécessaire afin d'injecter une faible quantité de solvant eutectique (DES) qui ne sera pas volatilisé dans l'injecteur.

Cette méthode d'extraction présente des avantages supplémentaires aux méthodes décrites précédemment. La micro-goutte étant renouvelée à chaque extraction il n'y a pas de risque de transfert d'impuretés d'extraction précédente contrairement à la fibre en SPME et au barreau magnétique en HSSE (contaminations croisées). De plus, du au grand éventail de solvants disponibles, la HS-SDME peut être appliquée à un grand nombre de molécules. Le couplage de la HS-SDME aux DESS permet de rendre cette méthode d'extraction plus écoresponsable grâce à la non toxicité des DESS. Cette méthode est aussi peu chère, facile à mettre en place, rapide et permet de concentrer les composés d'intérêt dans un micro volume de solvant. De plus, la HS-SDME peut facilement être automatisée [14].

## II.2. LES PLANS D'EXPERIENCES POUR L'OPTIMISATION DES METHODES D'EXTRACTION

L'étape de préparation d'échantillon est inévitable en chimie analytique et ne doit pas être négligée. Cette étape commence tout d'abord par le choix d'une méthode d'extraction adaptée aux échantillons étudiés ainsi qu'aux molécules d'intérêt (II.1). Puis les différents paramètres de la méthode d'extraction choisis doivent être optimisés afin de développer une méthode robuste et reproductible. Dans notre étude, au lieu d'optimiser les méthodes d'extraction en faisant varier un facteur à la fois, les plans d'expériences ont été utilisés. Cette approche statistique de plus en plus utilisée en chimie analytique permet de quantifier l'effet d'un facteur sur l'efficacité d'extraction de la technique utilisée en un minimum d'expériences et de déterminer les interactions entre les facteurs étudiés. Par exemple, il est courant qu'une augmentation de température permet d'accélérer le processus d'extraction et donc diminuer le temps d'extraction nécessaire pour obtenir le même rendement d'extraction à température plus basse. L'utilisation des plans d'expériences permet d'étudier ces phénomènes et de mieux comprendre la méthode d'extraction mise en place.

La mise en place d'une optimisation par plan d'expériences nécessite la définition très précise de plusieurs paramètres :

- La réponse permettant au mieux de décrire l'extraction : un rendement, l'aire d'un pic, le nombre total de pics... ?
- L'objectif de l'étude : maximiser ou minimiser la réponse définie ?
- Les facteurs pouvant avoir une influence sur la réponse : la température, le temps, l'agitation...
- Les niveaux des paramètres, c'est-à-dire dans quel intervalle ils sont étudiés

Les facteurs étudiés ainsi que leurs niveaux peuvent être choisis en fonction de la littérature ou de résultats préliminaires. Une fois tous ces paramètres bien définis, un plan d'expériences correspondant aux besoins et aux limites de l'étude peut être sélectionné. Dans notre étude, deux plans successifs ont été réalisés pour les méthodes de microextraction décrites précédemment (II.1) : un plan factoriel complet à deux niveaux suivi d'un plan composite centré.

### II.2.1. Plan factoriel complet à deux niveaux

Le plan factoriel complet à deux niveaux est utilisé dans notre étude comme un plan de criblage permettant de déterminer rapidement quels facteurs ont une influence significative sur la ou les réponses. Si  $k$  facteurs à deux niveaux sont étudiés, le plan factoriel complet se composera de  $2^k$  expériences. Par exemple, le tableau d'expériences nécessaires pour étudier l'influence de deux facteurs ( $x_1$  et  $x_2$ ) à deux niveaux ainsi que son domaine d'étude sont représentés dans la FIGURE II - 8.

Numéro de l'expérience	$x_1$	$x_2$
1	- 1	- 1
2	+ 1	- 1
3	- 1	+ 1
4	+ 1	+ 1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

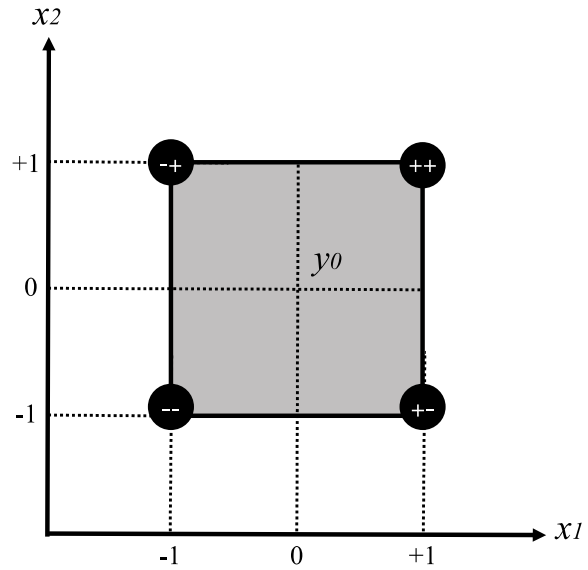


FIGURE II - 8 - Expériences pour un plan factoriel complet  $2^2$

Les niveaux des variables sont codés par  $-1$  pour la borne inférieure et par  $+1$  pour la borne supérieure. Un point central pour lequel la valeur de chaque facteur est fixé au milieu de l'intervalle étudié est inclus dans le plan d'expériences (expériences 5, 6, et 7). De manière générale, trois points centraux sont réalisés afin de déterminer l'erreur expérimentale et l'intervalle de confiance des résultats. Le résultat (ou réponse) d'une expérience est dépendant des conditions expérimentales (ou facteurs) et est décrit par l'équation suivante toujours pour un plan factoriel complet  $2^2$  [15] :

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + \varepsilon \quad (\text{ÉQUATION II - 5})$$

Avec  $y$  la réponse,  $b_i$  le coefficient du facteur  $x_i$ ,  $b_{ij}$  le coefficient d'interaction entre les facteurs  $x_i$  et  $x_j$  et  $\varepsilon$  l'erreur expérimentale. Le coefficient  $b_0$  correspond à la moyenne des réponses, hors points centraux. Si la valeur de  $b_0$  est très différente de la valeur de la réponse au point central, alors le modèle linéaire d'ordre 1 n'est pas adapté pour ajuster les données expérimentales. Le coefficient  $b_1$  (respectivement  $b_2$ ) correspond à l'effet du facteur  $x_1$  (respectivement  $x_2$ ) sur la réponse du niveau zéro au niveau  $+1$ , en fixant  $x_2$  (respectivement  $x_1$ ) au niveau 0. Le coefficient  $b_{12}$  correspond à l'interaction entre  $x_1$  et  $x_2$  c'est-à-dire l'effet de la variation d'un facteur en fonction du niveau d'un autre facteur. Le but des plans d'expériences est de résoudre l'(ÉQUATION II - 5 à partir des réponses obtenues par les 4 expériences réalisées pour ainsi déterminer les valeurs des coefficients  $b_i$  et  $b_{ij}$  afin de déterminer leur influence sur la réponse. En effet, la variation d'un facteur est directement liée à la valeur de son coefficient comme vu précédemment. Ainsi si un coefficient a une valeur positive ou négative élevée, le facteur correspond à un effet important sur la réponse. La matrice suivante relie les 4 réponses obtenues par les expériences de la FIGURE II - 8 aux facteurs étudiés :

$Y = Xa$  soit pour un plan factoriel complet  $2^2$  :

$$\begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ y_3 \\ y_4 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} +1 & -1 & -1 & +1 \\ +1 & +1 & -1 & -1 \\ +1 & -1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & +1 & +1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_{12} \end{bmatrix} \quad (\text{ÉQUATION II - 6})$$

Ainsi, la valeur du coefficient  $b_i$  peut être calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$b_1 = \frac{1}{4}(-y_1 + y_2 - y_3 + y_4) \quad (\text{ÉQUATION II - 7})$$

La significativité de l'influence des différents facteurs peut alors être étudiée en comparant leurs coefficients à l'erreur expérimentale  $\varepsilon$  par analyse de variance (ANOVA). La p-valeur définie comme la probabilité que le coefficient  $b_i$  du facteur  $x_i$  ait la même valeur que l'erreur expérimentale  $\varepsilon$ , cette hypothèse est appelée l'hypothèse nulle, est utilisée pour quantifier la significativité statistique des différents facteurs. Cette p-valeur est calculée à l'aide du test de Fisher. Dans notre étude, une p-valeur  $\leq 0,05$  traduit une forte présomption contre l'hypothèse nulle, c'est-à-dire une significativité importante du coefficient  $b_i$  du facteur  $x_i$  et donc une influence significative de ce facteur  $x_i$  sur la réponse. L'ÉQUATION II - 5 peut être généralisée pour un plan factoriel complet  $2^k$  à k facteurs à deux niveaux en estimant que les interactions d'ordre 3 et supérieur sont très petites voir négligeables :

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (\text{ÉQUATION II - 8})$$

Le modèle mathématique utilisé pour modéliser les réponses des expériences en fonction des facteurs expérimentaux (ÉQUATION II - 8) doit être validé suivant différents paramètres. L'équation précédente est résolue par une méthode de régression basée sur le critère des moindres carrés. La méthode des moindres carrés permet de comparer des données expérimentales à un modèle mathématique censé décrire ces données. Les deux premiers paramètres qui donnent une bonne idée de l'ajustement du modèle sont les valeurs des variations expliquées ( $R^2$ ) et les variations prédites ( $Q^2$ ) par celui-ci. La variation expliquée par le modèle ( $R^2$ ) correspond à une fraction des variations totales de la réponse.  $R^2$  est calculé comme suit :

$$R^2 = (SS - SS_{resid})/SS \quad (\text{ÉQUATION II - 9})$$

avec  $SS = \sum (y_i - \bar{y})^2$  et  $SS_{resid} = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2$

Avec  $y_i$  la réponse  $i$ ,  $\bar{y}$  la moyenne des réponses,  $\hat{y}_i$  la valeur de  $y_i$  prédite par le modèle,  $SS$  (Sum of Squares) la somme totale des carrés de l'écart à la moyenne et  $SS_{resid}$  (Sum of Squares residuals) la somme des carrés de l'erreur résiduelle. Plus la valeur de  $\hat{y}_i$  prédite par le modèle est proche de la valeur de  $y_i$  expérimentale, plus  $SS_{resid}$  sera faible et plus  $R^2$  sera élevé. Ainsi une valeur de  $R^2$  proche de 1 traduit un excellent ajustement du modèle aux données expérimentales.

La variation prédite ( $Q^2$ ) correspond à une fraction des variations totales de la réponse qui peut être prédite par le modèle.  $Q^2$  est calculé comme suit :

$$Q^2 = (SS - PRESS)/SS \text{ avec } PRESS = \sum (y_i - \hat{y}_{i,-i})^2 \quad (\text{ÉQUATION II - 10})$$

Avec  $\hat{y}_{i,-i}$  la valeur de  $y_i$  qui a été retiré de l'ajustement du modèle. Pour déterminer la somme au carré des résidus des erreurs prédites (PRESS), une étude de validation croisée est réalisée. Après avoir identifié un modèle ajusté aux valeurs expérimentales, un nouveau modèle est ajusté en enlevant un certain nombre de réponses. Les réponses omises dans ce nouveau modèle sont ensuite calculées par ce même modèle. Si la valeur des résidus entre les réponses expérimentales et les réponses prédites par le nouveau modèle est faible, alors il est considéré que le modèle permet de prédire correctement les valeurs des réponses, il est donc bien ajusté aux données expérimentales.

Les valeurs de  $R^2$  et de  $Q^2$  sont généralement comprises entre 0 et 1. Pour des modèles de prédictions très mauvais,  $Q^2$  peut même atteindre des valeurs négatives dans le cas où le modèle de prédiction donne des moins bons résultats qu'une estimation sans modèle, c'est-à-dire la réponse moyenne des expériences. De manière générale, il a été observé que  $R^2$  et  $Q^2$  augmentent en fonction du nombre de facteurs ajoutés au modèle. Cependant, contrairement à  $R^2$  qui augmente continuellement,  $Q^2$  diminue quand un nombre de facteurs parasites trop important est ajouté au modèle. Il est possible d'améliorer les valeurs de  $R^2$  et de  $Q^2$  en retirant du modèle un par un les facteurs qui n'ont pas d'influence significative sur la réponse. Dans notre étude, il est considéré que le modèle obtenu est ajusté aux valeurs expérimentales de manière acceptable pour des valeurs  $R^2$  supérieures à 0,8 et des valeurs de  $Q^2$  supérieures à 0,5 [15].

Le troisième paramètre important permettant de valider le modèle est le défaut d'ajustement, ou lack of fit. Le défaut d'ajustement ( $\Delta$ ) représente la différence entre le modèle réel et le modèle mathématique choisi. La différence entre la somme des carrés des résidus ( $SS_{resid}$ ) et la somme des carrés de l'erreur expérimentale ( $\varepsilon$ ) est appelée la somme des carrés du défaut d'ajustement et est décrite par la relation suivante :

$$\sum (\Delta)^2 = \sum (SS_{resid})^2 - \sum (\varepsilon)^2 \quad (\text{ÉQUATION II - 11})$$

L'hypothèse nulle correspondant à une égalité de la somme des carrés des résidus et de la somme des carrés des erreurs expérimentales est testée statistiquement par une loi de Fisher. Le rapport de Fisher mesure alors la probabilité que le défaut d'ajustement et l'erreur expérimentale soit du même ordre de grandeur. Un rapport de Fisher faible correspond à une forte probabilité que ces deux variables soient du même ordre de grandeur. Une faible  $p$ -valeur de validé traduit alors un défaut d'ajustement significatif, les deux variables ne sont pas du même ordre de grandeur.

Dans notre étude, il est considéré que pour une  $p$ -valeur  $\leq 0,05$ , il y a un défaut d'ajustement significatif et donc le modèle choisi n'est pas adapté aux données expérimentales. Le défaut d'ajustement ne peut être évalué que si des expériences ont été réalisées en réplicas.

Pour résumer, les facteurs ont une influence significative sur la réponse si leur  $p$ -valeur est inférieure ou égale à 0,05. L'interaction entre deux facteurs est aussi significative si la  $p$ -valeur de l'interaction est inférieure ou égale à 0,05. Le modèle utilisé pour ajuster les données expérimentales est considéré comme acceptable si  $R^2 \geq 0,8$ ,  $Q^2 \geq 0,5$  et la probabilité du défaut d'ajustement est supérieure à 0,05.

### II.2.2. Plan composite centré

Dans un second temps, afin de déterminer les conditions optimales d'extraction, un plan composite centré est utilisé. Les facteurs pris en compte dans ce plan sont ceux ayant montré un effet significatif sur l'efficacité de l'extraction à la suite du plan factoriel complet (II.2.1.). Un plan composite est constitué de trois parties :

- Un plan factoriel complet à deux niveaux
- Au moins un point central situé au centre du domaine d'étude
- Des points axiaux situés sur les axes de chacun des facteurs

La FIGURE II - 9 représente un plan composite pour deux facteurs ainsi que son tableau d'expériences. Dans notre étude, un plan composite centré a été réalisé, c'est-à-dire que les points axiaux se situent sur les faces du domaine d'étude ( $\alpha = \pm 1$ ).

Numéro de l'expérience	$x_1$	$x_2$
1	- 1	- 1
2	+ 1	- 1
3	- 1	+ 1
4	+ 1	+ 1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	- $\alpha$	0
9	+ $\alpha$	0
10	0	- $\alpha$
11	0	+ $\alpha$

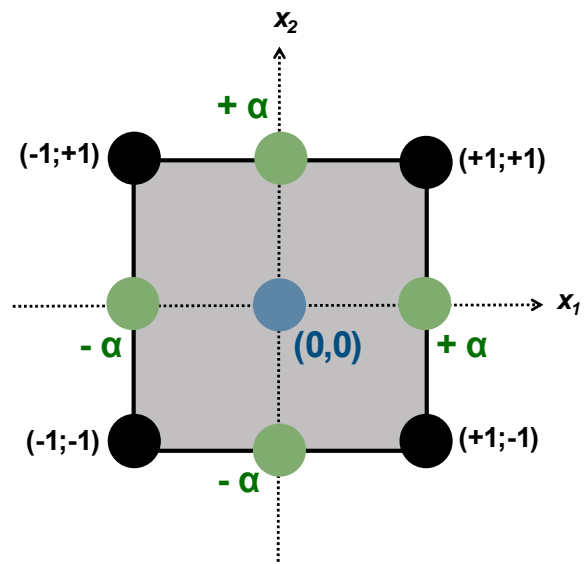


FIGURE II - 9 - Plan composite pour deux facteurs

Un plan composite est un plan de surface de réponse, c'est-à-dire que des termes quadratiques ( $x^2$ ) sont ajoutés au modèle afin de permettre la détermination d'un maximum ou d'un minimum en ajoutant une courbure au modèle. Les plans de surface de réponse sont modélisés par une équation d'ordre 2 :

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (\text{ÉQUATION II - 12})$$

Avec  $\beta_{ii}$  les coefficients des termes quadratiques.

Le modèle défini par l'(ÉQUATION II - 12 est une extension du modèle décrit par l'(ÉQUATION II - 8 en ajoutant des termes quadratiques. Les plans de surface de réponse permettent aussi d'obtenir une bonne représentation graphique entre les réponses et les différents facteurs étudiés. Les surfaces de réponses obtenues permettent alors de déterminer facilement un maximum ou un minimum selon les besoins définis (FIGURE II - 10). Dans le cas où le maximum se situe hors du domaine d'étude, il est préférable de refaire un plan d'expérience en décalant le domaine d'étude s'il n'y a pas de limites d'ordre expérimentale. Un plan composite est réalisable seulement pour des variables continues.

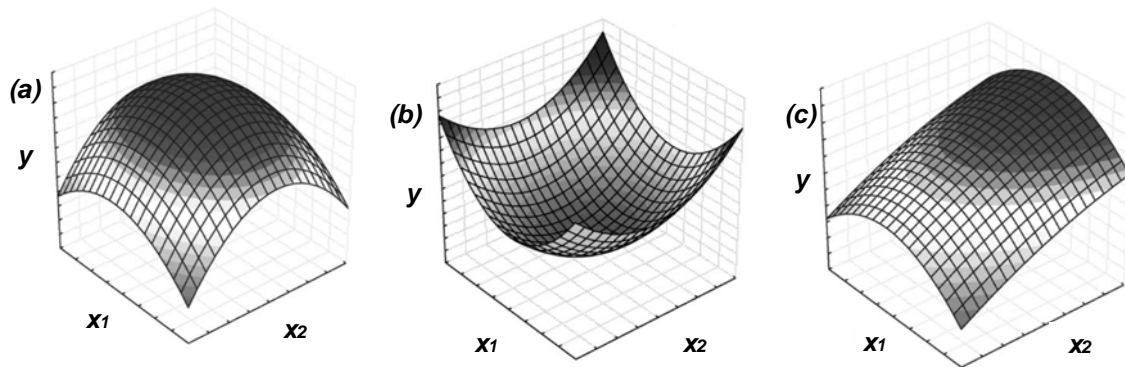


FIGURE II - 10 - Surfaces de réponses pour un modèle quadratique à deux variables. (a) maximum, (b) minimum et (c) maximum hors du domaine d'étude [16]

La validation du modèle mathématique pour un plan composite centré s'effectue de la même manière que pour le plan factoriel complet (II.2.1.).

### II.3. L'ANALYSE DES EXTRAITS TERPENIQUES

#### II.2.1. La méthode d'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS)

Les extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC-MS). Le chromatographe utilisé est un VARIAN 450-GC (Les Ulis, France) équipé d'un passeur d'échantillons Combi PAL (CTC Analytics, Zwingen, Suisse), d'un injecteur split/splitless à température programmable VARIAN 1079 et d'un spectromètre de masse VARIAN 240-MS.



Trois modes d'injections peuvent être réalisés sur ce système grâce au Combi PAL : injection liquide avec une microsiringue de 10  $\mu$ L, injection HS avec une seringue chauffée de 1 mL et injection SPME avec un support pour la fibre. Le Combi PAL est aussi équipé d'un incubateur pouvant chauffer de 30 à 200 °C et agiter de 250 à 750 rpm. L'utilisation du Combi PAL permet d'automatiser les méthodes d'extraction par HS et HS-SPME, de l'extraction à l'injection, permettant ainsi de faciliter l'utilisation de la méthode, d'augmenter le nombre réalisable d'extractions en 24 heures et d'augmenter la répétabilité de l'extraction en s'affranchissant des variabilités dues à l'utilisateur.

Dans notre méthode, la température de l'injecteur est fixée à 210 °C afin de permettre la volatilisation instantanée de l'échantillon pour une injection liquide, de maintenir les molécules sous leur forme volatile pour une injection HS et de désorber les composés présents sur la fibre pour une injection SPME. Les composés sont ensuite entraînés vers la colonne chromatographique par un gaz vecteur inerte, l'hélium, à un débit de 1 mL/min. La séparation des composés s'effectue sur une colonne capillaire DB-WAX (Agilent Technologies, France) de 60 m de long et de 0,25 mm de diamètre interne. La phase stationnaire polaire est en polyéthylène glycol d'épaisseur 0,15  $\mu$ m. La programmation de température du four utilisée est la suivante (FIGURE II - 11) :

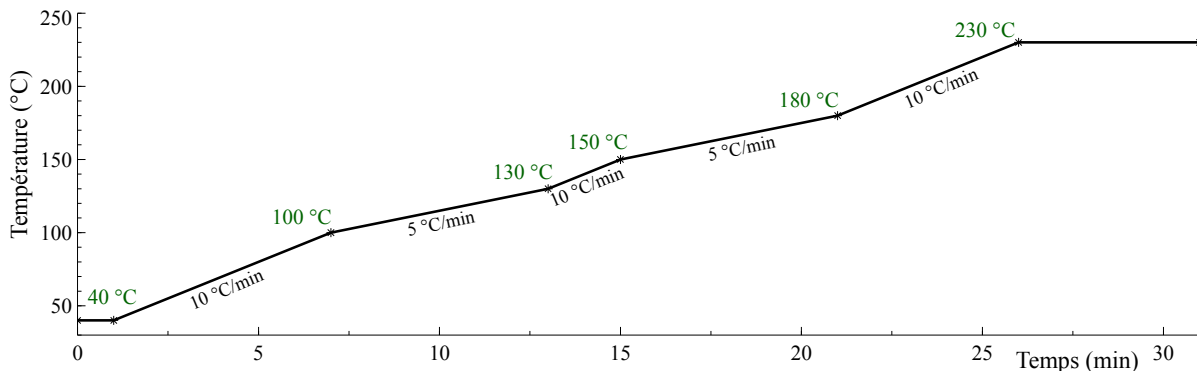


FIGURE II - 11 - Programme de température appliqué au four de la GC

Cette programmation permet la séparation des différents composés volatils des extraits selon leurs points d'ébullition et leurs affinités avec la phase stationnaire. La détection des composés s'effectue ensuite par le spectromètre de masse (MS) équipé d'un piège ionique (ion trap). A la sortie de la colonne, les composés sont ionisés par impact électronique à 70 eV dans la source à 150 °C. La température de la ligne de transfert entre la sortie de la colonne et la source est fixée à 200 °C. Les molécules ionisées sont ensuite guidées vers le piège ionique à 150 °C dans lequel ils sont concentrés puis expulsés et analysés un par un selon leur rapport  $m/z$ . Le piège à ion est utilisé en mode FULL SCAN afin de balayer les  $m/z$  dans une gamme de 50 à 200 amu. Le détecteur utilisé est un multiplicateur d'électrons.

### II.2.2. Identification des composés volatils

Il existe différentes méthodes pour identifier les composés d'un extrait à partir d'un chromatogramme obtenu par GC-MS. La première est l'identification par comparaison des spectres de masse. Chaque pic du chromatogramme correspond à une molécule et à un spectre de masse associé. En comparant le spectre de masse à ceux d'une base de données, celle utilisée ici est la NIST (Version 2.0, 2008), il est possible d'identifier la molécule correspondante selon un facteur de correspondance. Le spectre de masse va être comparé en termes de nombre de pics et d'intensité de pic. Le logiciel propose une molécule correspondant au spectre de masse inconnu avec la valeur du facteur de correspondance associé. Une correspondance parfaite entre le spectre de masse du composé inconnu et celui de la base de données se traduit par un facteur de 999 tandis qu'un spectre avec aucun pic en commun avec celui de la base de données se traduit par un facteur de 0. Dans notre étude, pour l'identification de chaque molécule, il a été considéré qu'un facteur de correspondance :

- Supérieur à 900 traduit une excellente identification
- Compris entre 800-900 traduit une bonne identification
- Compris entre 700-800 traduit une identification acceptable
- Inférieur à 700 traduit une mauvaise identification, les composés ne correspondent pas.

Ainsi seuls les pics correspondants aux spectres de masse avec un facteur de correspondance supérieur à 700 avec le composé proposé par la base de données sont considérés comme identifiés, les autres comme non identifiés. Cependant, cette méthode ne permet pas de confirmer à 100 % l'identification des composés. En effet, un même spectre de masse peut correspondre à plusieurs composés aux structures chimiques proches, il est alors difficile de les différencier et identifier seulement à l'aide de la base de données.

Afin de confirmer cette première identification, les indices de rétention de Kovats de chaque composé identifiés grâce au spectre de masse correspondant sont calculés et comparés à ceux de la littérature. L'indice de rétention de Kovats, introduit par Ervin Kovats dans les années 1950, est propre à la chromatographie en phase gazeuse et permet de convertir les temps de rétention en constantes indépendantes du système, sauf de la polarité de la colonne utilisée. L'indice de Kovats d'un composé est son temps de rétention normalisé par rapport à celui du *n*-alkane élué avant et celui du *n*-alkane élué après. Les indices de Kovats sont déterminés par l'équation suivante pour des programmes de température non isothermes [17] :

$$I_x = 100n + 100 (t_x - t_n)/(t_{n+1} - t_n) \quad (\text{ÉQUATION II - 13})$$

Avec  $I_x$  l'indice de Kovats de l'analyte  $x$ ,  $n$  le nombre de carbone de l'alcane élué juste avant l'analyte  $x$ ,  $t_x$  le temps de rétention de l'analyte  $x$ ,  $t_n$  le temps de rétention de l'alcane élué juste avant l'analyte  $x$  et  $t_{n+1}$  le temps de rétention de l'alcane élué juste après l'analyte  $x$ .

Ainsi il suffit d'injecter un mélange de *n*-alcanes dans les mêmes conditions analytiques que les extraits afin de pouvoir déterminer les indices de Kovats de chaque pic. Après identification des composés à l'aide de leur spectre de masse, leurs indices de Kovats sont alors comparés à ceux de la littérature en utilisant la base de données de l'entreprise Twistaroma. Pour valider l'identification d'un composé, l'écart maximum accepté entre l'indice de Kovats calculé et celui de la littérature pour le même composé est de 20 [18].

Pour la caractérisation de chaque extrait, l'identification de chaque composé a été validée par son spectre de masse et son indice de rétention de Kovats.

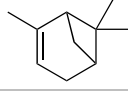
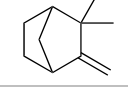
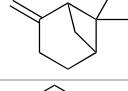
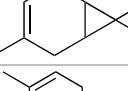
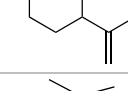
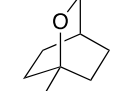
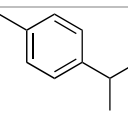
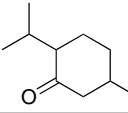
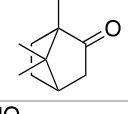
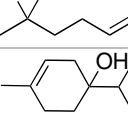
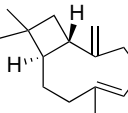
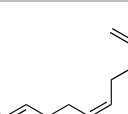
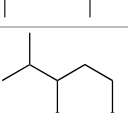
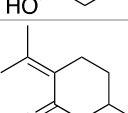
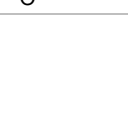
### II.2.3. Quantification des composés volatils

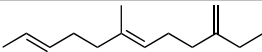
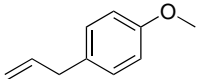
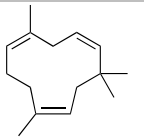
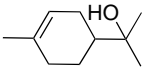
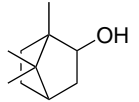
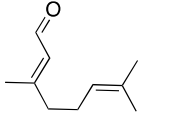
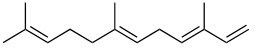
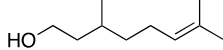
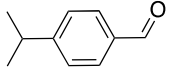
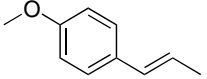
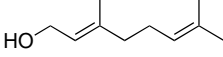
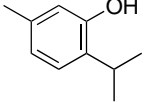
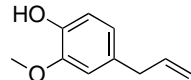
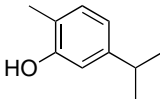
L'une des meilleures méthodes d'identification de composé inconnu reste la comparaison de son temps de rétention et spectre de masse avec ceux de son étalon commercialisé. Cependant, le prix des étalons étant pour la plupart élevé, seulement une trentaine d'étalons ont pu être utilisés pour confirmer l'identification précédente des composés. Ces étalons sont pour la grande majorité des monoterpènes, avec une minorité de sesquiterpènes (TABLEAU II - 1). Ils ont été sélectionnés en fonction de leur présence dans les différents extraits afin de confirmer le maximum de composés identifiés par leurs spectres de masse et indices de Kovats.

En plus de valider l'identification de certains composés, les étalons du TABLEAU II - 1 ont été utilisés pour quantifier un grand nombre de composés dans les différents extraits.

L'analyse quantitative d'un extrait est souvent assimilée à une analyse semi-quantitative. Il existe deux méthodes pour réaliser une analyse semi-quantitative. La première est d'utiliser l'abondance relative du composé dans l'extrait. Cette abondance est mesurée comme le ratio de l'aire du pic du composé par rapport à l'aire totale des pics du chromatogramme de l'extrait. Ainsi, plus l'aire du pic du composé est importante, plus son abondance dans l'extrait est importante. La deuxième méthode utilisée pour une analyse semi-quantitative est d'utiliser un seul étalon de référence (étalonnage interne). L'étalon de référence choisi est étalonné dans une certaine gamme de concentration. Puis la concentration d'un analyte de l'extrait est déterminé en utilisant la droite d'étalonnage de l'étalon de référence. L'étalon de référence choisi doit faire partie de la même famille chimique que les composés analysés ou avoir une structure chimique proche afin d'avoir la même sensibilité d'analyse. Cependant, lorsqu'un grand nombre de composés est étudié, il devient difficile de trouver un seul étalon de référence proche chimiquement de tous les analytes. La seule façon de réaliser une analyse quantitative complète est alors d'utiliser l'étalon commercialisé de chaque analyte. De manière générale, lorsqu'une analyse quantitative est réalisée, seulement une dizaine d'étalons sont utilisés au maximum [19].

TABLEAU II - 1 - Caractéristiques chimiques des étalons utilisés pour l'analyse quantitative

Composé	Structure chimique	CAS	Pureté	Température d'ébullition (°C)	Indice de Kovats
$\alpha$ -Pinène		80-56-8	99 %	156	1049
Camphène		79-92-5	95 %	159	1085
$\beta$ -Pinène		127-91-3	99 %	166	1119
3-Carène		13466-78-9	90 %	171	1148
Limonène		138-86-3	97 %	176	1186
Eucalyptol		470-82-6	99 %	176	1200
p-Cymène		99-87-6	99 %	177	1258
Menthone		89-80-5	97 %	207	1481
Camphre		76-22-2	96 %	204	1529
Linalol		78-70-6	97 %	199	1540
4-Terpinéol		562-74-3	95 %	212	1595
Caryophyllène		87-44-5	98,5 %	263	1603
(Z)- $\beta$ -Farnésène		502-60-3	-	260	1620
Menthol		89-78-1	99 %	212	1630
Pulégone		89-82-7	97 %	224	1638

(E)- $\beta$ -Farnesène		502-60-3	-	260	1646
Estragol		140-67-0	98 %	215	1657
$\alpha$ -Humulène		6753-98-6	96 %	167	1667
$\alpha$ -Terpinéol		98-55-5	97 %	218	1674
Bornéol		507-70-0	99 %	213	1685
Citral		539240-5	95 %	229	1717
$\alpha$ -Farnesène		502-61-4	-	260	1729
$\beta$ -Citronellol		106-22-9	95 %	225	1739
Cuminaldéhyde		122-03-2	98 %	235	1793
Anéthol		104-46-1	98 %	234	1827
Géraniol		106-24-1	98 %	229	1842
Thymol		89-83-8	98 %	233	2138
Eugénol		97-53-0	99 %	253	2159
Carvacrol		499-75-2	98 %	277	2167

Dans notre étude, l'analyse quantitative des extraits a été réalisé avec une trentaine d'étalons. Seulement les composés pour lesquels une droite d'étalonnage a été réalisée, ont été quantifiés. L'étalonnage a été réalisé pour chaque méthode d'extraction avec les mêmes étalons. L'analyse des extraits et des solutions étalons par GC-MS permet d'obtenir un TIC (Total Ion Chromatogram) pour chaque analyse. A partir du TIC, il est possible de sélectionner un ion et d'obtenir un chromatogramme pour l'ion choisi (FIGURE II - 12). Cela permet de s'affranchir du bruit de fond et des potentielles co-élutions. L'extrait d'ion à partir du TIC permet aussi d'augmenter la sensibilité de l'analyse.

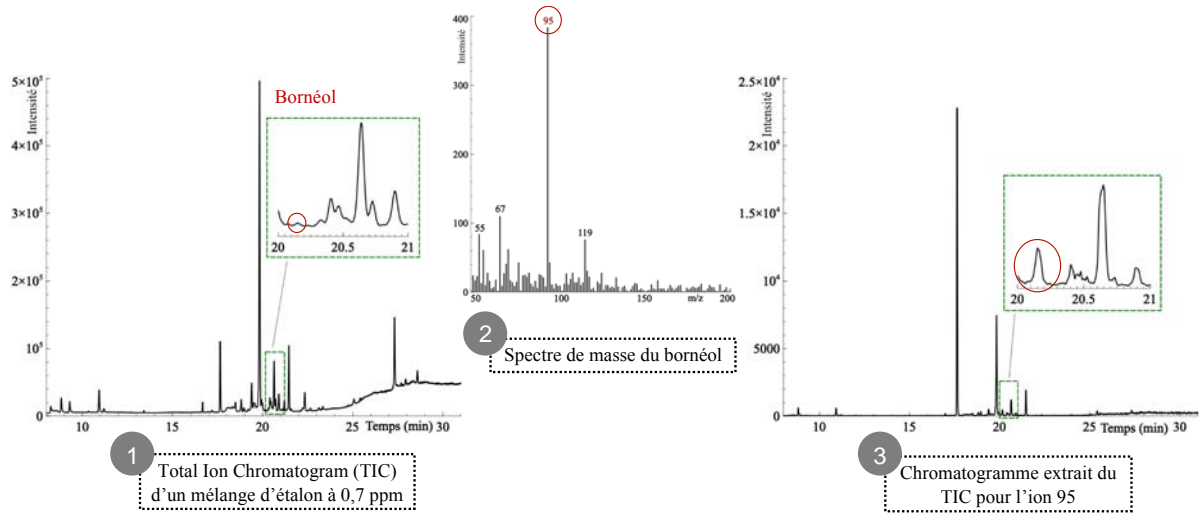


FIGURE II - 12 - Méthodologie d'intégration utilisée pour l'étalonnage

L'étalonnage de chaque composé est réalisé à partir de l'aire du pic du composé du chromatogramme extrait du TIC. Pour chaque étalon, un ion est sélectionné correspondant pour la plupart à l'ion majoritaire sur le spectre de masse. Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont été déterminées pour chaque étalon. La LOD est définie comme la plus basse concentration détectée avec un ratio signal par rapport au bruit de 3 tandis que la LOQ correspond à la plus basse concentration détectée avec un ratio signal sur bruit de 10.

#### II.4. PREPARATION DES PLANTES ETUDIEES

Les plantes étudiées (*Calamintha nepeta* (L.) Savi, *Asarum europaeum* (L.), *Mentha piperita* (L.) et *Thymus vulgaris* (L.)) ont été fournies par la pépinière Ledermann-Mutschler (Krautergersheim, France) (FIGURE II - 13).

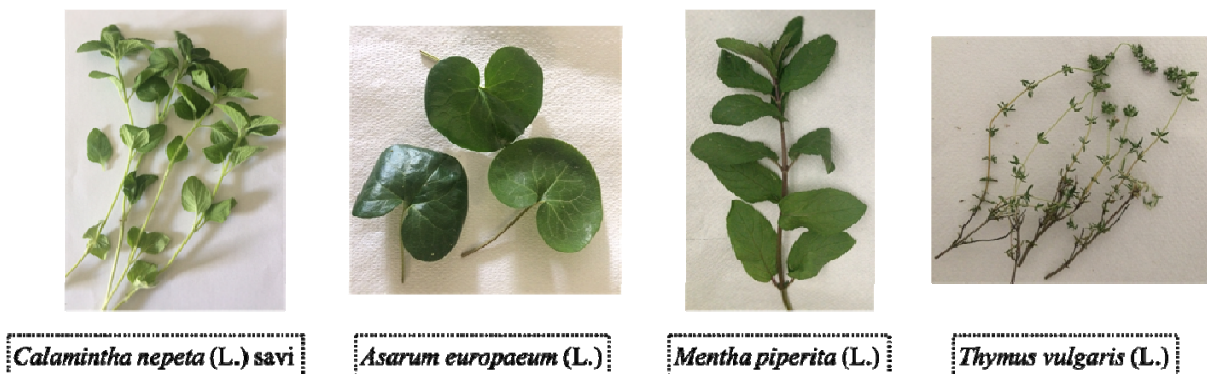


FIGURE II - 13 - Plantes étudiées

Après réception, les plantes ont été coupées au niveau des tiges et mises à sécher à l'air libre et à l'abri de la lumière. Les plantes sont inspectées régulièrement afin de vérifier qu'aucun

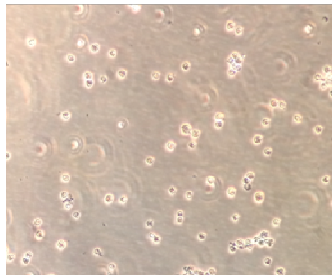
développement de moisissure ne se produise et pesées jusqu'à masse constante afin de déterminer la fin de la période de séchage. Les feuilles ne sont pas séparées des tiges. Les plantes sont ensuite finement broyées dans un broyeur cryogénique (6870 Freeze/Mill, Spex CertiPrep, Stanmore, Royaume-Uni). Les échantillons de plante sont disposés dans une cellule de cryobroyage plongée dans l'azote liquide et subissent 3 répétitions d'un cycle de broyage de 3 min à 20 impacts/seconde. Le broyage étant un processus exothermique, l'ajoute d'azote liquide permet de compenser cette augmentation de chaleur et ainsi d'éviter la dégradation du matériel végétal. Les poudres ainsi obtenues sont stockées à l'abri de la lumière et au froid (4 °C) afin de conserver au mieux le matériel végétal et de limiter au maximum l'évaporation des composés volatils.

Pour simplifier l'écriture et la lecture de la thèse, les plantes seront nommées dans la suite de la façon suivante : *Calamintha nepeta*, *Asarum europaeum*, *Mentha piperita* et *Thymus vulgaris*.

## II.5. TEST DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DES EXTRAITS TERPENIQUES DE PLANTES

### II.5.1. Cultures cellulaires

La lignée cellulaire de monocytes humains THP-1 a été utilisée pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits (FIGURE II - 14). La lignée cellulaire a été obtenue auprès de l'ATCC (LGC Standard, Molsheim, France) à partir d'un donneur male.



**Lignée cellulaire THP-1**

FIGURE II - 14 - Lignée cellulaire utilisée pour les tests biologiques

La lignée cellulaire THP-1 est cultivée en suspension. Après réception, les cellules sont décongelées et diluées dans un milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (FBS, Fetal Bovine Serum) et 1 % d'un mélange d'antibiotiques composé de pénicilline (1000 UI/mL, Gibco™) et de streptomycine (10000 µg/mL, Gibco™). Un nouveau milieu de culture est préparé toutes les deux semaines. Les cellules étant non adhérentes, elles sont diluées tous les deux ou trois jours dans des flasques de culture de 75 cm<sup>2</sup> de surface de croissance avec bouchon à membrane filtrante de 0,2 µm.

Les dilutions sont réalisées en retirant une partie de vieux milieu de la flasque qui sera complété par du milieu frais. Dans le cas où la totalité du milieu doit être renouvelée, les cellules sont centrifugées à 125 x g pendant 7 min, le surnageant est retiré et est remplacé par du milieu frais. Cette étape est appelée « passage ». Les cellules sont utilisées jusqu'à environ 30 passages. Les cultures de cellules sont incubées dans un incubateur à CO<sub>2</sub> à 37 °C sous atmosphère humide contrôlée à 5 % de CO<sub>2</sub>. Les milieux de culture et autres solutions entrant en contact avec les cellules sont préalablement réchauffés au bain-marie à 37°C. Selon les instructions de l'ATCC, les cellules THP-1 sont diluées avant d'atteindre une concentration de 1 x 10<sup>6</sup> cellules/mL. Après dilution, la concentration des cellules ne doit pas être inférieure à 1 x 10<sup>5</sup> cellules/mL afin de ne pas entraîner un ralentissement de leur croissance. Les cellules sont comptées par cytométrie en flux.

### *II.5.2. La cytométrie en flux*

La cytométrie en flux est une technique permettant de compter et de caractériser des cellules en les faisant défiler une après l'autre à grande vitesse dans un faisceau lumineux. La caractérisation est basée sur la mesure de la lumière réémise par diffusion ou par fluorescence. Un cytomètre est composé de trois systèmes principaux : un système fluidique, un système optique et un système électronique. Le système fluidique permet l'alignement des cellules devant le laser par focalisation hydrodynamique. La suspension cellulaire est injectée sous pression au centre d'une gaine liquide pressurisée. Le liquide de gaine est souvent un tampon phosphate salin (PBS, Phosphate-buffered Saline). Le liquide de gaine subit une accélération progressive ce qui entraîne un étirement du liquide de l'échantillon et ainsi l'alignement des cellules (FIGURE II - 15). Le liquide de gaine et la suspension cellulaire ne sont jamais mélangés grâce à une différence de pression. La vitesse de flux est un paramètre modifiable par l'utilisateur.



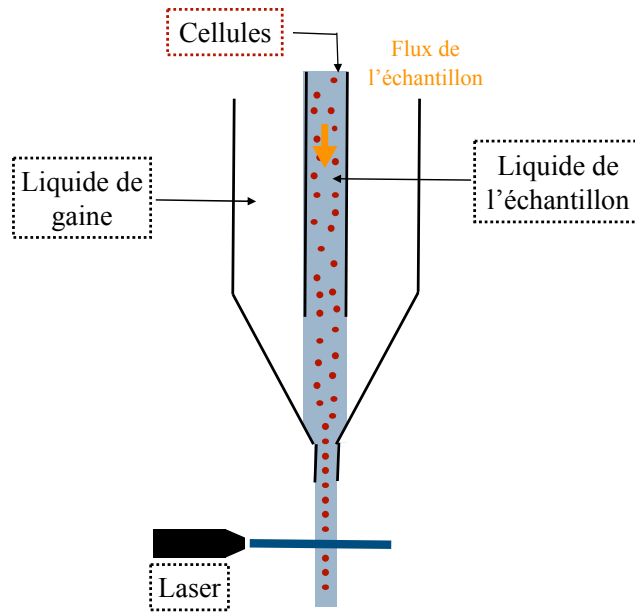


FIGURE II - 15 - Principe de la focalisation hydrodynamique dans un cytomètre

Le système optique permet l'illumination des cellules à l'aide d'une source lumineuse qui est souvent composée d'un ou de plusieurs lasers. La laser est une lumière monochromatique très fine qui permet d'exciter spécifiquement un fluorochrome à une longueur d'onde déterminée. La cellule, après interception de la lumière incidente, réémet dans diverses directions une partie de la lumière sous forme de signaux représentatifs de la taille et la granulométrie de la cellule (FIGURE II - 16a). La mesure de la lumière diffusée dans l'axe du rayon incident, appelée diffusion frontale (FSC, forward scatter), dépend du volume de la cellule. Plus la taille de la cellule est grande, plus l'intensité lumineuse du FSC est élevée. Ainsi, les lymphocytes peuvent être différenciés des monocytes grâce à leur différence de taille. La mesure de la lumière diffusée selon un angle à  $90^\circ$  par rapport à l'axe du rayon incident, appelée diffusion latérale (SSC, side scatter), est représentative du contenu cytoplasmique de la cellule. Le SSC est souvent corrélé à la granulométrie cellulaire mais il dépend aussi des ondulations de la membrane cellulaire. Ainsi les granulocytes reflètent d'avantage la lumière que les lymphocytes à surface lisse en raison de la structure rugueuse de leur surface mais aussi de leur granulométrie plus élevée (FIGURE II - 16b).

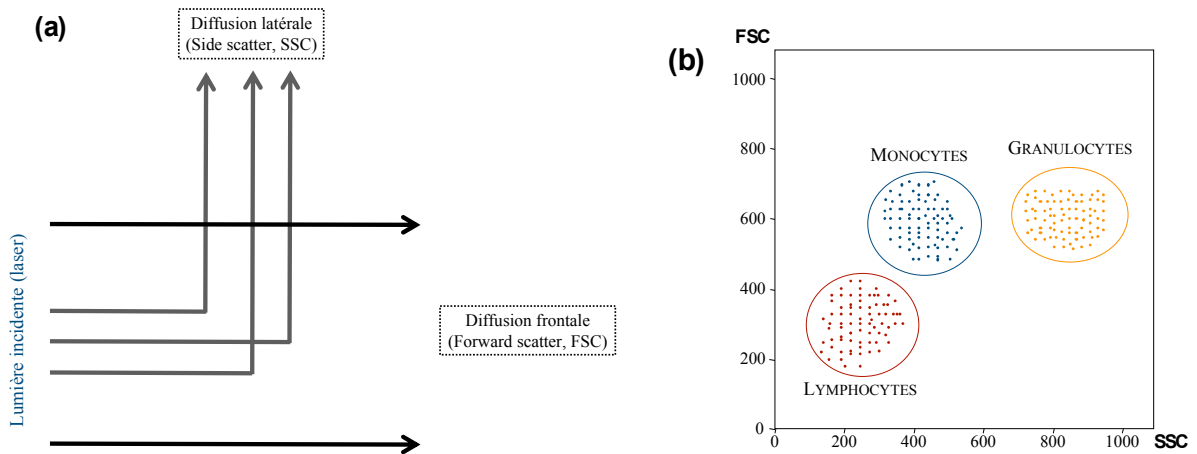


FIGURE II - 16 - Diffraction de la lumière par la cellule (a) et schéma d'un cytogramme permettant la différenciation de différentes cellules (b)

De manière simultanée, des couleurs fluorescentes peuvent être mesurées à l'aide de la lumière diffusée par la cellule. La fluorescence émise peut être endogène, mais le plus souvent elle est exogène, et est apportée à la cellule par un fluorochrome. Le fluorochrome absorbe l'énergie du laser et réémet l'énergie absorbée par émission de photons à une longueur d'onde plus élevée. Si les longueurs d'ondes de la lumière transmise par fluorescence depuis les fluorophores peuvent être discernée, alors il est possible d'utiliser plusieurs marqueurs de couleurs (coloration multiple) (FIGURE II - 17). Des anticorps marqués par fluorescence peuvent également être utilisés. Ainsi un processus cellulaire, tel que la mort cellulaire ou la sécrétion d'antigènes, peut être étudié en utilisant un marqueur ou des marqueurs fluorescents spécifiques de celui-ci.

Enfin le système électronique permet de convertir les signaux lumineux en signaux électriques. Les données obtenues sont alors tracées sur un graphique de nuage, appelé cytogramme, sur lequel chaque point représente une cellule. Le cytogramme peut être tracé en fonction du FSC et du SSC (FIGURE II - 16b) afin d'analyser la nature des cellules présentes dans l'échantillon ou en fonction des différentes fluorescences correspondants aux fluorophores introduits dans le milieu cellulaire (FIGURE II - 17) afin d'analyser les résultats obtenus pour l'étude du processus cellulaire choisi.

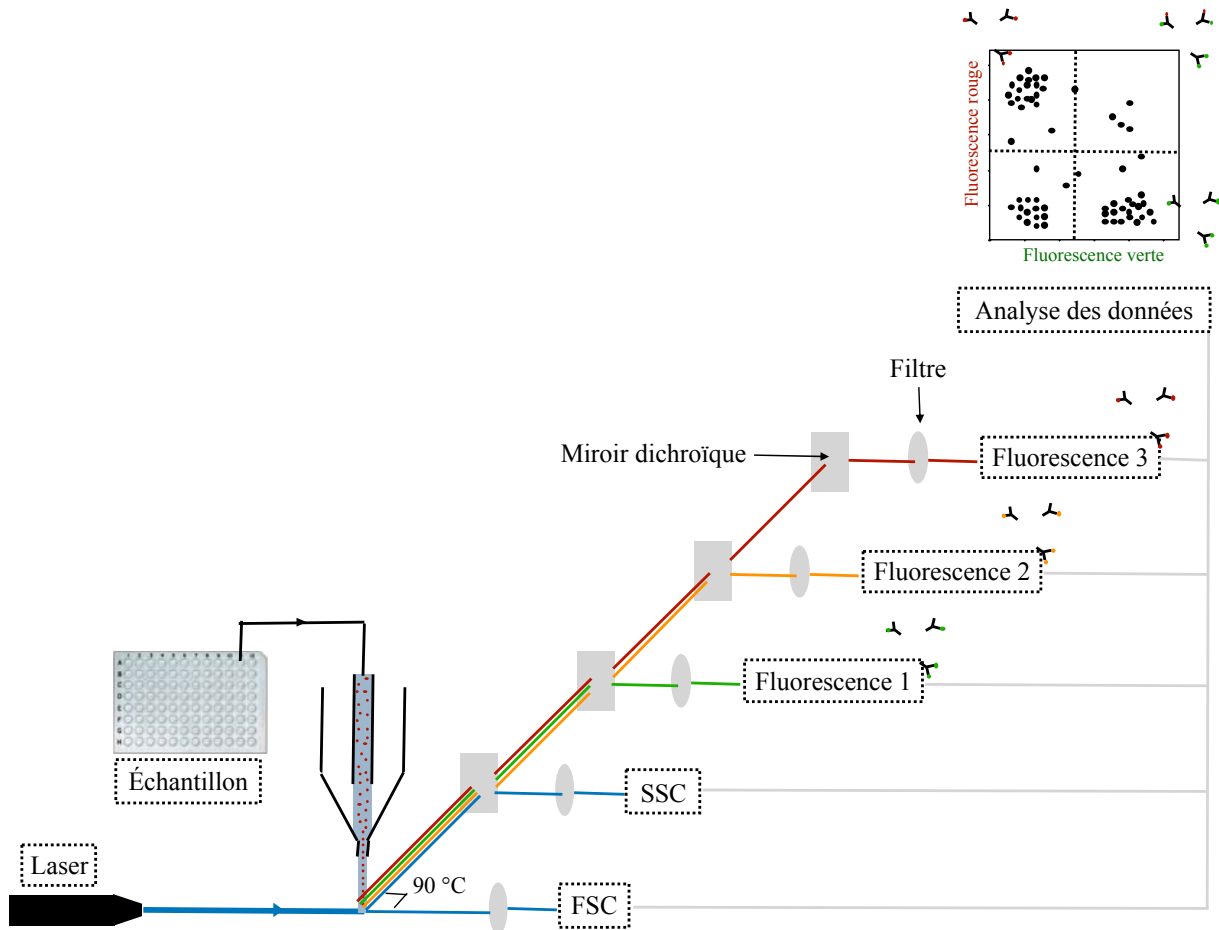


FIGURE II - 17 - Principe général de la cytométrie en flux

### II.5.3. Principe du test anti-inflammatoire

Le test anti-inflammatoire réalisé est basé sur l'inhibition de la sécrétion du TNF- $\alpha$ . L'ajout de lipopolysaccharide (LPS) issu de *Salmonella abortus equi* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) dans le milieu cellulaire va entraîner un relargage de TNF- $\alpha$  par les cellules, ces dernières sont dites « activées ». La présence de TNF- $\alpha$  dans le milieu cellulaire est suivi par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps spécifiques (TNF- $\alpha$  secretion assay, Miltenyi Biotech, États-Unis). Un premier complexe d'anticorps (anticorps I ou anticorps de capture) composé d'un anticorps monoclonal anti-TNF- $\alpha$  (IgG1 souris) conjugué à un anticorps monoclonal spécifique à la surface cellulaire (IgG2a souris) va permettre la capture et la fixation du TNF- $\alpha$  à la surface de la cellule. Puis un anticorps monoclonal anti-TNF- $\alpha$  (IgG1 humain) conjugué à la R-phycoérythrine (PE) (anticorps II ou anticorps de détection) va se fixer sur le TNF- $\alpha$  fixé au premier complexe d'anticorps et ainsi permettre la détection du TNF- $\alpha$  par cytométrie en flux (FIGURE II - 18).

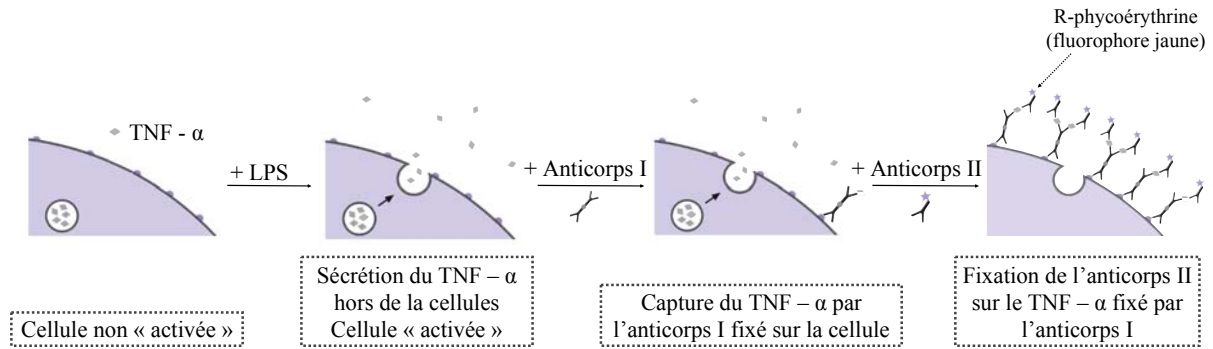


FIGURE II - 18 - Principe du test anti-inflammatoire basé sur l'inhibition de la sécrétion du TNF- $\alpha$

La R-phycoérythrine (PE), extraite d'algues rouges, absorbe à 496, 546 et 565 nm et émet à 578 nm correspondant à une fluorescence jaune. En mesurant la fluorescence jaune à la surface de la cellule par cytométrie en flux, il est possible d'étudier l'inhibition de la sécrétion du TNF- $\alpha$  par les extraits de plantes. Une forte fluorescence jaune correspond à une forte concentration en TNF- $\alpha$  et donc à aucune activité anti-TNF- $\alpha$  ou anti-inflammatoire de l'extrait. Inversement, une absence de fluorescence jaune correspond à une absence de TNF- $\alpha$  dans le milieu cellulaire et donc à un pouvoir anti-inflammatoire de l'extrait testé. Une autre molécule fluorescente, l'iodure de propidium, est introduite dans le milieu cellulaire afin d'évaluer simultanément la toxicité des extraits. L'iodure de propidium est un agent intercalant de l'ADN et ne pénètre dans la cellule uniquement lorsque la membrane plasmique est endommagée, ce fluorochrome permet d'étudier la mort cellulaire par intégrité membranaire. Une fois le colorant lié à l'ADN, l'iodure de propidium absorbe à 535 nm et émet à 617 nm correspondant à une fluorescence rouge. En mesurant la fluorescence rouge émise à la surface de la cellule par cytométrie en flux, il est possible de mesurer le pourcentage de mort cellulaire. Ainsi la toxicité des extraits peut être évaluée et la mesure de leur activité anti-inflammatoire peut être basée uniquement sur les cellules vivantes en écartant les cellules mortes marquées à l'iodure de propidium.

Le test anti-inflammatoire est réalisé sur plaque 96 puits. Dans chaque puit sont ajoutés :

- 180  $\mu$ L de cellules à une concentration de  $3 \times 10^5$  cellules/mL dans du milieu RPMI-1640 complet
- 20  $\mu$ L de chaque extrait dans un mélange 90/10 eau/éthanol (concentration finale d'éthanol dans le puits au contact des cellules de 1 %)
- 20  $\mu$ L de LPS à 10  $\mu$ g/mL (concentration finale dans le puit de 1  $\mu$ g/mL)

La plaque est mise à incuber pendant 2 heures à 37 °C sous atmosphère humide contrôlée à 5 % de CO<sub>2</sub>. Après incubation, 2  $\mu$ L de l'anticorps I (anticorps de capture) ainsi que 2  $\mu$ L de l'anticorps II (anticorps de détection) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est remise à incuber pendant 2 heures dans les mêmes conditions que précédemment (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). 2  $\mu$ L d'iodure de propidium à 100  $\mu$ g/mL (concentration finale dans le puits de 1  $\mu$ g/mL) sont ajoutés à chaque puits et la plaque est mise à incuber (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) une dernière fois pendant 10 min avant l'analyse par cytométrie en

flux. Le cytomètre utilisé est un Guava® easyCyte™ 12HT (Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne). Cet appareil ne dispose pas d'un système de liquide de gaine pour aligner les cellules mais d'un micro-capillaire. Dans ce système, une cellule fluide micro-capillaire carrée en quartz remplace le liquide de gaine. Le micro-capillaire étant carré, le flux est rapide au centre mais fortement ralenti aux quatre coins du capillaire permettant ainsi la focalisation hydrodynamique des cellules après un parcours de 8 cm avant passage devant les rayons lasers (FIGURE II - 19).

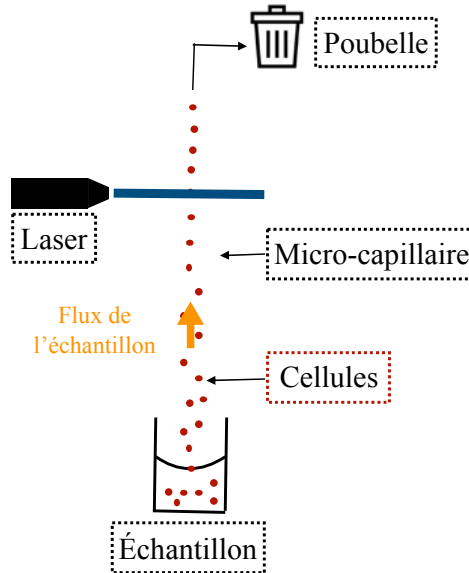


FIGURE II - 19 - Focalisation hydrodynamique dans un micro-capillaire

Le système de cytométrie en flux micro-capillaire permet de travailler avec des micro volumes d'échantillon (50-100  $\mu$ L) contrairement au système classique présenté précédemment qui nécessite une dizaine de mL par analyse. Cela permet de disposer d'un comptage direct des cellules dès que ces dernières passent devant le laser. Le laser utilisé est un laser bleu de longueur d'onde d'excitation de 488 nm. La source d'excitation lumineuse doit permettre une illumination des colorants à une longueur d'onde proche de leur maximum d'absorption (496 nm pour la *R*-phycoérythrine et 535 nm pour l'iodure de propidium). La vitesse de flux moyenne utilisée est de 35  $\mu$ L/min. Avant prélèvement de l'échantillon par le micro-capillaire, les cellules sont remises en suspension à l'aide d'un agitateur rotatif pendant 10 secondes. Entre chaque échantillon, le capillaire ainsi que l'agitateur sont nettoyés. Les données obtenues sont traitées à l'aide du logiciel GuavaSoft (InCyte 3.1.1.).

Un contrôle négatif est réalisé en déposant 180  $\mu$ L de cellules mais sans LPS afin de ne pas les activer.

Un contrôle positif du relargage du TNF- $\alpha$  est réalisé en activant les cellules avec le LPS mais sans rajouter l'extrait afin de mesurer la sécrétion du TNF- $\alpha$  sans interférences avec la présence de l'extrait. Un deuxième contrôle positif correspondant à l'inhibition de la sécrétion du TNF- $\alpha$  par un anti-inflammatoire connu est réalisé en déposant la molécule anti-inflammatoire sur les cellules activées à la place de l'extrait. Le célastrol, un triterpénoïde naturel, a été utilisé comme contrôle

positif de l'activité anti-inflammatoire a une concentration de 0,5  $\mu\text{M}$  finale dans le puits au contact des cellules. Le célastrol inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire *in vitro* et en particulier celle de TNF- $\alpha$  [20].

#### II.5.4. Traitement des données

Différents types de test statistiques ont été utilisés pour analyser les données obtenues pour les tests biologiques. Pour la comparaison de deux moyennes, un test de Student est réalisé avec un seuil de significativité  $\alpha=0,05$ . Pour la comparaison de plus de deux moyennes, une analyse des variances (ANOVA) suivi d'un test de Tukey sont réalisés avec un seuil de significativité  $\alpha=0,05$ . L'ANOVA permet d'évaluer si les moyennes sont significativement différentes puis le test de Tukey permet de déterminer quelle paire de données contient une différence significative. Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel JMP<sup>®</sup> Statistical Discovery<sup>™</sup> 8 (SAS Institute).

Les courbes effet-dose des composés purs ont été tracés à l'aide du logiciel Prism<sup>®</sup> 6.0 (GraphPad Software). Les valeurs des EC<sub>50</sub> ont été calculées par le même logiciel à partir des courbes effet-dose à l'aide de la formule suivante :

$$Y = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{pente}))} \quad (\text{ÉQUATION II - 14})$$

Avec  $y$  la réponse,  $x$  la concentration du composé étudié,  $\text{min}$  le plateau correspondant à la valeur de la réponse minimale,  $\text{max}$  le plateau correspondant à la valeur de la réponse maximale et  $\text{pente}$  la valeur de la pente de la sigmoïde.

La valeur d'EC<sub>50</sub> est calculée pour une valeur de  $y$  correspondant à la moitié de la différence entre la valeur maximale et la valeur minimale de  $y$ .

## II.6. RÉFÉRENCES

- [1] D.W. Byrd, D. Freeman, Automated static headspace sampler for gas chromatography, *J. Chromatogr. A.* 686 (1994) 235–243.
- [2] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148.
- [3] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, Applications of solid - phase microextraction in food analysis, *J. Chromatogr. A.* 880 (2000) 35–62.
- [4] J.A. Field, G. Nickerson, D.D. James, C. Heider, Determination of essential oils in hops by headspace solid-phase microextraction, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 1768–1772.
- [5] J. Pawliszyn, Solid phase microextraction theory, in: *Solid Phase Microextraction A Pract. Guid.*, 1999: pp. 1–26.
- [6] C. Bicchi, C. Cordero, P. Rubiolo, A survey on high-concentration-capability headspace sampling techniques in the analysis of flavors and fragrances, *J. Chromatogr. Sci.* 42 (2004) 402–409.
- [7] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737–747.
- [8] C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, B. Sgorbini, F. David, P. Sandra, Dual-phase twistors: A new approach to headspace sorptive extraction and stir bar sorptive extraction, *J. Chromatogr. A.* 1094 (2005) 9–16.
- [9] S. Gorji, P. Biparva, M. Bahram, G. Nematzadeh, Stir bar sorptive extraction kit for determination of pesticides in water samples with chemometric data processing, *Microchem. J.* 148 (2019) 313–321.
- [10] C. Bicchi, C. Iori, P. Rubiolo, P. Sandra, Headspace Sorptive Extraction ( HSSE ), Stir Bar Sorptive Extraction ( SBSE ), and Solid Phase Microextraction ( SPME ) applied to the analysis of roasted arabica coffee and coffee brew, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 449–459.
- [11] C. Yang, J. Wang, D. Li, Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review, *Anal. Chim. Acta.* 799 (2013) 8–22.
- [12] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent microextraction into a single drop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236–2240.
- [13] A. Besharati-Seidani, A. Jabbari, Y. Yamini, Headspace solvent microextraction: A very rapid method for identification of volatile components of Iranian Pimpinella anisum seed, *Anal. Chim. Acta.* 530 (2005) 155–161.
- [14] Y. Ke, W. Li, Y. Wang, X. Hao, R. Jiang, F. Zhu, G. Ouyang, Comparison of fully-automated headspace single drop microextraction and headspace solid phase microextraction techniques for rapid analysis of No. 6 solvent residues in edible oil, *Microchem. J.* 117 (2014) 187–193.
- [15] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, □sa Nyström, J. Pettersen, R. Bergma, Experimental design and optimization, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 42 (1998) 3–40.
- [16] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escaleira, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta.* 76 (2008) 965–977.
- [17] V.I. Babushok, P.J. Linstrom, I.G. Zenkevich, Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils, *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 40 (2011) 1–47.
- [18] F. Bianchi, M. Careri, A. Mangia, M. Musci, Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: Database creation and evaluation of precision and robustness, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 563–572.
- [19] E. Abilleira, M. de Renobales, A.I. Nájera, M. Virto, J.C.R. de Gordo, F.J. Pérez-Elortondo, M. Albisu, L.J.R. Barron, An accurate quantitative method for the analysis of terpenes in milk fat by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry, *Food Chem.* 120 (2010) 1162–1169.
- [20] A.C. Allison, R. Cacabelos, V.R.M. Lombardi, X.A. Álvarez, C. Vigo, Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer’s disease, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 25 (2001) 1341–1357.





---

## CHAPITRE III

# OPTIMISATION DES METHODES D'EXTRACTION

---



## CHAPITRE III – OPTIMISATION DES METHODES D'EXTRACTION

Dans cette partie, différentes méthodes d'extraction ont été optimisées et comparées pour l'extraction de terpènes volatils dans diverses matrices. La muscade, une plante riche en terpènes volatils aux propriétés physico-chimiques (point de fusion, masse molaire, polarité), a été utilisée pour l'optimisation des différentes méthodes d'extraction. Une fois optimisées, les méthodes d'extraction ont été appliquées à 5 autres épices : le cannelle, le cumin, le thym, les graines de fenouil et le clou de girofle. Les composés présents dans ces extraits de plantes ont été identifiés par leurs spectres de masse ainsi que par leurs indices de rétention de Kovats. Puis certains composés présents dans ces mêmes extraits ont été quantifiés à partir de droites d'étalonnage élaborées pour une trentaine de terpènes volatils. Ainsi, les extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction ont été comparés de manière qualitative (combien de molécules ont été extraites ?) et ensuite de manière quantitative (quelle quantité de ce composé a été extraite ?). L'étalonnage a été réalisé pour chaque méthode d'extraction étudiée. Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont été déterminées pour chacune des méthodes d'extraction. Les épices jouent ici le rôle de modèles. En effet, une fois la méthode d'extraction la plus efficace pour l'extraction des terpènes volatils identifiée, cette dernière sera appliquée aux plantes d'intérêts.

Dans un premier temps, deux méthodes assez classiques pour l'extraction de molécules bioactives, l'hydrodistillation et l'extraction par liquide pressurisé (PLE), ont été comparées à une méthode plus sélective des molécules volatiles, l'extraction dans l'espace de tête (HS). Différents paramètres de la PLE et de l'HS ont été optimisés, à savoir la température d'extraction, le temps d'extraction, le nombre de cycle en PLE et la vitesse d'agitation en HS. Ces méthodes ont été optimisées en faisant varier un paramètre à la fois. L'extraction par HS a montré un fort potentiel pour l'extraction des composés volatiles. Dans un deuxième temps, afin d'être plus sélectif envers les terpènes volatils et d'obtenir des extraits plus concentrés, deux autres méthodes d'extraction ont été étudiées, inspirées par les résultats obtenus par l'extraction par HS : la microextraction sur phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME) et l'extraction par sorption dans l'espace de tête (HSSE). En effet, ces deux méthodes sont elles aussi basées sur l'extraction des composés volatiles présents dans l'espace de tête mais en ajoutant une phase stationnaire sur laquelle vont se concentrer les composés d'intérêt. Des résultats préliminaires sur ces deux méthodes d'extractions ont permis de sélectionner les paramètres ayant le plus gros impact sur l'efficacité de l'extraction. Ces différents paramètres d'extractions, comme par exemple le temps d'extraction et la température d'extraction, ont ensuite été optimisés par deux plans d'expériences successifs.

A la suite de ces différentes études, une méthode d'extraction robuste, répétable, écoresponsable et permettant de produire un extrait riche en terpènes volatils a été identifiée et utilisée pour extraire les terpènes volatils des plantes d'intérêt afin d'en étudier leurs propriétés anti-inflammatoire.

### III.1. ARTICLE: COMPARISON OF HEADSPACE, HYDRODISTILLATION AND PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION OF TERPENES AND TERPENOIDS FROM FOOD MATRICES – QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS

Zélie Triaux<sup>a,b</sup>, Hugues Petitjean<sup>b</sup>, Eric Marchioni<sup>a</sup>, Damien Steyer<sup>c</sup>, Christophe Marcic<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France

<sup>b</sup> Benephyt, 16 rue d'Austerlitz, 67000 Strasbourg, France

<sup>c</sup> Twistaroma, 74 Route du Rhin, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

Article accepté dans *Journal of Analytical Chemistry* le 13 février 2019

#### III.1.1. Abstract

Three sample preparation methods (hydrodistillation, pressurized liquid extraction and static headspace) used for the extraction of terpenoids from various food matrices (cinnamon, thyme, cumin, fennel, clove, nutmeg and orange) were compared. Extracts were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry qualitatively and quantitatively using a wide range of terpenoids standards. Quantitative and qualitative differences have been found in the chemical compositions of the analyzed samples depending on the extraction method. Headspace was the most efficient extraction method as HS extracts were the most concentrated. This allows to reach lowest limits of detection and limits of quantification for the different standards extracted by HS (eugenol's LOD by HS is 0.00218 µg/g against 0.032 µg/g by liquid injection). Furthermore, as HS is a simple, rapid, solvent less and automated extraction method, it should be considered as an alternative technique to hydrodistillation or PLE when studying the quantity of terpenoids in food matrices.

Keywords: Terpenes quantification, GC-MS, Headpace, Hydrodistillation, Pressurized liquid extraction, essential oil.

#### III.1.2. Introduction

Terpenes and their oxygenated forms terpenoids are originated from the secondary metabolism of plants. They represent a large family of natural products by containing more than 25,000 structurally diverse compounds [1]. Terpenes are the main constituents of essential oils and they are

used as flavors enhancers and fragrances [2]. Due to their diversity of chemical structures, they have been reported as having important biological activities such as antimicrobial [3], antioxidant [4], antinociceptive [5], anti-inflammatory [6] and anticonvulsant [7]. Terpenes and terpenoids are used as a source of raw material for drug discovery [8], hence the importance of developing a reliable extraction method for those compounds.

Sample preparation is a key step in studies involving the discovery of active compound. Even with the best analytical method, if the extract was badly prepared, the result will not be valid [9]. The extraction procedure should be adapted to the nature of the analyzed compounds, rapid, simple and automatic for higher reproducibility [10]. Traditionally, the extraction of terpenes and terpenoids is performed by hydrodistillation [11,12] soxhlet extraction [13] or maceration [14]. However, those traditional techniques often require a large volume of organic solvent thus having a negative impact on the environment, are time-consuming, can lead to the thermal degradation of some natural products and have a low extraction efficiency [15]. Thus, developing alternative eco-friendly extraction techniques with smaller volumes of solvent, lower extraction time, better selectivity, and higher efficiency is highly desirable.

Pressurized liquid extraction (PLE) operates at high pressures (35-210 bar) and temperatures above the boiling points of solvents (50-200°C). The use of higher temperatures allows a better solubility of the compounds in the solvent. The decrease of the solvent viscosity by high temperature and the use of high pressures allows a better penetration of the solvent in the matrix and thus a better extraction of the analytes. PLE consumes small amounts of solvent, decreases significantly the extraction time and can be automated [16]. This technique is being utilized in diverse areas, including the extraction of terpenes and terpenoids from plants and food matrices [17,18].

Static headspace technique (HS) extracts volatiles and semi-volatiles compounds directly from the gaseous phase above solid or liquid matrix. HS is a simple, rapid, solvent free, with no sample preparation needed, automated and easily coupled to gas chromatography [19]. Furthermore, only volatiles compounds are extracted by this technique while non-volatile ones remain in the vial and do not enter the GC thus preventing damage on the column. Small amounts of volatiles compounds can be analyzed by this method [20]. As a result, HS extraction is used in a wide range of fields, particularly for the analysis of residual solvents in food [21] and drugs (European Pharmacopoeia) but also for the extraction of volatiles compounds from food and plants [22,23].

Cinnamon, thyme, cumin, fennel, clove, nutmeg and orange belongs to a wide range of herbs and fruits used every day all around the world in nutrition or in traditional medicine, thus are frequently studied for their essential oils rich in terpenes and terpenoids [24–30] and for their diverse biological activities [28,31–36]. However, those plants extracts are mostly obtained by hydrodistillation or more recently by supercritical fluid extraction [37] but rarely by PLE or HS except for essential oil of thyme

[38]. Furthermore, most often only the qualitative analysis of those extracts is done and hardly ever the quantitative one.

The aim of the present work was to develop a green, efficient, low time consuming and quantitative technique for the extraction of terpenes and terpenoids from various food matrices. To this end, hydrodistillation was used as a reference method for the study of PLE and HS extraction. Both qualitative and quantitative analysis were used to compare the efficiency of the extraction methods, i.e. the extraction method which allows to obtain concentrated extracts with the most variety of terpenes.

### III.1.3. Materials and methods

#### III.1.3.1. Materials

Cinnamon (*Cinnamomum verum*, Chamsyl), thyme (*Thymus vulgaris*, Chamsyl), cumin (*Cuminum cyminum*, Conquête des saveurs), fennel (*Foeniculum vulgare*, Ducros), clove (*Syzygium aromaticum*, Ducros), nutmeg (*Myristica fragrans*, Ducros), and organic oranges were all bought from a local shop. All the spices were bought in powder except for the fennel which was seeds and thym which was cut in small pieces. Orange peels were stored in a freezer at -20°C until analysis. For the extractions, the food matrices were used as bought.

#### III.1.3.2. Chemicals

All solvents were of analytical grade (VWR Chemicals, Fontenay-sous-bois, France). Milli-Q water (18.2 M $\Omega$ ) was generated by Millipore synergy system (Molsheim, France). HCl was purchased from Acros Organics (Geel, Belgium). Standards were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). All standards were at high purity ( $\geq 95\%$ ) except for 3-carene ( $\geq 90\%$ ). Nitrogen was of 4.5 grade and helium of 4.6 grade (Sol France, Saint-Ouen l'Aumone, France).

#### III.1.3.3. Sample preparation procedure

##### III.1.3.3.1. Headspace extraction (HS)

20 mg of spice (or 2 g of orange peels) were placed in a 20 mL headspace vial (23 x 75 mm) which was closed with PTFE-lined silicon septa and metallic screw caps. The vial was heated at 125°C during 30 min and agitated at 250 rpm to facilitate the extraction of the compounds. Using a Combi-pal (CTC Analytics AG, Switzerland) automatic HS injector, 1 mL of the headspace above the

solid was injected directly in the GC-MS for analysis. The HS syringe was heated at 130°C. Each extraction was performed in triplicates in three different vials.

The extraction time (15, 30, 60 min), the extraction temperature (80, 125, 140°C), and the stirring speed (250, 500 rpm) were optimized.

### III.1.3.3.2. Hydrodistillation

A 20 g portion of spice (or 50 g of orange peels) was placed in a 1 L round bottomed flask with 200 mL of 0.1 M hydrochloric acid according to the European Pharmacopoeia (ref 04/2011:0387). The essential oils were obtained by hydrodistillation for 4 hours. The essential oils were recovered with 1 mL of hexane as only droplets were obtained from the hydrodistillation. They were then diluted 100 to 5000 times in isooctane depending on the sample before analysis by GC-MS and were injected in triplicates.

### III.1.3.3.3. Pressurized liquid extraction (PLE)

The extraction was carried out using an ASE-350 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). A weighed amount (3 g for the spices, 5 g for orange peels) of the sample mixed with chemically inert Fontainebleau sand (previously heated at 600°C for 4 hours and stored at room temperature) was placed into a 10-mL stainless steel extraction cell (16 x 51 mm). Two 27 mm cellulose filters (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) were placed one at the bottom and one at the top of the extraction cell. The content of the cell was extracted with one cycle of extraction at 125°C, 100 bar, maintained 7 min in the static extraction mode. After the static step, 10 mL of the extraction solvent was pumped through the cell. The extraction solvent was a 50/50 v/v% mixture of water and ethanol. The volume of the collected extract was 15 mL. For each food matrix, extractions were performed in triplicates in three different cells under the same conditions. Between runs, the system was washed with 20 mL of the extraction solvent.

The solvent (ethanol/water 50/50, methanol, heptane/ethanol 50/50), the number of cycles (1, 2, 5 cycles), the temperature of extraction (80, 125, 150°C) and the static time of extraction (3, 7, 10 min) were optimized to obtain the best extraction efficiency.

Before analysis by GC-MS, the extracts were diluted ten times in methanol and filtered through a 0.25 µm filter.

#### III.1.3.4. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) procedure

Oil extracted after hydrodistillation, as well as HS and PLE extracts were analyzed by GC-MS system 450-GC/240-MS (Varian, Les Ulis, France). 1  $\mu$ L of the essential oils and PLE extracts and 1 mL of the HS of the samples were injected on a DB-WAX capillary column (60 m x 0.25 mm x 0.15  $\mu$ m) (Agilent Technologies, Les Ulis, France). The injector was heated at 210°C and operated in splitless mode except for the HS samples which were analyzed in split mode (1:8). Helium was used as carrier gas at 1 mL/min. The following temperature program was applied on the column oven: 1 min at 40°C and then an increase to 100°C at 10°C/min, heated to 130°C at 5 °C/min, heated to 150°C at 10°C/min, heated to 180°C at 5°C/min, heated to 230°C at 10°C/min and then held isothermal at 230°C for 5 min. The transfer line temperature was set to 200°C. The mass spectrometer was operated in electronic ionization mode (EI) at 70 eV with the ion source temperature set at 150°C, the manifold temperature was 50°C. The mass spectra were registered in a full scan acquisition mode using a range of 50-200 amu.

#### III.1.3.5. Qualitative and quantitative analysis

Qualitative analysis was carried out by comparing the obtained mass spectra of the compound with the one from the library of the National Institute of Standards and Technology (NIST, USA). The results were then confirmed by calculating the retention indexes (RI) of each compound [39] and comparing them to the ones in the literature for DB-WAX type columns.

For the quantitative analysis, standards solutions were prepared in methanol with a concentration range from 0.1  $\mu$ g/g to 100  $\mu$ g/g. Ten points were used to draw the calibration curves, and each concentration was analyzed in triplicates. For each compound, two calibration curves were drawn corresponding to two linearity ranges. The calibration procedure was carried out for liquid and HS injections. For the HS extraction, 1 mL of the standards solution was placed in the 20 mL headspace vial and was spiked with an internal standard (menthyl acetate) to follow the variations of the extraction method. Each standard was quantified according to the area of the compound's selected ion which was extracted from the TIC analysis. Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) were measured for each standard. LOD and LOQ were defined as the lowest concentrations which could be detected at the signal-to-noise ratio of three or ten respectively. The calibration curves were calculated above the LOQ.



### III.1.4. Results and discussion

#### III.1.4.1. Optimization of the sample preparation

The hydrodistillation procedure was directly adapted from the European Pharmacopeia, thus no optimization was done for this extraction method. The extraction efficiency of PLE and HS methods was based on the peak areas (quantity of the compound) of 16 characteristics terpenoids analyzed on GC-MS in nutmeg as this matrix contains a wide variety of terpenes and terpenoids [29]. The optimized methods were then applied to the different food matrices of interest. The detailed optimization results are presented in the FIGURE III - 1 and in the FIGURE III - 2. The one parameter which had a major impact on the extraction efficiency was the temperature.

For both methods, increasing the extraction temperature (from 80°C to 150°C), increases the chromatographic peak areas of the extracted terpenoids, even more so for the ones with high boiling points. However, increasing the temperature above 125°C does not increase the efficiency of the extraction, it even decreases the extraction efficiency of some terpenoids. As a result of the optimization, the selected temperature of extraction for both HS and PLE was 125°C. This optimal extraction temperature was chosen as a compromise to extract the most varieties of terpenes with different chemical properties (polarity, boiling temperatures...).

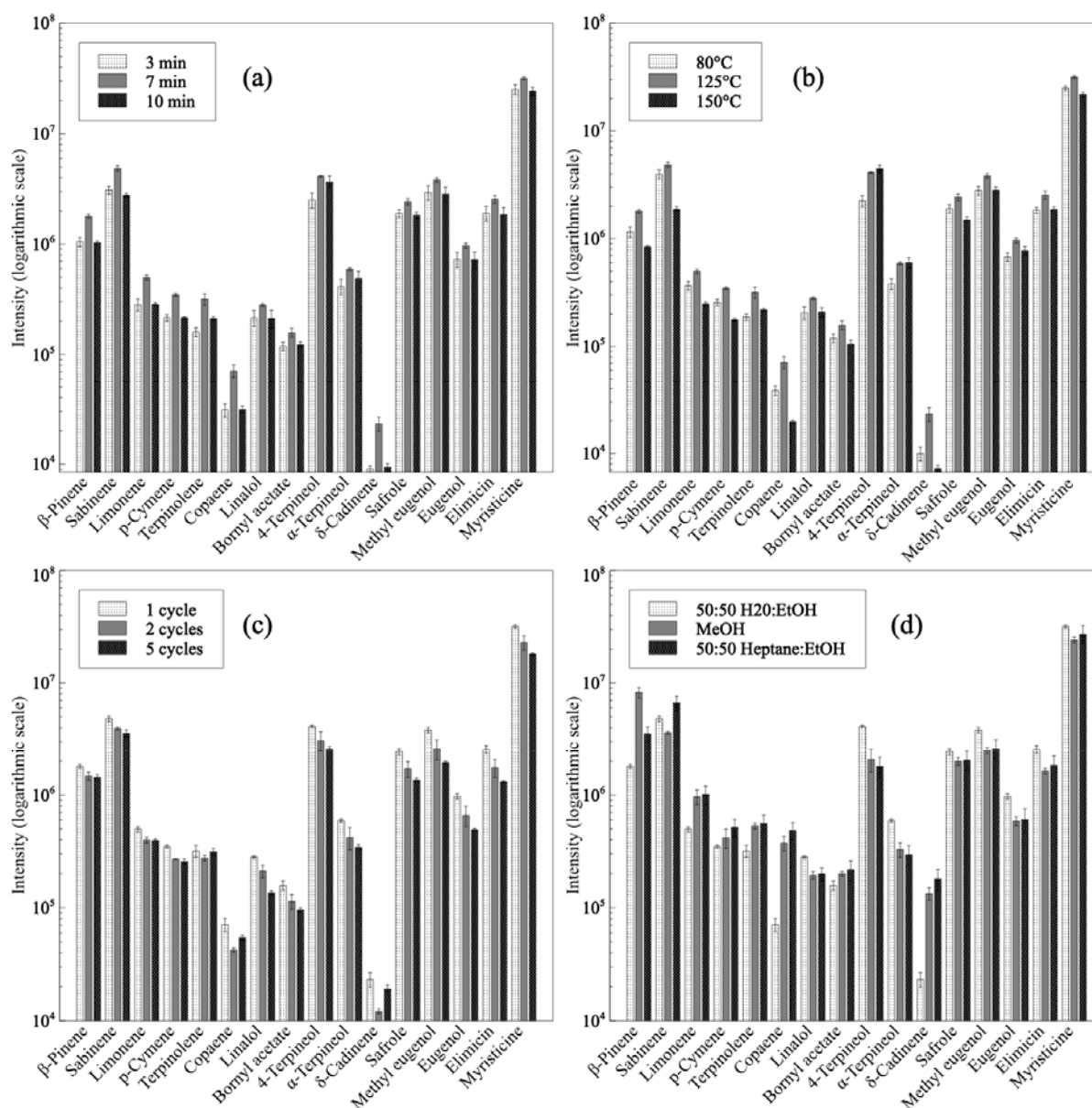


FIGURE III - 1 - The effect of extraction time (a), extraction temperature (b), number of cycles (c), and solvent (d) on the efficiencies of extraction of 16 characteristic terpenoids from nutmeg by PLE

The mixture water/ethanol (50/50) shows better extraction efficiency for most 16 terpenoids studied in nutmeg. The advantage of this solvent, compared to heptane and methanol, is that it is considered a green solvent. It was thus selected for PLE. Increasing the extraction static time up to 7 min of PLE procedure, increases the efficiency of the extraction but increasing further this extraction time does not increase the extraction of the terpenoids. 7 min extraction static time was therefore selected. The same result can be observed for the extraction time of HS. Increasing the extraction up to 30 min increases slightly the extraction efficiency, but increasing it further decreases slightly the quantity of compound extracted. Thus 30 min was selected for the extraction time of HS method. The other parameters (the

number of cycles for PLE and the stirring speed for HS) did not have a significant impact on the extraction efficiency of PLE and HS extractions.

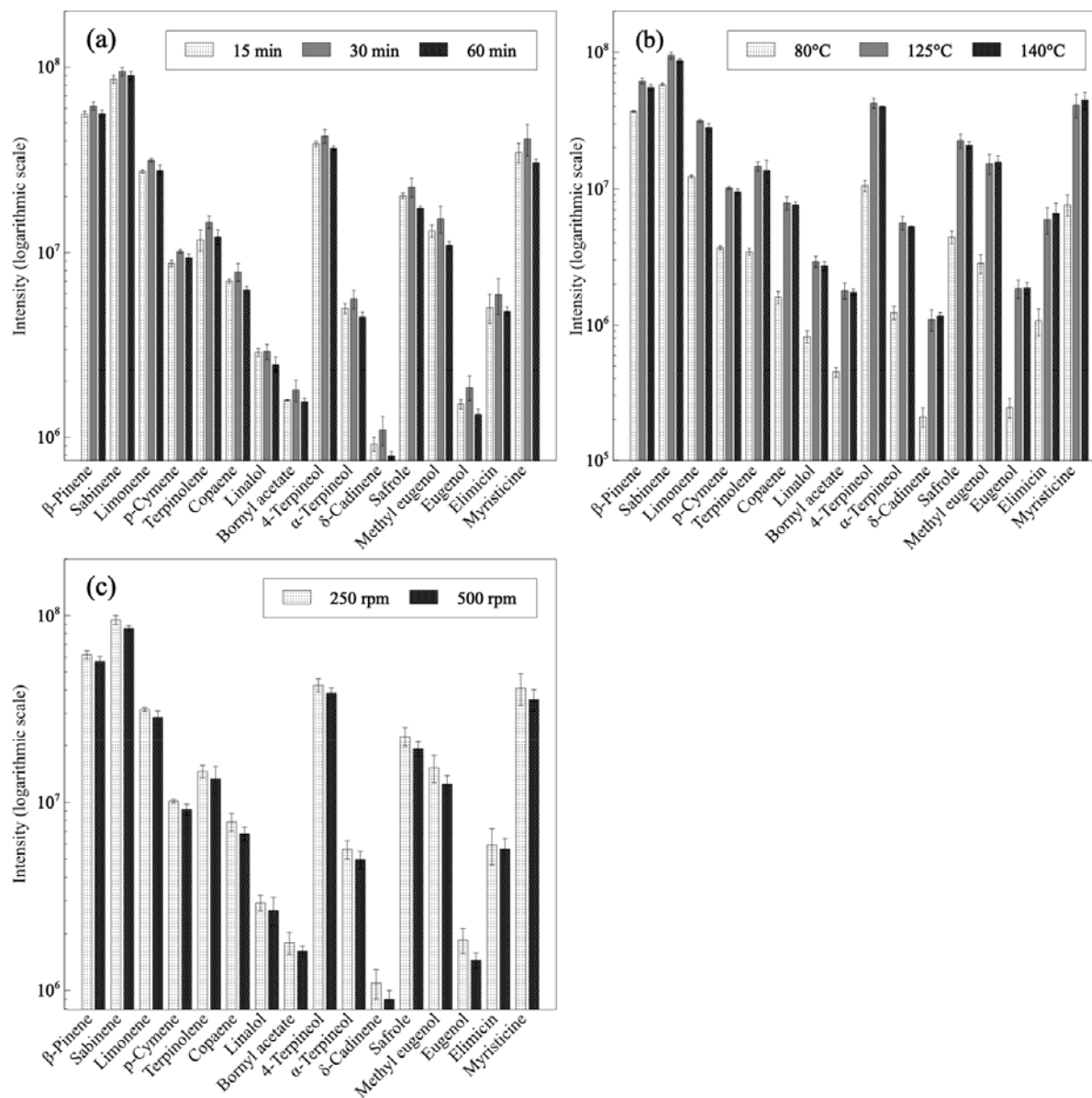


FIGURE III - 2 - The effect of extraction time (a), extraction temperature (b) and stirring speed (c) on the efficiencies of extraction of 16 characteristics terpenoids from nutmeg by headspace

#### III.1.4.2. Calibration

TABLE III - 1 shows the calibration parameters of standards for liquid injection, while TABLE III - 2 shows the ones for HS injections. The chemical structures of the 28 standards are shown in FIGURE III - 3. Most of the standards used for the calibration are monoterpenes or monoterpenoids, except for five which are sesquiterpenes: caryophyllene, (Z)- $\beta$ -farnesene, (E)- $\beta$ -farnesene,  $\alpha$ -farnesene and  $\alpha$ -humulene. For both methods (liquid and HS injection), the coefficients of determination ( $R^2$ )

were higher than 0.99, except for two standards, 3-carene (TABLE III - 1) and anethole (TABLE III - 2), but were still higher than 0.98. Those results show good linearity for the calibration of all standards.

Two linearity ranges were delimited for almost all standards, the method trueness was low when using only one calibration curve especially at low concentration (data not shown).

The slope value of the calibration curve's regression line was used to evaluate the calibration sensitivity for each standard which is different depending on molecular structure and on analysis method (liquid or HS injection). The three chemical forms of the sesquiterpene farnesene had the lowest calibration sensitivity for both methods. For HS injection, the terpenes with the lowest RI had the highest sensitivity ( $\alpha$ -pinene, camphene,  $\beta$ -pinene, 3-carene and limonene). The calibration sensitivity of those same compounds was at least four times lower for liquid injection. This can be explained by the downward linear relationship between saturation vapor pressure and retention index for terpenes [40]. Those compounds also had the lowest boiling points. For liquid injection, the opposite results can be observed: the terpenoids with the highest boiling points (thymol, eugenol, carvacrol) were the ones with the highest calibration sensitivity.

LOD and LOQ were calculated for each standard for both injection methods. For HS injection, those concentrations were evaluated in splitless mode to compare the sensibility of the two methods. For HS injection, LOD was between 0.00036  $\mu\text{g/g}$  ( $\alpha$ -pinene) and 1.29118  $\mu\text{g/g}$  ( $\alpha$ -farnesene), while for liquid injection it was between 0.007  $\mu\text{g/g}$  (carvacrol) and 4.872  $\mu\text{g/g}$  ( $\alpha$ -farnesene). The lowest LOD for HS injection was at least ten times lower than the one for liquid injection, that shows a better sensibility of the method. To prevent damaging the GC column and the MS, a split of 1:8 was applied when analyzing HS extracts of the food matrices. LOD and LOQ were then recalculated in split mode of 1:8 and the calibration curves were drawn above the LOQ values. These limits were in agreement with the results of the calibration sensitivity: the lower the LOD and LOQ, the higher the calibration sensitivity.

TABLE III - 1 - Calibration parameters of standards for liquid injection: retention index (RI), ion extracted from the TIC analysis, concentration ranges, slope of the linear calibration curve, coefficient of determination ( $R^2$ ), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

Compound	RI	Ion (m/z)	Linear range ( $\mu\text{g/g}$ )	Slope	$R^2$	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )
$\alpha$ -Pinene	1049	93	0.5-3	4755.6	0.9948	0.062	0.207
			3-100	4524.1	0.9999		
Camphene	1085	93	0.5-3	3576.8	0.9952	0.061	0.204
			3-100	5311.1	0.9913		
$\beta$ -Pinene	1119	93	0.5-3	2511.8	0.9995	0.105	0.350
			3-100	3467.7	0.9994		

3-Carene	1148	93	0.5-3	5387.2	0.9935	0.047	0.155
			3-100	4700.7	0.9834		
Limonene	1186	67	0.5-3	6735.2	0.9974	0.115	0.384
			3-100	6744.1	0.9969		
Eucalyptol	1202	138	0.1-3	3643.6	0.9999	0.022	0.074
			3-100	3580.8	0.9995		
P-Cymene	1258	119	0.1-3	25689.0	0.9995	0.019	0.063
			3-100	29208.0	0.9999		
Menthone	1481	138	0.5-3	18563.0	1	0.051	0.169
			3-50	20580.0	0.9999		
Camphor	1529	108	0.1-3	7238.9	0.9984	0.029	0.097
			3-100	7669.5	0.9957		
Linalol	1540	93	0.5-3	3915.7	0.9999	0.045	0.150
			3-100	4378.8	0.9999		
4-Terpineol	1595	71	0.5-3	5403.6	0.9992	0.041	0.136
			3-100	5762.7	0.9995		
Caryophyllene	1603	133	0.5-3	7269.8	0.9999	0.053	0.177
			3-100	8573.4	0.9977		
(Z)- $\beta$ -Farnesene	1620	133	3-50	937.2	0.9970	0.636	2.119
Pulegone	1638	151	0.5-3	6687.1	0.9974	0.012	0.039
			3-100	8736.4	0.9993		
(E)- $\beta$ -Farnesene	1646	133	5-50	1504.0	0.9954	0.916	3.052
Estragole	1657	117	0.5-3	6396.3	0.9987	0.050	0.165
			3-100	6510.0	0.9989		
$\alpha$ -Humulene	1667	146	0.5-3	5209.5	0.9990	0.043	0.142
			3-100	5804.9	0.9993		
$\alpha$ -Terpineol	1674	93	0.1-3	9883.0	0.9996	0.026	0.085
			3-100	10603.0	0.9996		
Borneol	1685	95	0.1-3	31515.0	0.9983	0.010	0.033
			3-100	33081.0	0.9991		
Citral	1717	136	0.5-3	784.3	0.9955	0.090	0.300
			3-100	1031.3	0.9991		
$\alpha$ -Farnesene	1729	133	25-50	286.9	0.9992	4.872	16.239
$\beta$ -Citronellol	1739	67	0.5-3	8759.6	0.9985	0.034	0.113
			3-100	9026.6	0.9994		
Cuminaldehyde	1793	105	0.5-3	7780.8	0.9998	0.041	0.137
			3-100	8448.7	0.9995		
Anethole	1827	117	0.5-3	7144.8	0.9994	0.029	0.096
			3-100	7765.5	0.9994		
Geraniol	1842	67	0.5-3	3672.6	0.9994	0.109	0.364
			3-100	3861.0	0.9987		
Thymol	2138	135	0.1-3	54342.0	0.9988	0.017	0.056

			3-100	57491.0	0.9991		
Eugenol	2159	163	0.1-3	38771.0	0.9999	0.010	0.032
			3-100	39329.0	0.9992		
Carvacrol	2167	135	0.5-3	47634.0	0.9988	0.007	0.022
			3-100	46242.0	0.9993		

TABLE III - 2 - Calibration parameters of standards for HS injection: retention index (RI), ion extracted from the TIC analysis, concentration ranges, slope of the linear calibration curve, coefficient of determination ( $R^2$ ), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

Compound	RI	Ion (m/z)	Linear range ( $\mu\text{g/g}$ )	Slope	$R^2$	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	LOD splitless ( $\mu\text{g/g}$ )
$\alpha$ -Pinene	1049	93	0.1-3	35741.0	0.9998	0.012	0.039	0.00036
			3-50	39508.0	0.9987			
Camphene	1085	93	0.1-3	41149.0	0.9993	0.005	0.017	0.00119
			3-50	39157.0	0.9996			
$\beta$ -Pinene	1119	93	0.1-3	17140.0	0.9976	0.013	0.042	0.00500
			3-50	19089.0	0.9996			
3-Carene	1148	93	0.1-3	14869.0	0.9962	0.016	0.052	0.00193
			3-50	16512.0	0.9997			
Limonene	1186	67	0.1-3	23149.0	0.9999	0.011	0.038	0.00589
			3-50	24310.0	0.9988			
Eucalyptol	1202	139	0.1-3	3748.8	0.9991	0.029	0.095	0.01405
			3-50	4203.8	0.9937			
P-Cymene	1258	119	0.1-3	34113.0	0.9967	0.006	0.021	0.00051
			3-50	37522.0	0.9996			
Menthone	1481	139	0.5-3	1151.7	0.9952	0.081	0.270	0.00798
			3-50	1288.8	0.9946			
Camphor	1529	108	3-50	3763.9	0.9982	0.180	0.600	0.00516
Linalol	1540	93	0.5-3	1277.9	0.9996	0.055	0.184	0.01517
			3-50	1338.2	0.9912			
4-Terpineol	1595	71	0.7-3	2265.6	0.9976	0.029	0.096	0.00237
			3-50	5030.3	0.9984			
Caryophyllene	1603	133	0.5-3	4799.5	0.9945	0.088	0.292	0.00380
			3-50	5097.2	0.9998			
(Z)- $\beta$ -Farnesene	1620	161	3-50	288.4	0.9997	0.697	2.323	0.37752
Pulegone	1638	152	0.5-3	1079.5	0.9986	0.114	0.380	0.00235
			3-50	1909.9	0.9927			
(E)- $\beta$ -Farnesene	1646	161	3-50	542.6	0.9989	0.403	1.344	0.31561
Estragole	1657	148	0.5-3	3884.4	0.9956	0.035	0.116	0.00203

			3-50	4405.6	0.9990			
$\alpha$ -Humulene	1667	147	0.5-3	6811.0	0.9988	0.038	0.126	0.00714
			3-50	6758.3	0.9977			
$\alpha$ -Terpineol	1674	93	0.5-3	1875.1	0.9917	0.060	0.201	0.00415
			3-50	4006.9	0.9966			
Borneol	1685	95	0.7-3	2265.6	0.9976	0.037	0.122	0.00157
			3-50	8379.1	0.9987			
Citral	1717	137	3-50	995.4	0.9981	0.318	1.061	0.00349
$\alpha$ -Farnesene	1729	161	3-50	556.1	0.9994	0.617	2.056	1.29118
$\beta$ -Citronellol	1739	67	3-50	4379.0	0.9995	0.148	0.492	0.02831
Cuminaldehyde	1793	133	3-50	2919.4	0.9928	0.285	0.949	0.02678
Anethole	1827	117	0.5-3	1622.4	0.9996	0.133	0.445	0.02108
			3-50	2737.7	0.9886			
Geraniol	1842	69	3-50	2144.7	0.9901	0.270	0.949	0.00668
Thymol	2138	135	0.1-3	12969.0	0.9999	0.024	0.079	0.00755
			3-50	21081.0	0.9904			
Eugenol	2159	164	0.7-3	1511.3	0.9994	0.155	0.518	0.00218
			3-50	1457.9	0.9997			
Carvacrol	2167	135	0.5-3	14355.0	0.9957	0.037	0.123	0.00691
			3-50	16151.0	0.9968			

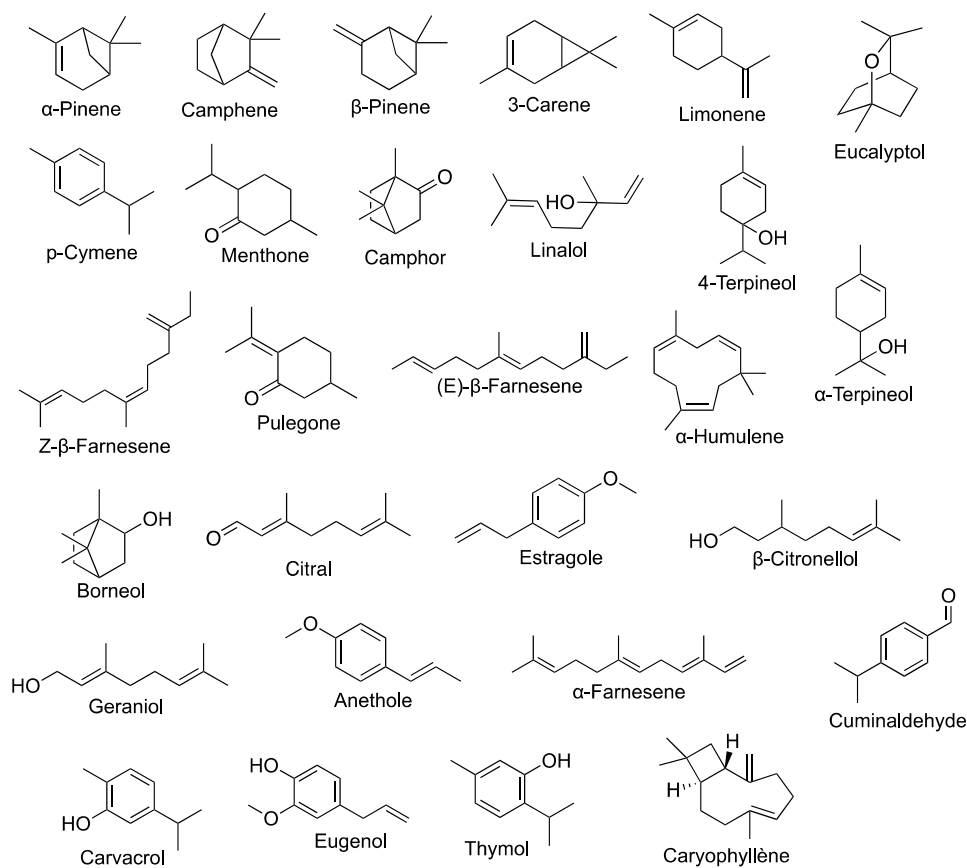


FIGURE III - 3 - Structures of the 28 standards used for the quantification analysis

### III.1.4.3. Analysis of the food extracts

#### III.1.4.3.1. Qualitative analysis

TABLE III - 3 shows the compounds identified and quantified (if possible) in nutmeg extracts obtained by the three different extraction methods: HS, hydrodistillation and PLE. TABLE III - 4 resumes the results obtained for thyme extracts and TABLE III - 5 the ones obtained for orange peels extracts. The analysis of clove, cumin, cinnamon and fennel seeds extracts obtained with those same extraction methods are presented in the appendix. Almost all identified compounds were terpenes and terpenoids, but some alkanes (hexanal, octanal... in orange peels) or alcohols (furanmethanol in thyme) were also extracted. Forty compounds were extracted from nutmeg by HS extraction, while only nine were extracted by hydrodistillation and fifteen by PLE. HS extraction allowed to extract the most compounds from nutmeg separating a wide range of terpenoids (FIGURE III - 4). This result was also true for the other food matrices studied: thirty-seven compounds (resp. forty) were extracted by HS from thyme (resp. orange peels), against twelve (resp. nine) by hydrodistillation and nineteen (resp. fifteen) by PLE. The only exception was for the fennel seeds, PLE was the extraction method which extracted the most compounds (nine, against five by HS and four by hydrodistillation). When preparing the PLE extraction cell for fennel, the seeds were crushed which might have facilitated the extraction of certain compounds. The chemical difference observed in the different extracts obtained with the different extraction methods can be explained by the fact that hydrodistillation and PLE techniques are based on the liquid extraction of volatiles while HS extraction relies on a solid/gas equilibrium. As a result, some compounds were identified only in the essential oil obtained by hydrodistillation (3-carene and geraniol in thyme, eucalyptol and terpinolene in orange peels, trans- $\alpha$ -bergamotene and  $\beta$ -citronellol in nutmeg...), others were found only in PLE extracts (2-furanmethanol in thyme, limonene oxide and borneol in orange peels and 1-terpineol in nutmeg...) whereas the HS extracts contained most of the compounds. For almost all the matrices, one main terpenoid was found in the extracts obtained with the different extraction methods regarding the area percentage of the compound: limonene for orange peels, estragole for fennel seeds, cuminaldehyde for cumin, eugenol for clove, cinnamaldehyde for cinnamon. It was not the case for the thyme or nutmeg extracts where the majority compound was not the same in the HS extract than in the hydrodistillation and PLE extracts (FIGURE III - 4). This can be explained by the difference of sensibility between the analytical methods for the same compound. The main compound of the nutmeg extract obtained by HS was sabinene (14.739% against 1.814% and 0.441% for hydrodistillation and PLE extracts respectively) which has a low boiling point and according to 3.2 should have a high sensibility for HS injection and lower for liquid injection.



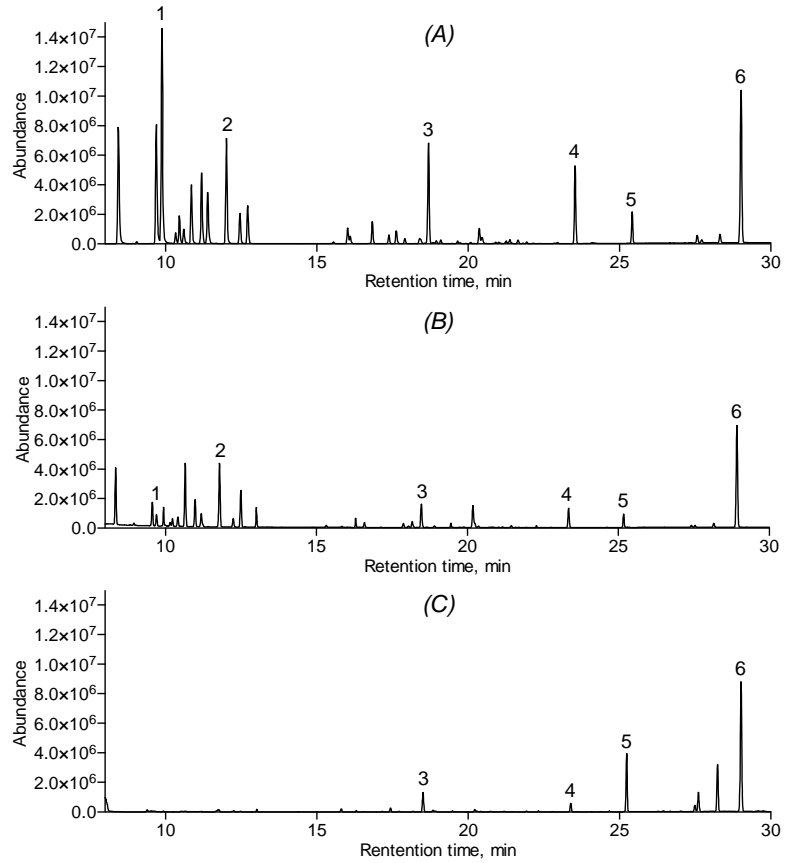


FIGURE III - 4 - GC/MS total ion chromatograms for nutmag extracts obtained by HS extraction (A), hydrodistillation (B) and PLE (C). (1) Sabinene; (2)  $\gamma$ -Terpinene; (3) 4-Terpineol; (4)  $\alpha$ -Terpineol; (5) Safrole; (6) Methyl eugenol; (7) Myristicine

TABLE III - 3 - Chemical composition of nutmeg extracts obtained using three extraction procedures. Qualitative and quantitative analysis

Compound	RI <sup>a</sup>	HS			Hydrodistillation			PLE		
		Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD <sup>b</sup> (%)	Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD (%)	Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD (%)
α-Pinene	1049	8.93	6516	3	8.89	53841	13	- <sup>c</sup>	-	-
α-Fenchene	1080	0.02	-	-	0.37	-	-	-	-	-
Camphene	1085	0.13	135	2	-	-	-	-	-	-
β-Pinene	1119	8.72	13674	5	3.84	5595	14	0.60	80	21
Sabinene	1128	14.74	-	-	1.81	-	-	0.44	-	-
3-Carene	1148	0.63	5804	2	1.22	3587	15	-	-	-
Myrcene	1157	1.80	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Phellandrene	1164	1.33	-	-	1.58	-	-	-	-	-
4-Carene	1176	4.50	-	-	10.33	-	-	-	-	-
Limonene	1186	4.93	4030	4	4.68	8104	22	0.17	9	25
Eucalyptol	1200	-	-	-	2.56	563	13	0.06	2.3	31.04
β-Phellandrene	1209	4.08	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Ocimene	1225	0.01	-	-	-	-	-	0.62	-	-
γ-Terpinene	1240	7.69	-	-	10.72	-	-	-	-	-
p-Cymene	1258	2.15	3985	1	1.45	828	13	0.48	12	24
Terpinolene	1278	2.87	-	-	6.20	-	-	0.28	-	-
α-Cubebene	1469	0.52	-	-	0.18	-	-	-	-	-
Copaene	1512	1.56	-	-	0.79	-	-	0.08	-	-
Linalol	1540	0.61	6404	9	0.03	39	12	0.14	9	43
1-Terpineol	1544	-	-	-	-	-	-	1.01	-	-
trans-α-Bergamotene	1582	-	-	-	1.10	-	-	-	-	-
Bornyl acetate	1583	0.62	-	-	-	-	-	0.26	-	-
4-Terpineol	1595	7.26	20590	10	4.30	5026	14	5.65	193	40

Caryophyllene	1603	0.06	211	9	-	-	-	0.06	1.0	22.67
(E)- $\beta$ -Farnesene	1646	0.07	1088	0.5	0.01	505	6	-	-	-
Estragole	1657	0.03	57	6	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Humulene	1667	0.02	24	19	0.12	13	19	-	-	-
$\alpha$ -Terpineol	1674	1.12	5478	9	4.53	2937	14	0.69	15	43
Borneol	1685	0.53	384	2	0.21	259	13	0.07	0.5	36.42
$\gamma$ -Muurolene	1716	0.11	-	-	-	-	-	-	-	-
trans-Piperitol	1728	0.16	-	-	-	-	-	-	-	-
Geranyl acetate	1735	0.29	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Citronellol	1739	-	-	-	0.11	<LOQ	-	-	-	-
$\delta$ -Cadinene	1757	0.26	-	-	0.32	-	-	0.06	-	-
Geraniol	1842	0.04	481	4	-	-	-	<0.01	<LOQ	-
p-Cymen-8-ol	1849	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-
Safrole	1880	5.38	-	-	3.25	-	-	2.33	-	-
Methyl Eugenol	2015	2.17	-	-	2.02	-	-	14.67	-	-
Eugenol	2159	0.56	24872	4	0.45	26	30	1.95	13	25
Isoeugenol methyl ether	2143	0.24	-	-	-	-	-	-	-	-
Carvacrol	2167	0.06	105	3	0.01	7	20	0.12	0.94	4.95
Elemicin	2184	0.71	-	-	-	-	-	-	-	-
Myristicin	2236	11.91	-	-	19.37	-	-	39.19	-	-
trans-Isoeugenol	2307	0.14	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Retention Index

<sup>b</sup> Relative Standard Deviation

<sup>c</sup> Not detected or not quantified

TABLE III - 4 - Chemical composition of thyme extracts obtained using three extraction procedures. Qualitative and quantitative analysis

Compound	RI <sup>a</sup>	HS			Hydrodistillation			PLE		
		Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD <sup>b</sup> (%)	Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD (%)	Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD (%)
$\alpha$ -Thujene	1037	0.13	- <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Pinene	1049	1.42	463	17	-	-	-	-	-	-
Camphene	1085	2.51	716	18	<0.01	141	12	0.15	7	20
$\beta$ -Pinene	1119	0.15	115	29	-	-	-	-	-	-
3-Carene	1148	-	-	-	<0.01	86	10	-	-	-
$\alpha$ -Phellandrene	1164	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-
4-carene	1176	0.18	-	-	-	-	-	-	-	-
Limonene	1186	0.41	174	10	<0.01	27	11	0.47	9	23
Eucalyptol	1200	<0.01	16	6	-	-	-	<0.01	0.3	42
$\beta$ -Phellandrene	1209	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-
$\gamma$ -Terpinene	1240	0.45	-	-	4.86	-	-	0.15	-	-
p-Cymene	1258	1.00	494	16	21.93	1160	4	0.81	9	36
Terpinolene	1278	0.13	-	-	-	-	-	0.17	-	-
Ylangene	1501	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-
Copaene	1512	0.28	-	-	-	-	-	-	-	-
Camphor	1529	1.22	411	8	-	-	-	0.78	2.1	6
Linalol	1540	1.22	3594	22	3.91	433	4	0.78	19	17
$\alpha$ -Gurjunene	1547	0.11	-	-	-	-	-	-	-	-
Isopulegone	1567	0.53	-	-	-	-	-	-	-	-
Bornyl acetate	1583	1.59	-	-	-	-	-	0.88	-	-
Thymol methyl ether	1594	1.22	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Terpineol	1595	0.75	991	2	-	-	-	0.52	8	24

Caryophyllene	1603	2.74	1725	10	2.31	91	5	1.17	8.9	6
2-Furanmethanol	1627	-	-	-	-	-	-	0.06	-	-
(E)- $\beta$ -Farnesene	1646	0.15	679	14	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Humulene	1667	0.16	74	11	-	-	-	0.08	0.59	12
$\alpha$ -Terpineol	1674	11.81	14820	13	0.77	72	5	8.21	81	19
Borneol	1685	33.79	51012	13	0.58	37	3	20.50	229	45
$\gamma$ -Muurolene	1716	0.06	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Farnesene	1729	0.36	341	10	-	-	-	-	-	-
$\delta$ -Cadinene	1757	0.72	-	-	-	-	-	0.25	-	-
$\gamma$ -Cadinene	1767	0.49	-	-	-	-	-	-	-	-
Geraniol	1842	-	-	-	0.31	49	8	-	-	-
Calamenene	1850	0.23	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Calacorene	1940	0.07	-	-	-	-	-	-	-	-
Caryophyllene oxide	2017	0.23	-	-	-	-	-	1.21	-	-
Cubenol	2074	0.06	-	-	-	-	-	-	-	-
Thymol	2138	10.64	11908	11	30.85	1094	5	13.14	48	19
Carvacrol	2167	17.05	25886	23	30.31	1023	5	21.95	118	19
T-Cadinol	2172	0.33	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Retention Index

<sup>b</sup> Relative Standard Deviation

<sup>c</sup> Not detected or not quantified

TABLE III - 5 - Chemical composition of orange peels extracts obtained using three extraction procedure. Qualitative and quantitative analysis

Compound	RI <sup>a</sup>	HS			Hydrodistillation			PLE		
		Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD <sup>b</sup> (%)	Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD (%)	Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD (%)
α-Pinene	1049	0.36	8	25	- <sup>c</sup>	-	-	-	-	-
Camphene	1085	0.01	0.09	22	-	-	-	0.17	<LOQ	-
Hexanal	1093	0.07	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Pinene	1119	0.02	1.2	21	0.12	44	3	1.14	3.3	24
Sabinene	1128	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-
3-Carene	1148	0.02	0.5	23	1.16	325	26	-	-	-
Myrcene	1157	1.30	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Phellandrene	1164	0.03	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Terpinene	1174	0.07	-	-	-	-	-	-	-	-
Limonene	1186	91.52	2235	11	76.71	1628	5	29.56	31	14
Eucalyptol	1200	-	-	-	2.04	81	9	-	-	-
β-Phellandrene	1209	0.35	-	-	-	-	-	-	-	-
γ-Terpinene	1240	0.14	-	-	-	-	-	0.16	-	-
p-Cymene	1258	0.05	1.9	15	<0.01	<LOQ	-	-	-	-
Octanal	1275	0.28	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpinolene	1278	-	-	-	2.24	-	-	-	-	-
Prenol	1302	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Hexanol	1339	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
cis-4-Hexenol	1372	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
Nonanal	1378	0.06	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalool oxide	1445	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
Limonene oxide	1457	-	-	-	-	-	-	0.11	-	-

Furfural	1461	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Cubebene	1469	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
Citronellal	1480	0.01	-	-	-	-	-	0.57	-	-
Copaene	1512	0.15	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalool	1540	1.73	783	8	-	-	-	0.61	0.7	30
5-Methylfurfural	1569	-	-	-	-	-	-	0.25	-	-
$\beta$ -Elemene	1591	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Terpineol	1595	0.18	13	11	0.17	15	17	0.37	0.43	20
Caryophyllene	1603	0.09	4.2	20	-	-	-	-	-	-
2-Furanmethanol	1627	-	-	-	-	-	-	1.36	-	-
(E)- $\beta$ -Farnesene	1646	0.02	7.0	17	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Humulene	1667	<0.01	0.9	16	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Terpineol	1674	0.62	79	20	2.22	260	5	29.15	18.0	7
Borneol	1685	-	-	-	-	-	-	0.16	0.016	25
$\alpha$ -Amorphene	1708	0.03	-	-	-	-	-	-	-	-
Valencene	1712	0.82	-	-	-	-	-	-	-	-
Carvone	1715	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Citronellol	1739	0.07	9	23	-	-	-	0.17	0.11	25
$\delta$ -Cadinene	1757	0.23	-	-	-	-	-	-	-	-
Nerol	1785	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-
trans-Carveol	1827	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-
Geraniol	1842	0.05	15	21	-	-	-	0.11	<LOQ	-
$\alpha$ -Calacorene	1940	<0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
Nerolidol	2020	<0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
Eugenol	2159	<0.01	0.8	21	1.86	21	28	1.17	<LOQ	-

<sup>a</sup> Retention Index

<sup>b</sup> Relative Standard Deviation

<sup>c</sup> Not detected or not quantified

### III.1.4.3.2. Quantitative analysis

Only the terpenoids of which we had the standard were quantified using their respective calibration curves. The results for the quantitative analysis were calculated for extracts obtained from 1 g of matrix for all the extraction methods. The most concentrated extract was obtained by HS extraction for most of the matrices studied. Only the concentration of limonene was higher in the essential oil of orange peels obtained by hydrodistillation ( $18628 \pm 1013 \mu\text{g/g}$ ) than in the HS extract ( $2235 \pm 236 \mu\text{g/g}$ ). In this case, hydrodistillation had the best selectivity for limonene as the essential oil contained mostly this compound. Overall, the extracts obtained by PLE were the most diluted. The fact that a large volume (20 mL) of extract was produced by this technique can explain this result: the extract could not be dried and concentrated as all the volatiles were lost during the drying process (data not shown). It was the same for hydrodistillation. HS extraction process was different. The volatiles were never diluted in a solvent but directly extracted from the gas above the solid which can explain the highly-concentrated extract obtained with this method. The quantitative analysis allowed to obtain more information on the chemical composition of the extract. For example, in the HS nutmeg extract, borneol and eugenol had the same peak area value but the concentration of eugenol ( $24872 \pm 1084 \mu\text{g/g}$ ) was almost 11 times higher than the concentration of borneol ( $2235 \pm 7 \mu\text{g/g}$ ) in this same extract (TABLE III - 3). This analysis allows to compare the extracts in terms of quantity as the area percentage is not accurate enough.

The relative standard deviation (RSD%) of the compound's concentration was used to evaluate the reproducibility of the extraction method. HS extraction had the highest reproducibility as almost all the RSD for all compounds and matrices were lower than 20%. PLE was the less reproducible, the RSD were as high as 60% for some compounds

### III.1.5. Conclusions

The chemical composition of the food extracts obtained by HS, hydrodistillation and PLE extraction was different in terms of qualitative and quantitative analysis. Liquid extraction methods (PLE and hydrodistillation) share similarities whereas HS extraction allows to extract more terpenoids. Amongst the three extraction methods, HS is the one which was the most sensitive and had the highest extraction efficiency. HS is a simpler, faster and solvent-free method which allows a qualitative and quantitative analysis of terpenoids using a small quantity of food material and no sample preparation needed. Hydrodistillation is a time-consuming method and consumes large amounts of material but is selective and allows to obtain a concentrated essential oil rich in one main compound. PLE is also a rapid method which can be carried out at higher temperature and pressure, but the extracts obtained are more diluted and contain fewer volatile compounds. Furthermore, HS is considered as a green method compared to hydrodistillation and PLE as no solvent at all is used for the extraction.



GC-MS and the use of standards allowed to estimate low concentrations of many terpenoids in different matrices for each extraction method. Quantitative analysis is in most cases conducted on no more than ten compounds of interest [41–43]. In this study, the quantitative analysis was done with 28 terpenoids standards, which allows to emphasize the fact that each terpene, and in general each molecule, responds differently to the extraction procedure but also to the analysis procedure. It shows the importance of conducting a quantitative analysis instead of a semi-quantitative analysis.

#### *III.1.6. Acknowledgements*

This work has been financially supported by “Association Nationale Recherche Technologie” with the CIFRE Contract n°2016/0447. The authors thank Twistaroma for the use of their RI database.

## III.1.7. Appendix

TABLE III - 6 - Chemical composition of clove extracts obtained using three extraction procedure. Qualitative and quantitative analysis

Compound	RT <sup>a</sup>	Headspace			Hydrodistillation			PLE		
		Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD <sup>b</sup> (%)	Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD (%)	Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD (%)
3-Carene	1148	- <sup>c</sup>	-	-	0.12	474	18	-	-	-
Limonene	1186	<0.01	4.0	12.5	0.14	241	24	<0.01	<LOQ	-
Eucalyptol	1200	<0.01	6	0	0.16	159	23	<0.01	<LOQ	-
p-Cymene	1258	<0.01	2.5	20	0.46	230	19	<0.01	1.5	47
2-Nonanone	1387	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
Furfural	1461	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
Ylangene	1501	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
Copaene	1512	0.52	-	-	0.45	-	-	0.03	-	-
Linalol	1540	0.01	143	5	<0.01	19	25	-	-	-
4-Terpineol	1595	-	-	-	-	-	-	<0.01	1.9	12
Caryophyllene	1603	20.59	51838	3	14.76	4267	18	2.641	261	25
(Z)-β-Farnesene	1620	0.04	853	3	0.16	912	4	-	-	-
(E)-β-Farnesene	1646	0.04	608	7	0.31	1293	5	-	-	-
Estragole	1657	-	-	-	0.16	<LOQ	-	-	-	-
α-Humulene	1667	2.05	3495	3	2.06	1373	12	0.33	42	27
Borneol	1685	0.15	185	16	-	-	-	<0.01	0.2	68
α-Farnesene	1729	-	-	-	0.27	1608	21	-	-	-
δ-Cadinene	1757	0.37	-	-	0.51	-	-	0.059	-	-
γ-Cadinene	1767	0.07	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl salicylate	1784	0.14	-	-	-	-	-	-	-	-
Cuminaldehyde	1793	0.08	679	4	-	-	-	0.11	8	53

Anethole	1827	0.01	84	17	-	-	-	-	-	-
Calamenene	1850	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzyl alcohol	1878	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Calacorene	1940	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
Caryophyllene oxide	2017	0.12	-	-	-	-	-	0.35	-	-
Eugenol	2159	68.09	1919841	3	73.57	13466	16	79.17	3565	3
Carvacrol	2167	<0.01	23	4	-	-	-	-	-	-
Eugenyl acetate	2216	5.72	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Retention Index

<sup>b</sup> Relative Standard Deviation

<sup>c</sup> Not detected or not quantified

TABLE III - 7 - Chemical composition of cumin extracts obtained using three extraction procedure. Qualitative and quantitative analysis

Compound	RI <sup>a</sup>	Headspace			Hydrodistillation			PLE		
		Peak area (%)	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	RSD <sup>b</sup> (%)	Peak area (%)	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	RSD (%)	Peak area (%)	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	RSD (%)
$\alpha$ -Pinene	1049	<0.01	5	0	- <sup>c</sup>	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Fenchene	1080	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-
Camphene	1085	-	-	-	-	-	-	0.16	6.1	6
$\beta$ -Pinene	1119	0.09	31	7	-	-	-	-	-	-
Limonene	1186	<0.01	5.0	10	-	-	-	<0.01	<LOQ	-
Eucalyptol	1200	<0.01	6.0	8.33	<0.01	38	7	<0.01	0.34	0
$\beta$ -Ocimene	1225	-	-	-	-	-	-	1.62	-	-
$\gamma$ -Terpinene	1240	4.27	-	-	5.59	-	-	1.42	-	-
p-Cymene	1258	2.07	483	1	5.18	427	15	2.14	19	7
Copaene	1512	0.91	-	-	-	-	-	-	-	-

Linalol	1540	0.07	147	11	-	-	-	<0.01	0.7	65
p-Mentadien-7-ol	1573	1.38	-	-	1.39	-	-	-	-	-
Trans- $\alpha$ -bergamotene	1582	0.36	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Terpineol	1595	0.15	133	2	0.11	12	28	0.10	1.3	27
Caryophyllene	1603	0.71	220	5	0.17	-	-	0.19	0.9	17
(E)- $\beta$ -Farnesene	1646	0.87	1625	8	0.17	436	5	-	-	-
diepi- $\alpha$ -Cedrene	1655	1.89	-	-	0.58	-	-	-	-	-
Estragole	1657	0.16	39	8	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Humulene	1667	0.13	16	6	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Terpineol	1674	0.18	166	6	-	-	-	-	-	-
Germacrene D	1690	0.48	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Himachalene	1713	0.27	-	-	-	-	-	-	-	-
Phellandral	1719	0.41	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Chamigrene	1734	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Curcumene	1772	0.11	-	-	-	-	-	-	-	-
Cuminaldehyde	1793	71.82	84508	5	69.38	3661	16	57.71	633	5
Myrtenal	1810	4.84	-	-	6.08	-	-	6.63	-	-
Anethole	1827	0.09	69	12	-	-	-	-	-	-
Carotol	2040	0.71	-	-	-	-	-	-	-	-
Cuminic alcohol	2076	1.69	-	-	-	-	-	-	-	-
Thymol	2138	0.24	80	8	-	-	-	-	-	-
Carvacrol	2167	0.43	213	4	0.50	18	19	2.21	5.9	14

<sup>a</sup> Retention Index

<sup>b</sup> Relative Standard Deviation

<sup>c</sup> Not detected or not quantified

TABLE III - 8 - Chemical composition of cinnamon extracts obtained using three extraction procedure. Qualitative and quantitative analysis

Compound	RI <sup>a</sup>	Headspace			Hydrodistillation			PLE		
		Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD <sup>b</sup> (%)	Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD (%)	Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD (%)
α-Pinene	1049	<0.01	<LOQ	- <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-
Limonene	1186	-	-	-	0.05	<LOQ	-	-	-	-
Eucalyptol	1200	0.07	35	10	1.06	33	9	0.12	5	39
p-Cymene	1258	-	-	-	0.11	0.96	6	0.02	0.5	41
Terpinolene	1278	-	-	-	0.11	-	-	-	-	-
Copaene	1512	2.41	-	-	0.47	-	-	0.21	-	-
Camphor	1529	-	-	-	<0.01	0.8	17	-	-	-
Linalol	1540	0.07	64	18	-	-	-	-	-	-
α-Bergamotene	1571	0.24	-	-	0.14	-	-	0.03	-	-
Bornyl acetate	1583	0.65	-	-	1.33	-	-	-	-	-
β-Elemene	1591	0.11	-	-	0.20	-	-	-	-	-
4-Terpineol	1595	0.17	190	8	0.09	5.6	9	0.09	1.8	40
Caryophyllene	1603	0.80	271	19	0.16	-	-	0.10	1.8	12
α-Humulene	1667	0.29	55	7	0.11	1.5	9	0.03	0.4	25
α-Terpineol	1674	0.30	308	25	0.56	9.0	7	0.18	3	32
Borneol	1685	0.56	556	15	0.84	16	8	0.10	2.1	31
γ-Murolene	1716	1.52	-	-	-	-	-	-	-	-
δ-Cadinene	1757	2.15	-	-	1.10	-	-	0.30	-	-
γ-Cadinene	1767	0.03	-	-	-	-	-	-	-	-
Calamenene	1850	1.48	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Calacorene	1940	0.45	-	-	-	-	-	-	-	-
Cinnamaldehyde	2030	77.98	-	-	81.64	-	-	90.82	-	-

Cubenol	2074	0.70	-	-	-	-	-	-	-	-
T-Muurool	2162	0.64	-	-	-	-	-	-	-	-
Carvacrol	2167	-	-	-	-	-	-	<0.01	0.18	17

<sup>a</sup> Retention Index

<sup>b</sup> Relative Standard Deviation

<sup>c</sup> Not detected or not quantified

TABLE III - 9 - Chemical composition of fennel seeds extracts obtained using three extraction procedure. Qualitative and quantitative analysis

Compound	RI <sup>a</sup>	Headspace			Hydrodistillation			PLE		
		Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD <sup>b</sup> (%)	Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD (%)	Peak area (%)	Concentration (µg/g)	RSD (%)
α-Pinene	1049	<0.01	<LOQ	-	-	-	-	-	-	-
Limonene	1186	1.96	2	0	6.57	413	4	2.06	25	7
Eucalyptol	1200	-	-	-	-	-	-	0.37	2.6	14
p-Cymene	1258	-	-	-	<0.01	9.3	4	0.21	1.4	11
Fenchone	1448	-	-	-	-	-	-	1.47	-	-
Caryophyllene	1603	-	-	-	-	-	-	0.11	<LOQ	-
Estragole	1657	87.09	894	18	88.12	3008	3	66.96	325	13
Carvone	1715	4.08	-	-	-	-	-	-	-	-
Anethole	1827	1.11	<LOQ	-	0.77	25	4	0.66	2.3	41
Eugenol	2159	-	-	-	-	-	-	15.18	15.4	6
Carvacrol	2167	-	-	-	-	-	-	0.25	1.0	69

<sup>a</sup> Retention Index

<sup>b</sup> Relative Standard Deviation

<sup>c</sup> Not detected or not quantified

## III.2. RESULTATS PRELIMINAIRES SUR L'EXTRACTION PAR SORPTION DANS L'ESPACE DE TETE (HSSE)

L'optimisation des conditions d'extraction de l'HSSE a été réalisée par plan d'expériences. De nombreux paramètres peuvent jouer sur l'efficacité de l'extraction à savoir le temps d'extraction, la température d'extraction, l'agitation, la masse de l'échantillon, l'ajout ou non de solvant d'extraction, le temps de désorption ainsi que le solvant de désorption. Cependant, lors de l'élaboration du plan d'expérience il est conseillé de limiter au minimum le nombre de facteur étudiés. Ainsi un premier criblage des différents paramètres a été réalisé afin de cibler ceux utilisés pour réaliser le plan d'expérience. De plus il a été considéré que le processus d'extraction et le processus de désorption liquide du barreau sont indépendants l'un de l'autre. Les différents paramètres de désorption n'ont donc pas été inclus dans le plan d'expérience mais ont quand même été optimisés. L'aire relative (par rapport à celle d'un étalon interne) de 28 terpènes volatils caractéristiques de la muscade ont été calculées et comparées pour étudier l'influence de la variation des différents paramètres sur l'efficacité de l'extraction. L'étalon interne utilisé est le menthyle acétate à une concentration finale de 10 ppm, il est ajouté au flacon contenant l'extrait après l'étape de désorption. L'étalon interne permet ainsi de s'affranchir de toutes variations potentielles dues à la GC-MS.

### III.2.1. Les paramètres d'extraction de l'HSSE

La température d'extraction ainsi que le temps d'extraction étant des facteurs ayant une forte influence sur l'efficacité de l'extraction et plus particulièrement sur les extractions des composés volatils dans l'espace de tête, ces deux paramètres ont été sélectionnés pour l'étude par plan d'expérience sans résultats préliminaires. L'influence de l'ajout ou non de solvant d'extraction ainsi que celle de l'agitation de l'échantillon sur l'efficacité de l'extraction ont été étudiées avant l'élaboration du plan d'expérience.

- L'ajout d'un solvant d'extraction avec l'échantillon

Pour une extraction d'un échantillon solide par HSSE, il existe deux possibilités pour l'introduction de l'échantillon dans le flacon d'extraction. Soit il est disposé directement dans le flacon, soit il est mélangé avec un solvant. Pour des échantillons liquides, il a été démontré que le volume de l'échantillon peut avoir une influence sur l'efficacité de l'extraction par HSSE [44]. L'effet d'un ajout de solvant en HSSE n'a jamais été étudié précédemment, les échantillons solides sont utilisés tels quels sauf dans certain cas pour diminuer la viscosité de l'échantillon par exemple [45]. Dans une étude d'extraction par HS il a été montré que l'ajout d'un solvant permet d'augmenter la sensibilité de l'extraction [46]. Dans notre étude, l'extraction sur l'échantillon « sec » a été comparé à une extraction

sur échantillon « mouillé » en ajoutant 2 mL de trois solvants différents, à savoir l'eau, un mélange 70/30 eau/méthanol et une solution saline de NaCl à 4 M. La FIGURE III - 5 montre que l'ajout d'un solvant n'a pas d'influence significative sur l'extraction des terpènes volatils dans la muscade. L'extraction sur échantillon « sec » permet une légère augmentation de la sensibilité d'extraction pour les terpènes volatils à faible masse moléculaire, jusqu'au terpinolène (M = 136,24 g/mol). A la suite de ces premiers résultats, toutes les extractions par HSSE ont été réalisées sans traitement ni dissolution de l'échantillon au préalable.

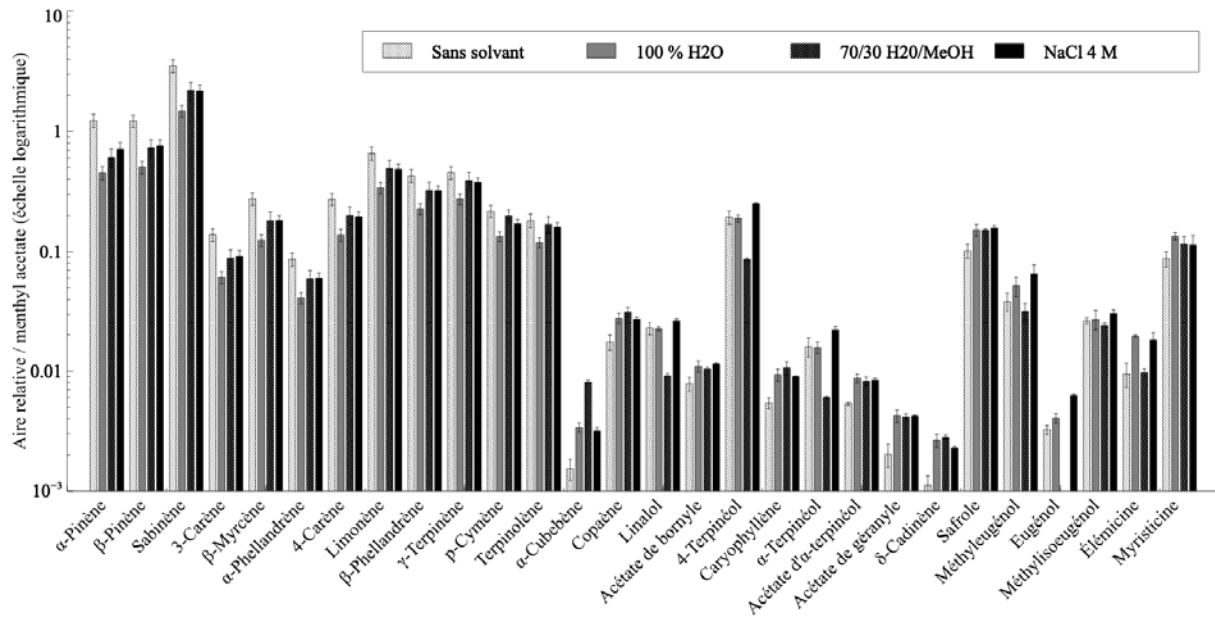


FIGURE III - 5 - Influence de l'ajout ou non d'un solvant d'extraction sur l'extraction des terpènes volatils dans la muscade par HSSE (80 mg de muscade, 1 heure d'extraction à 40 °C sous agitation à 250 rpm, 30 min de désorption dans 100 µL d'éthanol)

- La vitesse d'agitation

L'agitation de l'échantillon lors d'extraction par des techniques dans l'espace de tête permet de favoriser la libération des composés dans l'espace de tête [44]. Deux vitesses d'agitation ont été comparées dans cette étude pour l'extraction de terpènes volatils dans la muscade par HSSE : 250 et 500 rpm (FIGURE III - 6). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux vitesses d'agitation quelle que soit la molécule extraite. Pour la suite, la vitesse d'agitation choisie est de 250 rpm.



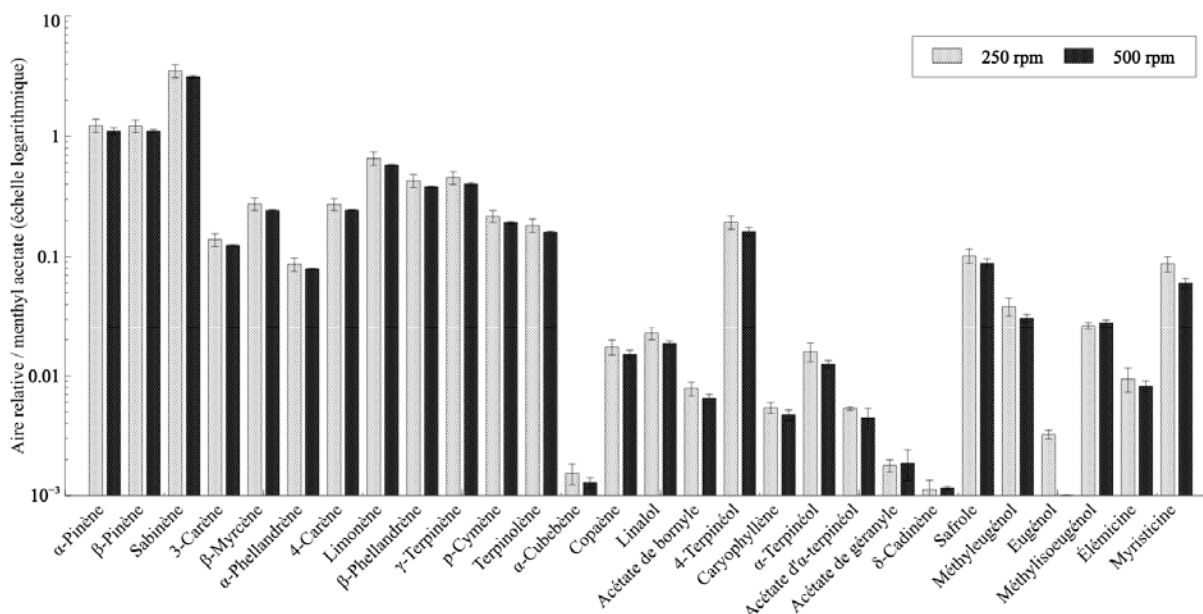


FIGURE III - 6 - Influence de la vitesse d'agitation sur l'extraction des terpènes volatils dans la muscade par HSSE (80 mg de muscade, 1 heure d'extraction à 40 °C, 30 min de désorption dans 100  $\mu$ L d'éthanol)

### III.2.2. Les paramètres de désorption du barreau

Le processus de désorption est indépendant du processus d'extraction. Les deux paramètres majeurs qui entrent en jeu dans cette étape sont la nature du solvant de désorption ainsi que le temps de désorption. Le volume de solvant utilisé (100  $\mu$ L) n'a pas été varié car il correspond au plus petit volume permettant l'immersion complète du barreau.

- Le temps de désorption

Le temps de désorption est un paramètre important, il doit être suffisamment long pour permettre une désorption maximum des composés absorbés sur le barreau mais aussi suffisamment court pour bénéficier d'une méthode d'extraction globale plutôt rapide. Le temps de désorption a été augmenté progressivement de 15 min à 60 min (FIGURE III - 7). Une augmentation du temps de désorption de 15 à 30 min permet d'obtenir une meilleure désorption des différents composés, l'aire relative de la plupart des composés augmente. Cependant, au-delà d'un temps de désorption de 30 min, les réponses des différents composés n'augmentent pas, c'est-à-dire que la concentration des composés des solutions n'augmente pas. Il a donc été considéré que 30 min de désorption était un temps suffisamment long permettant de désorber la majorité des composés absorbés sur le barreau. Le temps de désorption a été fixé à 30 min pour la suite de l'étude.

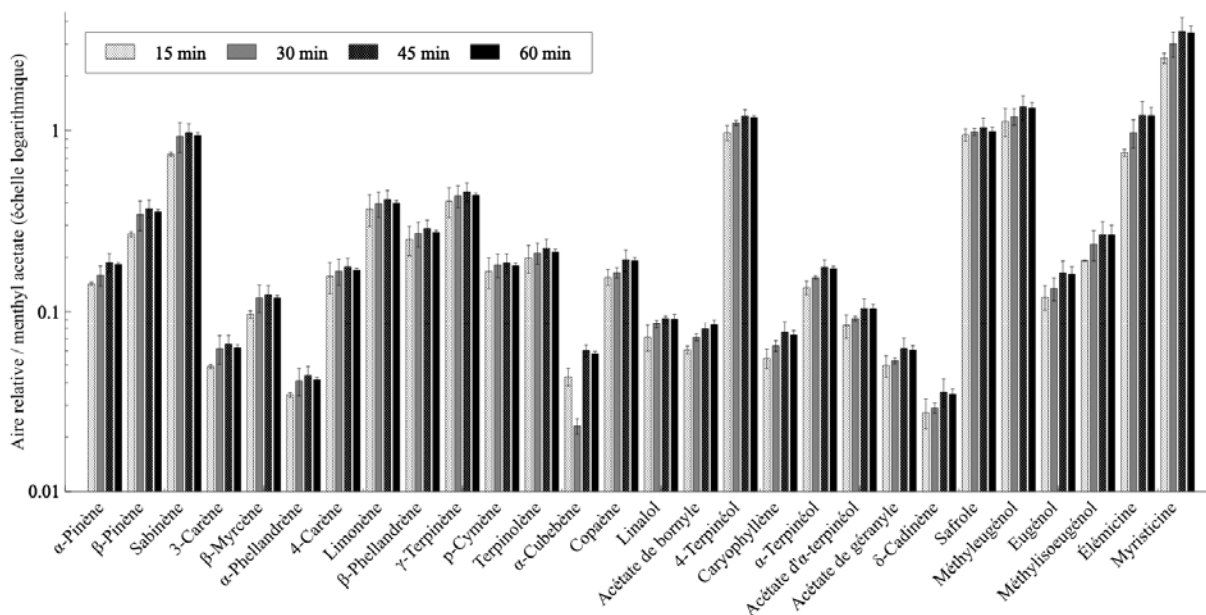


FIGURE III - 7 - Influence du temps de désorption des terpènes volatils de la muscade absorbés sur le barreau après extraction (80 mg de muscade, 1 heure d'extraction à 80 °C à 250 rpm, 30 min de désorption dans 100  $\mu$ L de solvant)

- La nature du solvant de désorption

4 solvants de polarités différentes et compatibles avec la nature des barreaux magnétiques ont été étudiées : l'éthanol, le méthanol, l'acétonitrile et l'eau (FIGURE III - 8). Ici, l'étalon interne n'a pas été utilisé, l'aire de chaque composé est comparée à celles obtenues par les différents solvants. Les écart-types étant acceptables (< 20 %), il a été considéré que l'étalon interne n'était pas nécessaire. Comme attendu, l'eau est le solvant le moins adapté pour la désorption des composés, surtout pour les terpènes volatils apolaires à faible masse moléculaire qui présente une affinité beaucoup plus importante pour le barreau en PDMS apolaire que pour l'eau polaire. L'éthanol présente le meilleur pouvoir de désorption de tous les composés de la muscade étudiés, et a donc été choisi pour la suite de l'étude. De plus ce solvant a l'avantage d'être écoresponsable mais aussi d'être compatible avec les tests biologiques, c'est-à-dire qu'il n'est pas toxique pour les cellules pour une concentration finale inférieure à 1 %.

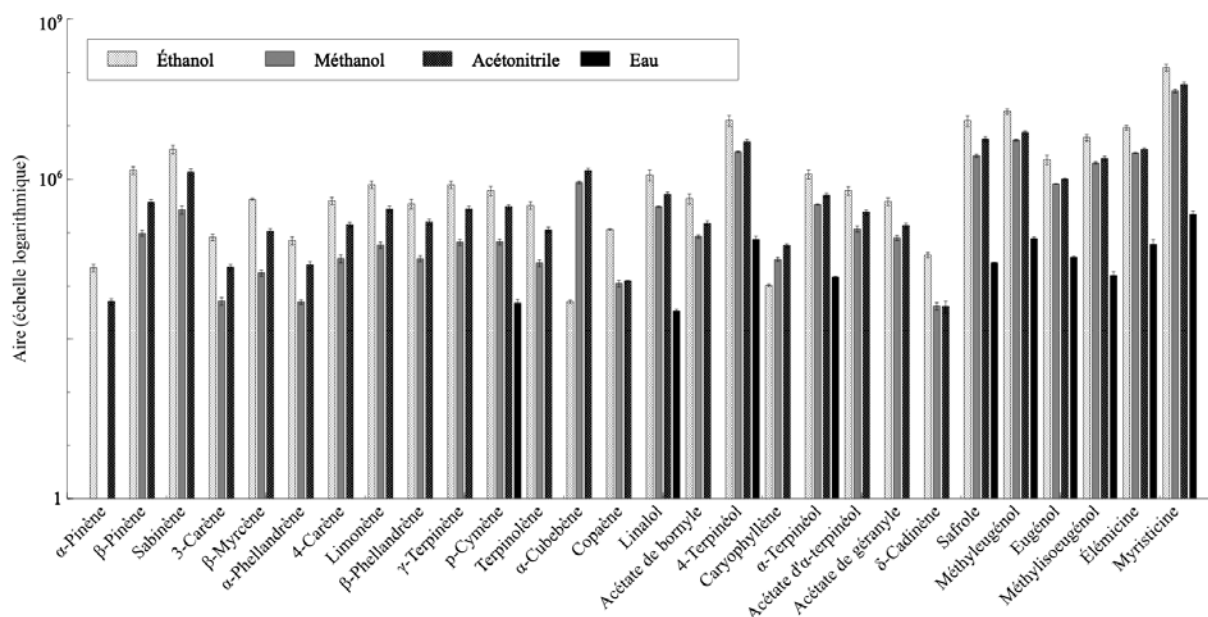


FIGURE III - 8 - Influence du solvant de désorption des terpènes volatils de la muscade absorbés sur le barreau après extraction (80 mg de muscade, 1h30 d'extraction à 80 °C à 250 rpm, 30 min de désorption dans 100  $\mu$ L d'éthanol)

### III.3. ARTICLE: OPTIMIZATION BY EXPERIMENTAL DESIGN OF HEADSPACE SORPTIVE EXTRACTION AND SOLID PHASE MICROEXTRACTION FOR THE DETERMINATION OF TERPENES IN SPICES

Zélie Triaux<sup>a,b</sup>, Hugues Petitjean<sup>b</sup>, Eric Marchioni<sup>a</sup>, Damien Steyer<sup>c</sup>, Christophe Marcic<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France.

<sup>b</sup> Benephyt, 16 rue d'Austerlitz, 67000 Strasbourg, France.

<sup>c</sup> Twistaroma, 74 Route du Rhin, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France.

Article accepté dans *Food Analytical Methods* le 30 Juillet 2019

#### III.3.1. Abstract

Headspace sorptive extraction (HSSE) was compared to solid phase microextraction (SPME), a reference method for the extraction of volatiles. HSSE and SPME were optimized by experimental design for the extraction of terpenes and terpenoids from spices. The different extraction parameters

studied were the extraction time, the extraction temperature, the sample mass and the equilibrium time (only for SPME). Extracts were obtained by HSSE and SPME from six spices: cinnamon, cumin, thyme, fennel seeds, nutmeg and clove. Those extracts were analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS) qualitatively and quantitatively. The quantitative analysis was conducted using 28 standards. For each standard, calibration curves, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined. The study shows that HSSE is selective, sensitive and highly repeatable method for the extraction of volatile terpenes and terpenoids from spices and allows to produce extracts concentrated in the  $\mu\text{g/g}$  range of terpenes.

Keywords: HSSE; SPME; Terpenes; Quantitative analysis; GC/MS; Experimental design.

### *III.3.2. Introduction*

Spices are widely used in cooking as flavors. Besides, their essential oils are also known to have numerous biological activities such as antioxidant [47], anti-inflammatory [48], antidiabetic [49], anti-tumorigenic [50] and many others [51]. Those plants are rich in terpenes and terpenoids, secondary metabolites responsible for their aroma but also for their bioactivities. With 25,000 known structures, terpenes belong to the widest family of natural compounds [1]. They are classified depending on the number of isoprene units in their chemical structure. Monoterpenes, terpenes composed of two isoprene units, are volatile compounds and the main constituents of essential oils. Those compounds have been widely reported as the source of the various bioactivities of essential oils [52]. When the chemical composition of spices varies, due to different parameters (plant variety, harvest, drying, storage...), the organoleptic properties and bioactivities of their essential oils varies [53]. Thus, developing a robust analytical method for the analysis of flavors and more specifically the analysis of monoterpenes in plants is important.

Different methods are conventionally used for flavor analysis such as distillation, supercritical fluid extraction (SFE), soxhlet extraction, solvent assisted flavor evaporation (SAFE)... However, those methods are often time consuming, usually require a large volume of organic solvent thus having a negative impact on the environment and most of them have low extraction efficiency. In the past decade, microextraction methods such as static-headspace extraction, solid-phase microextraction (SPME), single drop microextraction (SDME), hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) and stir bar sorptive extraction (SBSE) have been increasingly used for food flavor analysis [54]. Those techniques are eco-friendly as they are often solventless (or use a minimal amount of solvent), rapid as in most cases no sample preparation is needed and have better selectivity especially when used in headspace mode.

SBSE was first introduced by Baltussen et al. in 1999 [55] as a novel extraction technique. In SBSE, a magnetic stir bar enclosed in a glass tube, usually coated with polydimethylsiloxane (PDMS), is immersed in a liquid sample. The targeted compounds in the sample are extracted by sorption onto the stir bar. After the extraction step, the extracted molecules are desorbed from the stir bar in a minimum volume of solvent or thermally. The analytes are then often analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS). This method allows to concentrate compounds found in a large volume of sample. Instead of placing the stir bar into the sample, it can also be suspended in the headspace of the sample, when dealing with solid samples for example. This use of SBSE is known as headspace sorptive extraction (HSSE). In comparison to SPME, a more common microextraction technique, the stir bar used in HSSE has a larger amount of extracting phase than the fiber used in SPME, providing higher recoveries and sensitivities [56]. Even though HSSE is more selective towards volatiles and semi-volatiles compounds than SBSE, only few studies describe its use [44] and has never been described for the analysis of spices to our knowledge.

Quantitative analysis of bioactive compounds is essential for the evaluation of their biological activities. Monoterpenes, and in general all bioactive compounds, are active at a certain concentration, can be toxic beyond this concentration and inert under it [6]. For a lot of authors, quantitative analysis consists of measuring the relative percentage abundance of each compound in the extract. For others, it consists of using a standard from the same chemical family of the analyte and calculating the relative concentration of the analytes to the one of the standard, this approach is also known as semi-quantitative analysis. Few authors conduct complete quantitative analysis by using analytical standards for each analyte [57]. However, even when complete quantitative analyses are led, it is usually on no more than ten compounds of interest [41]. Quantitative analysis of monoterpenes is rarely done for HSSE [58–60]. The sensibility of the HSSE procedure is different for each terpene depending on their air/stir bar distribution coefficients. The sensibility of each terpene is also different regarding to the analysis procedure, signals generated by GC-MS are dependent not only on the concentration of the analytes but also on their chemical structures [57].

To be able to conduct a complete quantitative analysis with the most standards, the extraction procedure must be well optimized so that the solid/air equilibrium is reached for all analytes. In fact, the optimization of the extraction parameters (time, temperature, shaking rate...) is a critical stage in analytical chemistry even more so when dealing with adsorption techniques. Those techniques rely on an equilibrium between the gas phase and the sorbent phase which needs to be reached in order to improve the repeatability of the extraction method [61]. The most common way to optimize an extraction method is to experiment with one-variable-at-a-time (OVAT) while holding all others fixed [45,58,62]. Even though this procedure can lead to the best possible extraction conditions, it does not consider the potential interactions between the factors and it often requires a high number of experiments. A more effective method is to study factors simultaneously using the design of

experiments approach. Chemometric optimization process allows to tease out which factors have a significant impact on the response, to distinguish interactions between the factors and to determine which combination of levels produces the optimum while minimizing the number of experiments needed [63].

In this study, HSSE was used to extract, identify and quantify monoterpenes from six different spices namely cinnamon, cumin, thyme, fennel seeds, nutmeg and clove. As they are known to contain a wide range of terpenes [32,35,37,64], the spices were used as a plant model rich in monoterpenes to develop an efficient extraction method of those volatiles compounds. HSSE was compared to SPME, a reference extraction method for the analysis of food flavor. HSSE and SPME were optimized by experimental design prior to the comparative study. Quantitative analyses of the extracts were conducted by GC-MS.

### III.3.3. Experimental

#### III.3.3.1. Reagents and materials

Milli-Q water (18.2 M $\Omega$ ) was generated by Millipore synergy system (Molsheim, France). All solvents were of analytical grade (VWR Chemicals, Fontenay-sous-bois, France).  $\alpha$ -pinene (99 %),  $\beta$ -pinene (99 %), camphene (95 %), p-cymene (99 %), 3-carene ( $\geq 90$  %), linalool (97 %), limonene (97 %), pulegone (97 %), 4-terpineol ( $\geq 95$  %), caryophyllene ( $\geq 98.5$  %), menthone (97 %), camphor (96 %), menthol (99 %), borneol ( $\geq 99$  %), estragole (98 %),  $\alpha$ -humulene (96 %), farnesene (mixture of isomers), eucalyptol (99 %), cuminaldehyde (98 %), eugenol (99 %), carvacrol (98 %) and thymol (98 %) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).  $\beta$ -citronellol ( $\geq 95$  %), anethole ( $\geq 98$  %) and  $\alpha$ -terpineol ( $\geq 97$  %) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Geraniol (98 %) was purchased from Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). Nitrogen was of 4.5 grade and helium of 6.0 grade (Sol France, Saint-Ouen l'Aumone, France). Cinnamon (*Cinnamomum verum*, Chamsyl), cumin (*Cuminum cyminum*, Conquête des saveurs), thyme (*Thymus vulgaris*, Chamsyl), fennel seeds (*Foeniculum vulgare*, Ducros), nutmeg (*Myristica fragrans*, Ducros), and clove (*Syzygium aromaticum*, Ducros) were all bought from a local shop. For the extractions, the food matrices were used as bought.

#### III.3.3.2. SPME conditions

All SPME extractions were conducted automatically using a Combi-pal (CTC Analytics AG, Switzerland) autosampler. A known amount of sample was placed in a 20 mL headspace vial (23 x 75 mm) which was closed with PTFE-lined silicon septa and metallic screw caps. The vial was then automatically put in an agitated (250 rpm) incubator to maintain a constant temperature during

the determined equilibrium time. The SPME needle then pierced automatically the septum of the vial and the fiber was extended through the needle in the headspace of the vial. A 1 cm fused silica fiber coated with 100  $\mu\text{m}$  of polydimethylsiloxane (PDMS) was used for the extractions (Supelco, Bellefonte, USA). Before use, the fiber was conditioned during 30 min at 250  $^{\circ}\text{C}$  according to the manufacturer's instructions. The fiber was exposed to the headspace of the sample during different time periods and was then withdrawn into the needle, removed from the vial and thermally desorbed at 210  $^{\circ}\text{C}$  during 2 min directly in the split/splitless injection port of the GC. The obtained extracts were analyzed by GC-MS in split mode (1:50) and each extraction was performed in triplicate. The extraction temperature (50 – 80  $^{\circ}\text{C}$ ), the equilibrium time (5 - 11 min), the sample mass (40 – 80 mg) and the extraction time (10 - 90 min) were optimized by experimental design.

### III.3.3.3. HSSE conditions

10-mm long stir bars coated with 1 mm film thick layer of polydimethylsiloxane (PDMS) (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany) were used. A weighed amount of sample was placed in a 20 mL headspace vial (23 x 75 mm) which was closed with PTFE-lined silicon septa and metallic screw caps. The magnetic stir bar was attached with a clean metal paper clip by simple magnetic force in the headspace of the vial. The HSSE extraction was then carried out in an agitated (250 rpm) incubator at constant temperature. Once the sorption step was over, the stir bar was removed from the headspace and inserted in 100  $\mu\text{L}$  of ethanol in a 250  $\mu\text{L}$  insert (29 x 5.7 mm) placed in a 2 mL vial closed with a screw cap for the desorption step. The stir bar was then desorbed under ultrasonic treatment during 30 min. After removal of the stir bar, 1  $\mu\text{L}$  of the obtained extract spiked with an internal standard to follow the variations of the analytical method was injected in the GC-MS in split mode (1:20). Each extraction was performed in triplicate. The extraction temperature (50 – 90  $^{\circ}\text{C}$ ), the extraction time (30 - 120 min) and the sample mass (40 - 80 mg) were optimized by experimental design.

Prior to each use, each stir bar was preconditioned following the same cleaning procedure. First the stir bar was washed under ultrasound for 30 min in 1 mL dichloromethane-methanol mixture (50:50 v/v) and then in 1 mL acetonitrile for another 30 min. Finally, the stir bar was placed in 1 mL acetonitrile overnight. To check the reliability of the cleaning procedure, after having gone through the washing steps, the stir bar was desorbed once more in 100  $\mu\text{L}$  of ethanol for 30 min under sonication, last solvent being then analyzed by GC-MS in splitless mode. No compounds of the previous extract were detected in the “washing solvent” which validates the cleaning procedure. This cleaning step could be improved by using a thermal desorption unit, no solvent would be needed and it would be time-saving.

### III.3.3.4. Experimental design and definition of the response

The optimal extraction parameters for SPME and HSSE were determined by establishing an experimental design approach. The corresponding experiments defined by the designs were done on nutmeg as it contains the widest range of terpenes and terpenoids among the spices studied.

For data manipulation, JMP<sup>®</sup> Statistical Discovery<sup>™</sup> 8 (SAS Institute) was used. Each experimental design had 28 responses corresponding to the 28 compounds identified in nutmeg (FIGURE III - 9). The measured property of the response is the chromatographic peak area of the corresponding compound. Those compounds were chosen as they have different chemical properties (mainly polarities and boiling temperatures), the aim being to optimize the extraction methods in order to extract the higher concentration of terpenes and terpenoids. First, a two-level Full Factorial Design  $2^k$  (with  $k$  the number of parameters) was built to evaluate which parameters had a significant impact on the responses and to calculate the interactions between the parameters. The number of experiments for this design is equal to  $2^k +$  the number of central points. The data obtained by those experiments was fitted according to a second order interaction model which corresponds to the following equation [65]:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (\text{ÉQUATION III - 1})$$

where  $y$  is the response (the area of a selected peak),  $x_i$  the studied factors,  $\beta_0$  the constant,  $\beta_i$  the coefficients of the linear parameters,  $\beta_{ij}$  the coefficients of the interaction parameters and  $\varepsilon$  the experimental error. The influence of the interactions of third order (or higher) were neglected as they are considered very small in most cases [66].



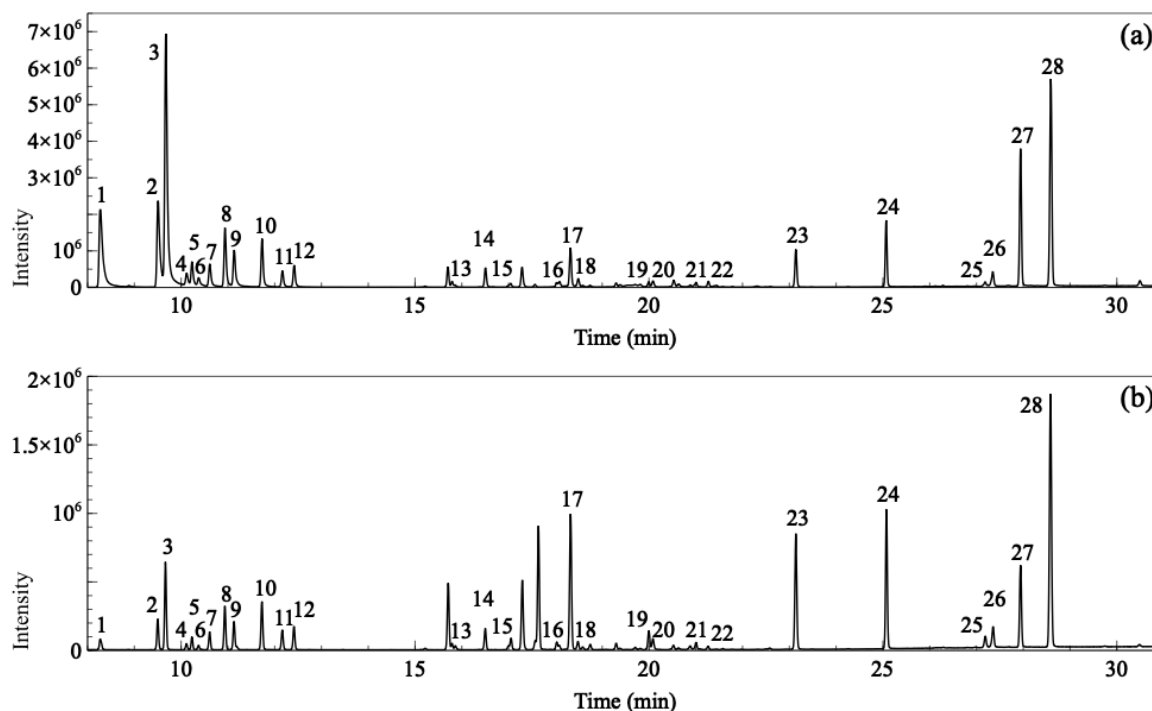


FIGURE III - 9 - Total ion chromatogram obtained for nutmeg extracts by (a) SPME and (b) HSSE. Selected compounds for the optimization by experimental design. 1,  $\alpha$  Pinene; 2,  $\beta$  Pinene; 3, Sabinene; 4, 3 Carene; 5,  $\beta$ - Myrcene; 6,  $\alpha$  Phellandrene; 7, 4 Carene; 8, Limonene; 9,  $\beta$ -Phellandrene; 10,  $\gamma$ -Terpinene; 11, *p*-Cymene; 12, Terpinolene; 13,  $\alpha$ -Cubebene; 14, Copaene; 15, Linalool; 16, Bornyl acetate; 17, 4-Terpineol; 18, Caryophyllene; 19,  $\alpha$ -Terpineol; 20,  $\alpha$ -Terpineol acetate; 21, Geranyl acetate; 22,  $\delta$ -Cadinene; 23, Safrrole; 24, Methyl eugenol; 25, Eugenol; 26, Isoeugenol methyl ether; 27, Elemicin; 28, Myristicine

Then, choosing only the significant parameters identified by the first design, the optimal extraction conditions were determined using a Face Centered Design. For the model corresponding to this design, quadratic terms are added in order to determine a maximum, i.e. the optimal conditions. The data obtained from the experiments of this design was fitted to the following quadratic equation [65]:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (\text{ÉQUATION III - 2})$$

where  $\beta_{ii}$  represents the coefficients of the quadratic parameters.

A Face Centered Design is a factorial design augmented with a group of points placed on the center of each face of the factorial space (corresponding to a square for a  $2^2$  design). The identification of the optimal extraction parameters which optimize all 28 responses simultaneously was found using the desirability function approach [65]. The first step of this methodology is to build a desirability function for each individual response. This is done by transforming the chromatographic peak areas of each compound into a dimensionless individual desirability scale. This scale ranges between  $d=0$ , lowest peak area obtained, and  $d=1$ , highest peak area obtained in the experiments conducted in the experimental design. An overall desirability function was then drawn from the 28 partial desirability

functions to find a global optimum corresponding to the best compromise for maximizing simultaneously all the different responses studied. The experimental data was fitted by least squares. To evaluate the adequacy of the model corresponding to the experimental design, three values were calculated: the goodness of the fit  $R^2$ , the goodness of prediction  $Q^2$ , and the lack of fit (LoF). Values of  $R^2 > 0.8$  and  $Q^2 \geq 0.5$  were considered acceptable in our study [66]. The lack of fit compares the model error to the experimental error by an  $F$ -test. If  $P$ -value  $< 0.05$ , the  $F$ -test is significant and there is a significant lack of fit of the corresponding response by the model. The statistical significance of each parameter and the interactions between them were studied by using an analysis of variance (ANOVA) for a 95% confidence level of the parameter's coefficients for each response (i.e. if  $P$ -value  $< 0.05$ , the parameter has a statistical significance on the response).

### III.3.3.5. GC-MS analysis

Analyses were performed with a 450-GC/240-MS (Varian, Les Ulis, France) GC-MS system equipped with a DB-WAX capillary column (60 m x 0.25 mm x 0.15  $\mu$ m) (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The split/splitless injector temperature was set to 210 °C. The oven temperature was held at 40 °C for 1 min, increased to 100 °C at 10 °C/min, heated to 130 °C at 5 °C/min, heated to 15 °C at 10 °C/min, heated to 180 °C at 5 °C/min, heated to 230 °C at 10 °C/min and then held isothermal at 230 °C for 5 min. For MS, the electron multiplier was set to 70 eV. The temperature of the ion source was 150 °C and the transfer line was set at 200 °C. Detection was performed in the scan mode in the range of 50-200  $m/z$ .

### III.3.3.6. Sample characterization and quantification

Terpenes were identified in the different extracts on the basis of their mass spectra and retention indexes (RI). Recorded mass spectra were compared with those from the National Institute of Standards and Technology (NIST 2.0, USA) database considering a match factor higher than 800 a good match. Retention indexes (RI) were calculated [39] and compared to the ones in the literature for DB-WAX type columns.

Quantification analysis of the extracts was conducted using 28 terpene standards (Supporting Information FIGURE III - 13). Not all the terpenes identified in the different samples were quantified, only the ones corresponding to the 28 standards. For each standard, solutions with a concentration range from 0.1  $\mu$ g/g to 50  $\mu$ g/g were prepared to draw the calibration curves. 2 mL of the standard solution at different concentrations were placed in a headspace vial and extracted by both HSSE and SPME. Ten points were used to draw the calibration curves (two calibration curves for each standard corresponding to two ranges of linearity). Each concentration was analyzed in triplicate. Standards were quantified according to the peak area of the corresponding compound's selected target ion (the main ion of the mass spectra of the compound or a characteristic one). The limits of detection (LOD)

and limits of quantification (LOQ), defined as the lowest concentrations detected at a signal-to-noise ratio of three or ten respectively, were measured for each standard. The lowest concentration used to draw the calibration curves was chosen above the LOQ.

### III.3.4. Results and discussion

#### III.3.4.1. Optimization of SPME conditions

##### III.3.4.1.1. Screening by a 2<sup>4</sup> Full Factorial Design

Nineteen experiments were conducted according to conditions fixed by a 2<sup>4</sup> Full Factorial Design (including 3 central points) to study the significative influence of equilibrium time (5 - 11 min), extraction temperature (50 – 70 °C), extraction time (10 - 26 min) and sample mass (40 - 80 mg) on SPME efficiency. The intervals studied for each variable were selected according to previous work [67,68]. The results of this first screening design are shown in TABLE III - 10.

There was no significant lack of fit ( $P>0.05$ ) observed for any of the responses. 64 % of the responses were well described by the chosen model ( $R^2>0.8$  and  $Q^2>0.5$ ) which was considered enough to validate this model. Extraction temperature (T) and extraction time ( $t_{ext}$ ) were the most significant factors in the extraction process. Increasing the extraction time from 10 to 26 min increases the peak area of 79 % of the responses.

TABLE III - 10 - Significant regression coefficients and fitting parameters for all 28 responses of the 24 Full Factorial Design for SPME extraction conditions

Compound	T	$t_{eq}$	$t_{ext}$	M	$Tt_{eq}$	$Tt_{ext}$	$t_{eq}t_{ext}$	TM	$t_{eq}M$	$t_{ext}M$	$R^2$	$Q^2$	LoF
$\alpha$ -Pinene	- <sup>a</sup>	ns <sup>b</sup>	ns	+ <sup>c</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.941	0.748	ns
$\beta$ -Pinene	-	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.890	0.573	ns
Sabinene	-	ns	+	+	ns	ns	ns	+	ns	ns	0.933	0.691	ns
3-Carene	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.852	<0.500	ns
$\beta$ -Myrcene	-	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.857	<0.500	ns
$\alpha$ -Phellandrene	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<0.800	<0.500	ns
4-Carene	-	ns	+	+	+	ns	ns	ns	ns	ns	0.861	<0.500	ns
Limonene	-	ns	+	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.818	<0.500	ns
$\beta$ -Phellandrene	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+	ns	ns	<0.800	<0.500	ns
$\gamma$ -Terpinene	-	ns	+	+	+	ns	ns	ns	ns	ns	0.834	<0.500	ns
p-Cymene	-	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.812	<0.500	ns
Terpinolene	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<0.800	<0.500	ns
$\alpha$ -Cubebene	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.971	0.883	ns
Copaene	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.947	0.732	ns

Linalool	+	ns	+	ns	ns	ns	+	ns	ns	ns	0.898	<0.500	ns
Bornyl acetate	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.870	0.532	ns
4-Terpineol	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.911	0.598	ns
Caryophyllene	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.964	0.837	ns
$\alpha$ -Terpineol	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.936	0.723	ns
$\alpha$ -Terpineol acetate	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.951	0.805	ns
Geranyl acetate	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.963	0.891	ns
$\delta$ -Cadinene	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.931	0.846	ns
Safrole	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.918	0.695	ns
Methyl eugenol	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.921	0.807	ns
Eugenol	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.900	0.684	ns
Isoeugenol methyl ether	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.939	0.873	ns
Elemicin	+	+	+	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	0.984	0.938	ns
Myristicine	+	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.933	0.860	ns

T: extraction temperature,  $t_{eq}$ : equilibrium time,  $t_{ext}$ : extraction time, M: sample mass, LoF: lack of fit

<sup>a</sup> Negative effect

<sup>b</sup> Not significant

<sup>c</sup> Positive effect

For the extraction temperature, increasing this factor from 50 to 70 °C had a positive effect on 57 % of the responses but had a negative one on 39 % of the responses which was expected. More precisely, increasing the extraction temperature, decreases the extraction efficiency of highly volatile compounds and on the contrary increasing the extraction temperature, increases the extraction efficiency of less volatile compounds. This can be explained by the fact that at a higher temperature the concentration of less volatile compounds in the headspace will increase while higher volatile compounds will desorb from the fiber due to a decrease of their distribution constant [69]. Moreover, as the concentration of low volatile compounds increases in the headspace and eventually on the fiber, a potential competition between volatiles on the liquid stationary phase might appear [59]. This phenomenon is well observed here as each response of the experimental design corresponds to a compound and not to the sum of the peak areas as it is usually done.

Equilibrium time ( $t_{eq}$ ) and sample mass (M) did not seem to affect or only slightly affect some of the compounds studied (4 % for  $t_{eq}$  and 25 % for M). Those parameters were fixed at 10 min and 70 mg respectively. No significant interactions between the selected factors were observed.

### III.3.4.1.2. Optimization by a Face Centered Design

For an optimization design, the number of parameters must be kept as small as possible to avoid complex models [70]. As only the extraction temperature (T) and the extraction time ( $t_{ext}$ ) were found significant in the screening design (3.1.1.), those two parameters were selected to find the optimum extraction conditions by a  $2^2$  Face Centered Design. The studied intervals were 60 – 80 °C

for the extraction temperature and 30 - 60 min for the extraction time, corresponding to a design of eleven experiments (including three central points). The values of those intervals were increased according to the results obtained previously, as the optimal conditions were not found in those previous intervals.

The model of this Face Centered Design was validated for 68 % of the responses (no LoF,  $R^2 > 0.8$  and  $Q^2 > 0.5$ ) (Supplementary Information TABLE III - 14). To find the optimal conditions, the desirability function approach was used. The partial desirability was defined as maximizing the peak area of the corresponding compound, i.e. the maximum area obtained for a certain compound in certain conditions of the design is defined as  $d=1$ . All partial desirability functions were similarly weighed to 1. The overall desirability was calculated to reach the most favorable extraction parameters by simultaneously maximizing the peak area for the 28 responses. It is used to find the best compromise to extract all the different compounds as well as possible. Only the partial desirability of the responses well fitted by the model were used to calculate the overall desirability of the design. The contour plot (FIGURE III - 10) shows that the highest overall desirability ( $D > 0.741$ ) is found at the maximum values of the selected parameters: 80 °C and 60 min. In our case, it is difficult to obtain an overall desirability closer to 1 as a wide range of compounds from different chemical families with different volatilities is studied. A higher temperature was not tested to prevent from compound degradation and losses of highly volatile analytes. Increasing the extraction time beyond 60 min, did not significantly increase the responses (data not shown). In fact, as SPME is based on absorption, when the equilibrium between the solid phase and the fiber is achieved, the exposure time does not increase the extraction efficiency [69].

Finally, the optimal extraction conditions selected were: 70 mg sample mass, 10 min equilibrium time, 80 °C extraction temperature, 60 min extraction time.

After the extraction and desorption of nutmeg in the optimal conditions above, a blank analysis (empty vial) was conducted to assess the residual amount of analytes on the fiber. After 2 min of desorption at 210 °C in the GC injector, the residual compounds were near or below the LOD. It was assumed that the desorption time was well selected and that in this period of time 100 % of the analytes were desorbed.

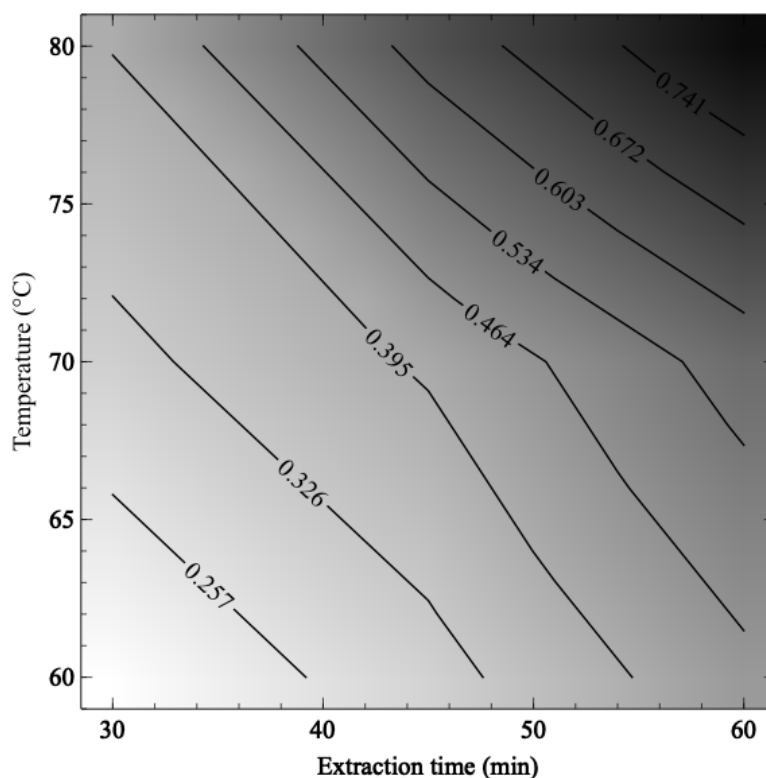


FIGURE III - 10 - Contour plots from the face centered design of SPME extracts of nutmeg showing the effect of extraction temperature and extraction time on the overall desirability

### III.3.4.2. Optimization of HSSE conditions

#### III.3.4.2.1. Screening by a 2<sup>3</sup> Full Factorial Design

The influences of extraction temperature (50 – 70 °C), extraction time (30 - 90 min) and sample mass (40 - 80 mg) were studied using a 2<sup>3</sup> Full Factorial Design. The data of eleven extractions defined by the design conditions (including 3 central points) was collected. The intervals of the parameters were selected according to prior studies [45,71] but also upon the results of the SPME optimization previously exposed in this work. The results of the model's fitting are shown in TABLE III - 11. No significant LoF was observed for any of the responses. The explained variation R<sup>2</sup> of all 28 responses was higher than the acceptable value (R<sup>2</sup>>0.8), which means that the model explained most of the experimental variability for 100 % of the responses.

TABLE III - 11 - Significant regression coefficients and fitting parameters for all 28 responses of the 23 Full Factorial Design for HSSE extraction conditions

Compound	T	t <sub>ext</sub>	M	Tt <sub>ext</sub>	TM	t <sub>ext</sub> M	R <sup>2</sup>	Q <sup>2</sup>	LoF
α-Pinene	- <sup>a</sup>	ns <sup>b</sup>	+ <sup>c</sup>	ns	-	-	0.979	<0.500	ns
β-Pinene	-	ns	+	ns	ns	ns	0.946	<0.500	ns
Sabinene	-	ns	+	ns	ns	ns	0.943	<0.500	ns

3-Carene	ns	ns	+	ns	ns	ns	0.902	<0.500	ns
$\beta$ -Myrcene	-	ns	+	ns	ns	ns	0.906	<0.500	ns
$\alpha$ -Phellandrene	ns	ns	+	ns	ns	ns	0.881	<0.500	ns
4-Carene	ns	ns	+	ns	ns	ns	0.871	<0.500	ns
Limonene	ns	ns	+	ns	ns	ns	0.860	<0.500	ns
$\beta$ -Phellandrene	ns	ns	+	ns	ns	ns	0.891	<0.500	ns
$\gamma$ -Terpinene	ns	ns	+	ns	ns	ns	0.798	<0.500	ns
p-Cymene	ns	ns	+	ns	ns	ns	0.838	<0.500	ns
Terpinolene	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.792	<0.500	ns
$\alpha$ -Cubebene	+	+	ns	ns	ns	ns	0.978	0.864	ns
Copaene	+	+	ns	ns	ns	ns	0.984	0.966	ns
Linalool	+	+	ns	ns	ns	ns	0.932	<0.500	ns
Bornyl acetate	+	+	ns	ns	ns	ns	0.986	0.978	ns
4-Terpineol	+	+	ns	ns	ns	ns	0.974	0.885	ns
Caryophyllene	+	+	ns	ns	ns	ns	0.984	0.943	ns
$\alpha$ -Terpineol	+	+	ns	ns	ns	ns	0.984	0.957	ns
$\alpha$ -Terpineol acetate	+	+	ns	ns	ns	ns	0.981	0.906	ns
Gernyl acetate	+	+	ns	ns	ns	ns	0.978	0.782	ns
$\delta$ -Cadinene	+	+	ns	ns	ns	ns	0.983	0.809	ns
Safrole	+	+	ns	ns	ns	ns	0.985	0.977	ns
Methyl eugenol	+	+	ns	ns	ns	ns	0.980	0.804	ns
Eugenol	+	+	ns	ns	ns	ns	0.969	0.659	ns
Isoeugenol methylether	+	+	ns	+	ns	ns	0.989	0.796	ns
Elemicin	+	+	ns	ns	ns	ns	0.964	0.606	ns
Myristicine	+	+	ns	ns	ns	ns	0.975	0.735	ns

T: extraction temperature,  $t_{\text{ext}}$ : extraction time, M: sample mass, LoF: lack of fit

<sup>a</sup> Negative effect

<sup>b</sup> Not significant

<sup>c</sup> Positive effect

The prediction variation  $Q^2$  is acceptable for 54 % of the responses, the variations of the highly volatile compounds are not well predicted by this model. In fact, a factor or an interaction might be missing in the model to better explain the variations of those compounds. Nevertheless, the aim of this first design is not to predict the optimal conditions but to study the parameters influence, it was considered that the model was well adapted to do so (no LoF and  $R^2 > 0.8$  for 100 % of the responses).

Like the results obtained for SPME, two parameters showed a significant influence on the responses: the extraction temperature and the extraction time. However, for HSSE, the increase of temperature from 50 to 70 °C had a positive impact on 57 % of the responses but a negative impact on only 14 % of the responses, it was non-significant for most of the highly volatile compounds (29 %). In fact, a PDMS stir bar has 10 times more PDMS amount than a SPME fiber due to its dimension [72], more compounds can be absorbed on the PDMS phase. Even though the concentration of less volatile

compounds increases in the headspace, the higher volatile ones can still have sites to occupy, until exhaustion of the sites where a competition will begin. As expected, increasing the extraction time from 30 to 90 min increases the extraction efficiency (for 57 % of the responses). The sample mass had a significant influence on the HSSE for less than half the responses. This parameter was fixed at 80 mg (highest value of the interval), as its influence was positive for 39 % of the responses.

#### III.3.4.2.2. Optimization by a Face Centered Design

A 2<sup>2</sup> Face Centered Design was built to find the optimal extraction conditions of HSSE. The factors used for this design was the ones that showed a significant influence on the extraction efficiency in the previous design: the extraction temperature (70 – 90 °C) and the extraction time (60 - 120 min). The values of those intervals were increased according to the results previously obtained. Eleven experiments (including three central points) were conducted according to the conditions set by the Face Centered Design.

The results obtained to validate the design's model are presented in the TABLE III - 15 of the supplementary information. 86 % of the responses were well fitted by the model (no LoF,  $R^2 > 0.8$ ,  $Q^2 > 0.5$ ), which was considered enough to use this model to optimize the extraction conditions. The partial desirability was defined as maximizing the peak area of the corresponding compound, same as for the SPME optimization. The overall desirability was then calculated from the partial desirabilities of the well predicted compounds by the model.  $\alpha$ -cubebene, linalool, 4-terpineol and  $\alpha$ -terpineol were poorly predicted by the model ( $Q^2 < 0.5$ , TABLE III - 15) and were thus excluded from the calculation of the overall desirability. The contour plot of the overall desirability (FIGURE III - 11) shows that the best compromise for the extraction parameters are 90 min extraction time and 80 °C extraction temperature. The value of the overall desirability at these conditions ( $D > 0.534$ ) is not as high as expected. Indeed, the same phenomenon as described before can be observed: half of the studied compounds are well extracted at low temperatures while the other half is better extracted at higher temperatures. Finding a compromise to extract well those different compounds will inevitably lead to the decrease of the overall desirability.

The decrease of the extraction efficiency after 80 °C shows compound degradation and loses of highly volatiles compounds at higher temperatures, which is a why an extraction temperature of 90 °C was not tested for SPME. The final optimal extraction parameters for HSSE were selected as follows: 80 mg sample mass, 80 °C extraction temperature and 90 min extraction time.



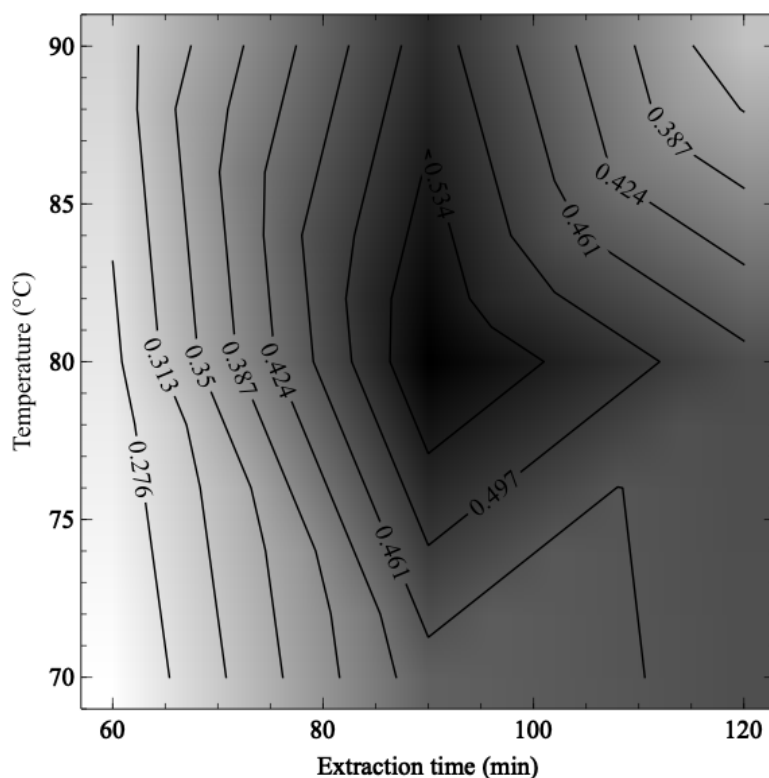


FIGURE III - 11 - Contour plots from the face centered design of HSSE extracts of nutmeg showing the effect of extraction temperature and extraction time on the overall desirability

After the extraction conditions were optimized, different desorption parameters were tested, namely the desorption solvent and the desorption time. Different desorption solvents were used for the desorption of the analytes: water, ethanol, methanol and acetonitrile (data not shown). Water was rapidly discarded as its desorption efficiency was quite poor compared to the other solvents tested. In fact, PDMS is a non-polar phase, mainly non-polar compounds will adsorb on this phase and according to the 'like dissolves like' rule, water is too polar to desorb those compounds. Between the three remaining solvents, the chromatographic profiles obtained for the extracts were similar, but the peak areas of the ethanol extract were higher than for the other two solvents, ethanol was thus selected for the desorption. Different desorption periods were tested: 15 min, 30 min, 45 min and 60 min (data not shown). After 30 min ultrasonic treatment, no significant improvement of extraction efficiency was obtained at higher extraction time. Therefore, it was considered that after 30 min desorption in ethanol, most of the analytes were desorbed from the PDMS stir bar.

#### III.3.4.3. Calibration and limits of detection

After the determination of the optimal extraction parameters for SPME and HSSE, the method performances were evaluated by determining the linearity of response, the repeatability and the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for the targeted terpenoids. TABLE III - 12 shows the

calibration parameters of the 28 terpenoids standards studied for both extraction methods (SPME and HSSE). Most of the standards used for the calibration are monoterpenes or monoterpenoids, five sesquiterpenes were included ((Z)- $\beta$ -farnesene, (E)- $\beta$ -farnesene,  $\alpha$ -farnesene, caryophyllene and  $\alpha$ -humulene). All standards showed a satisfactory linearity within the concentration ranges tested, the regression coefficients ( $R^2$ ) were all higher than 0.99 for both SPME and HSSE. The relative standard deviation (RSD) calculated at 3  $\mu\text{g/g}$  standard mixture was lower than 15 % for all standards which is acceptable for headspace extraction. As a matter of fact, two equilibriums are involved in headspace extraction: solid/gas equilibrium and gas/stationary phase equilibrium [73]. This contributes to the challenge of the repeatability of this extraction method if it is not well standardized. The high repeatability of the two techniques is well shown here as the RSD was lower than 10 % for 79 % of the terpenoids studied by SPME and for 86 % by HSSE, only few compounds exhibited an RSD between 10 and 15 %. LODs and LOQs were calculated for both extraction methods for all 28 standards. Values of LODs are not shown in TABLE III - 12 as they are directly related to the LOQs by a factor of 3.3. LOQs are essential when doing quantitative analysis. LOQs were in the range of 0.02-1.3 and 0.03-8.7  $\mu\text{g/g}$  for SPME and HSSE respectively. The values of LOQs calculated for both SPME and HSSE were similar for each compound except for the sesquiterpenes. Those compounds ((Z)- $\beta$ -Farnesene, (E)- $\beta$ -Farnesene,  $\alpha$ -Farnesene, Caryophyllene,  $\alpha$ -Humulene) showed a ten times higher sensibility by SPME (0.2, 0.1, 0.5, 0.02 and 0.02  $\mu\text{g/g}$  resp.) than by HSSE (3, 1.8, 8.7, 0.2 and 0.2  $\mu\text{g/g}$  resp.). This can be due to the lack of affinity between the desorption solvent (ethanol) and the apolar sesquiterpenes. On the contrary, linalool, menthol and  $\alpha$ -terpineol, which are more polar terpenoids, have slightly lower LOQs by HSSE (0.2, 0.05 and 0.2  $\mu\text{g/g}$  resp.) than by SPME (0.7, 0.2 and 1  $\mu\text{g/g}$  resp.). The LODs and the LOQs obtained for all terpenoids studied were low enough to analyze these compounds in real samples later on (III.3.4.4.)

TABLE III - 12 - Calibration parameters of standards for SPME and HSSE: retention index (RI), ion extracted from the TIC analysis, relative standard deviation (RSD) calculated on a 3 µg/g standard mixture, concentration ranges, coefficient of determination ( $R^2$ ), and limit of quantification (LOQ)

Compound	RI	Ion (m/z)	SPME				HSSE			
			RSD	Concentration range (µg/g)	$R^2$	LOQ (µg/g)	RSD	Concentration range (µg/g)	$R^2$	LOQ (µg/g)
α-Pinene	1049	93	13.5	[0.5;3]	0.991	0.2	0.8	[0.4;3]	0.995	0.1
				[3;50]	0.997			[3;50]	0.997	
Camphene	1085	93	11.2	[0.5;3]	0.996	0.1	0.2	[0.4;3]	0.996	0.1
				[3;50]	0.996			[3;50]	0.991	
β-Pinene	1119	93	5.0	[0.5;3]	0.996	0.1	6.9	[0.1;3]	0.995	0.1
				[3;50]	1.000			[3;50]	0.999	
3-Carene	1148	93	5.2	[0.1;3]	0.994	0.1	5.0	[0.1;3]	0.996	0.1
				[3;50]	1.000			[3;50]	1.000	
Limonene	1186	67	8.5	[0.1;3]	0.998	0.1	2.7	[0.4;3]	0.997	0.2
				[3;50]	0.996			[3;50]	0.994	
Eucalyptol	1202	139	6.6	[0.5;3]	0.999	0.1	8.1	[0.4;3]	0.998	0.2
				[3;50]	0.995			[3;50]	0.997	
p-Cymene	1258	119	3.1	[0.1;3]	0.999	0.02	2.1	[0.1;3]	0.993	0.03
				[3;50]	1.000			[3;50]	1.000	
Menthone	1481	139	6.2	[0.1;3]	0.999	0.1	5.3	[0.4;3]	0.995	0.1
				[3;50]	1.000			[3;50]	0.999	
Camphor	1529	108	4.2	[0.5;3]	0.999	0.2	11.3	[0.4;3]	0.998	0.3
				[3;50]	0.998			[3;50]	0.999	
Linalool	1540	93	13.3	[0.7;3]	0.993	0.7	5.4	[0.4;3]	0.996	0.2
				[3;50]	0.999			[3;50]	0.999	
4-Terpineol	1595	71	4.5	[0.7;3]	0.996	0.5	6.5	[0.7;3]	0.999	0.5
				[3;50]	0.995			[3;50]	0.999	

Caryophyllene	1603	133	4.7	[0.1;3]	0.999	0.02	3.4	[0.4;3]	0.997	0.2
				[3;50]	0.999			[3;50]	0.999	
(Z)- $\beta$ -Farnesene	1620	161	12.4	[0.5;3]	0.999	0.2	5.7	-	-	-
				[3;50]	0.999			[3;50]	0.999	3.0
Menthol	1630	81	7.2	[0.5;3]	0.992	0.2	8.6	[0.1;3]	0.996	0.05
				[3;50]	0.997			[3;50]	0.999	
Pulegone	1638	152	6.4	[0.5;3]	0.998	0.1	5.6	[0.4;3]	0.993	0.2
				[3;50]	1.000			[3;50]	0.999	
(E)- $\beta$ -Farnesene	1646	161	10.2	[0.5;3]	0.996	0.1	14.0	-	-	-
				[3;50]	0.997			[3.50]	0.999	1.8
Estragole	1657	148	3.9	[0.1;3]	0.999	0.03	9.7	[0.1;3]	0.991	0.04
				[3;50]	0.999			[3;50]	0.999	
$\alpha$ -Humulene	1667	147	11.5	[0.1;3]	0.998	0.02	9.6	[0.4;3]	0.997	0.2
				[3;50]	0.999			[3;50]	0.999	
$\alpha$ -Terpineol	1674	93	5.2	-	-	-	6.0	[0.4;3]	0.996	0.2
				[3;50]	0.999	1.2		[3;50]	0.998	
Borneol	1685	95	10.1	[0.5;3]	0.990	0.4	9.7	[0.4;3]	0.997	0.1
				[3;50]	0.999			[3;50]	0.999	
$\alpha$ -Farnesene	1729	161	12.0	[0.7;3]	0.997	0.5	3.2	-	-	-
				[3;50]	0.999			[10;50]	0.997	8.7
$\beta$ -Citronellol	1739	67	3.1	[0.5;3]	0.996	0.4	8.3	[0.4;3]	0.997	0.2
				[3;50]	1.000			[3;50]	0.997	
Cuminaldehyde	1793	133	5.8	[0.5;3]	0.995	0.4	10.5	[0.4;3]	0.994	0.2
				[3;50]	1.000			[3;50]	0.997	
Anethole	1827	117	6.8	[0.1;3]	0.997	0.1	6.8	[0.4;3]	0.998	0.3
				[3;50]	0.991			[3;50]	0.999	
Geraniol	1842	69	8.4	[3;50]	0.999	1.3	10.6	[3;50]	0.995	0.9

Thymol	2138	135	8.1	[0.5;3]	0.996	0.1	9.0	[0.4;3]	0.999	0.3
				[3;50]	0.994			[3;50]	0.998	
Eugenol	2159	164	4.7	[0.5;3]	0.999	0.2	8.4	[0.7;3]	0.999	0.4
				[3;50]	0.997			[3;50]	0.992	
Carvacrol	2167	135	10.0	[0.5;3]	0.997	0.1	7.4	[0.4;3]	0.999	0.3
				[3;50]	0.995			[3;50]	0.998	

#### III.3.4.4. SPME and HSSE comparative study

Optimized SPME and HSSE were used to extract terpenoids from six different spices: cinnamon, cumin, fennel seeds, clove, nutmeg and thyme. Each sample was extracted by both methods in triplicate.

The chromatograms obtained for nutmeg using SPME and HSSE are shown in FIGURE III - 9. As it can be seen, the same headspace profile is obtained for both extraction methods, the main difference remaining in the relative contribution of each compound. Furthermore, even if a higher split ratio was applied for SPME (1/50), the enrichment of volatiles was higher for SPME than for HSSE (split ratio 1/20). Due to this high sensibility, more terpenoids were identified in SPME extracts than in HSSE ones (FIGURE III - 12). For all matrices studied, SPME extracted more terpenoids or as much as HSSE. The full identification of the compounds for each matrix is presented in the supporting information material. The quantitative analysis shows the same result: for most compounds, SPME extracts quantitatively more terpenoids than HSSE (TABLE III - 13). 25 compounds of the 28 standards studied were found in the different matrices. This study shows that it was possible to conduct a robust quantitative analysis for both headspace extraction techniques.

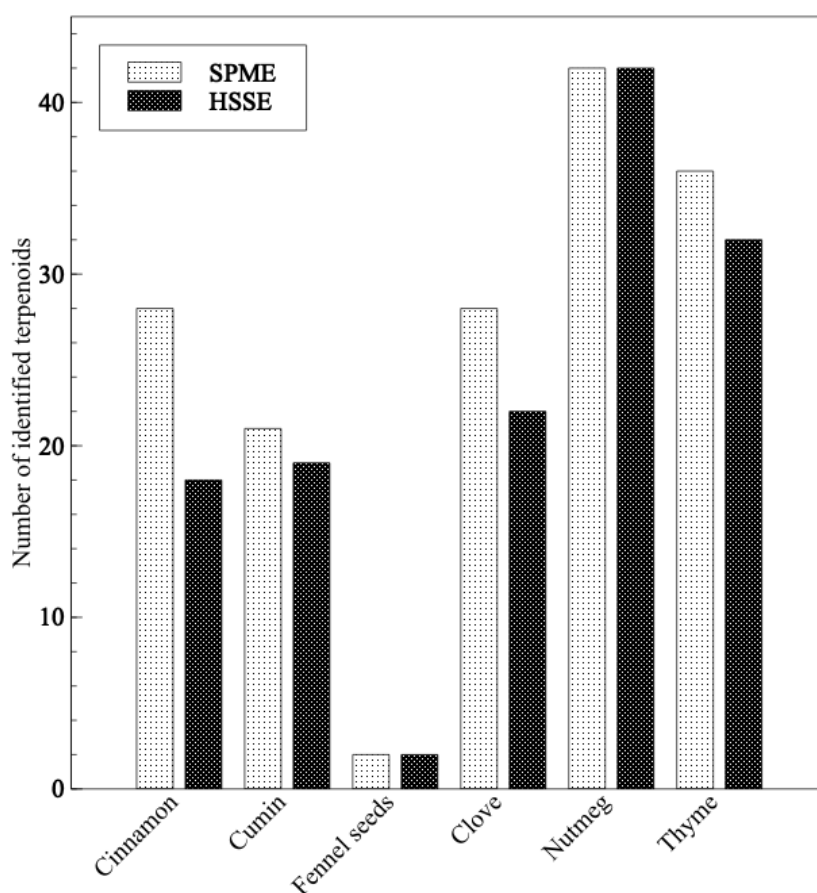


FIGURE III - 12 - Qualitative comparative study between SPME and HSSE for the extraction of terpenoids from seven different food matrices

TABLE III - 13 - Quantitative comparative study between SPME and HSSE for the extraction of terpenoids from seven different spices. Concentrations ( $\mu\text{g/g}$ ) of terpenoids

Compound	Cinnamon		Cumin		Fennel Seeds		Clove		Nutmeg		Thyme	
	SPME	HSSE	SPME	HSSE	SPME	HSSE	SPME	HSSE	SPME	HSSE	SPME	HSSE
$\alpha$ -Pinene	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	986 $\pm$ 57	225 $\pm$ 25	60 $\pm$ 3	46 $\pm$ 9
Camphene	-	-	-	-	-	-	-	-	12.1 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.3	14.6 $\pm$ 0.9	16 $\pm$ 5
$\beta$ -Pinene	-	-	-	2.4 $\pm$ 0.5	-	-	-	-	829 $\pm$ 57	400 $\pm$ 25	7.57 $\pm$ 0.09	6.0 $\pm$ 0.8
3-Carene	-	-	-	-	-	-	-	-	63 $\pm$ 4	39 $\pm$ 4	-	2.3 $\pm$ 0.1
Limonene	-	-	-	-	1.6 $\pm$ 0.1	<LOQ	1.37 $\pm$ 0.04	-	286 $\pm$ 14	363 $\pm$ 13	11.3 $\pm$ 0.4	13.3 $\pm$ 0.6
Eucalyptol	4.5 $\pm$ 0.1	4.3 $\pm$ 0.1	-	-	-	-	2.3 $\pm$ 0.3	-	-	24 $\pm$ 3	110 $\pm$ 4	54 $\pm$ 4
p-Cymene	-	-	5.1 $\pm$ 0.3	7.4 $\pm$ 0.4	-	-	<LOQ	5 $\pm$ 1	84 $\pm$ 4	86 $\pm$ 6	761 $\pm$ 13	738 $\pm$ 75
Camphor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	157 $\pm$ 13	63 $\pm$ 13
Linalool	-	-	-	3.9 $\pm$ 0.3	-	-	16 $\pm$ 1	21 $\pm$ 5	214 $\pm$ 14	173 $\pm$ 8	2414 $\pm$ 329	1338 $\pm$ 88
4-Terpineol	18 $\pm$ 1	7.9 $\pm$ 0.4	13 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	-	-	-	-	1200 $\pm$ 71	1588 $\pm$ 75	139 $\pm$ 3	64 $\pm$ 4
Caryophyllene	3.5 $\pm$ 0.1	6.5 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.5	-	-	686 $\pm$ 71	2738 $\pm$ 75	4.3 $\pm$ 0.3	24 $\pm$ 1	43 $\pm$ 1	88 $\pm$ 5
(Z)- $\beta$ -Farnesene	-	-	-	-	-	-	-	86 $\pm$ 5	-	-	19 $\pm$ 1	-
(E)- $\beta$ -Farnesene	-	-	22 $\pm$ 1	114 $\pm$ 9	-	-	-	-	11.0 $\pm$ 0.9	71 $\pm$ 5	14.7 $\pm$ 0.6	44 $\pm$ 4
Estragole	-	-	-	-	127 $\pm$ 16	39 $\pm$ 2	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Humulene	1.3 $\pm$ 0.1	3.4 $\pm$ 0.1	-	-	-	-	73 $\pm$ 9	375 $\pm$ 25	-	5.4 $\pm$ 0.3	1.73 $\pm$ 0.09	5.5 $\pm$ 0.1
$\alpha$ -Terpineol	50 $\pm$ 1	22.5 $\pm$ 0.5	43.7 $\pm$ 0.9	11.3 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	243 $\pm$ 14	338 $\pm$ 13	90.1 $\pm$ 0.9	58 $\pm$ 3

Borneol	84 ± 1	29 ± 1	-	-	-	-	-	-	-	7.6 ± 0.3	329 ± 14	188 ± 25
α-Farnesene	-	-	-	-	-	-	60 ± 4	263 ± 38	49 ± 3	151 ± 9	-	-
β-Citronellol	-	-	-	-	-	-	-	-	29.6 ± 0.7	17 ± 1	21 ± 7	12 ± 1
Cuminaldehyde	-	-	4043 ± 114	2588 ± 113	-	-	67 ± 10	31 ± 1	-	-	-	6.0 ± 0.3
Anethole	-	-	-	<LOQ	-	-	5.6 ± 0.9	3.6 ± 0.3	15.9 ± 1.3	<LOQ	-	-
Geraniol	43.9 ± 0.4	-	-	-	-	-	-	-	64 ± 3	28 ± 4	67 ± 1	29 ± 1
Thymol	-	-	19 ± 1	7.1 ± 0.6	-	-	-	-	-	-	9143 ± 357	7475 ± 238
Eugenol	-	-	-	-	-	-	125829 ± 10057	68338 ± 2900	291 ± 11	189 ± 8	-	-
Carvacrol	-	-	35.6 ± 0.6	16.4 ± 0.6	-	-	-	738 ± 50	-	51 ± 0.8	7300 ± 400	6425 ± 225

<sup>a</sup> Not extracted or not detected



There are two main differences between the two similar extraction techniques. The first one being the amount of PDMS used: the stir bar is covered with ten times more stationary phase than the fiber (55  $\mu$ L against 0.6  $\mu$ L [72]). The optimized extraction time for HSSE is thus longer (90 min against 60 min for SPME) as there is more PDMS phase to interact with the compounds. For the same reason, HSSE was expected to have a higher extraction efficiency than SPME because of the higher polymer amount that covers the bar. However, the second difference between the two extraction methods is the desorption step: thermal desorption for SPME and liquid desorption for HSSE. As observed on the different food matrices, HSSE has a lower extraction efficiency than SPME, it can be concluded that liquid desorption leads to more compound losses than thermal desorption. Nonetheless, HSSE coupled to liquid desorption still provides highly concentrated extracts of terpenoids while SPME coupled to thermal desorption remains an efficient and sensible analytical method of terpenoids. Besides providing a direct comparison of different extraction methods, our results highlight the high potential of the HSSE and SPME methods to extract a large number of terpenoids in different food matrices.

### *III.3.5. Conclusions*

Chemometric procedure is a very interesting approach for the optimization of extraction conditions. In this study, HSSE and SPME were successfully optimized by experimental design. This approach has made it possible to identify rapidly the influential parameters of the extraction: extraction time and temperature. The detection limits obtained for the compounds studied were adequate for their quantification in spices for both HSSE and SPME. Even though it was found out the SPME extracts more volatile compounds than HSSE while HSSE showed high sensitivity and repeatability for the extraction of terpenes and terpenoids from spices.

### *III.3.6. Acknowledgements*

This work has been financially supported by “Association Nationale Recherche Technologie” with the CIFRE Contract n°2016/0447.

Compliance with Ethical Standards

**Conflict of Interest** Zélie Triaux declares that she has no conflict of interest. Hugues Petitjean declares that he has no conflict of interest. Eric Marchioni declares that he has no conflict of interest. Damien Steyer declares that he has no conflict of interest. Christophe Marcic declares that he has no conflict of interest.

**Ethical Approval** This article does not contain any studies with human participants or animals.

**Informed Consent** Not applicable.

III.3.7. Supplementary information

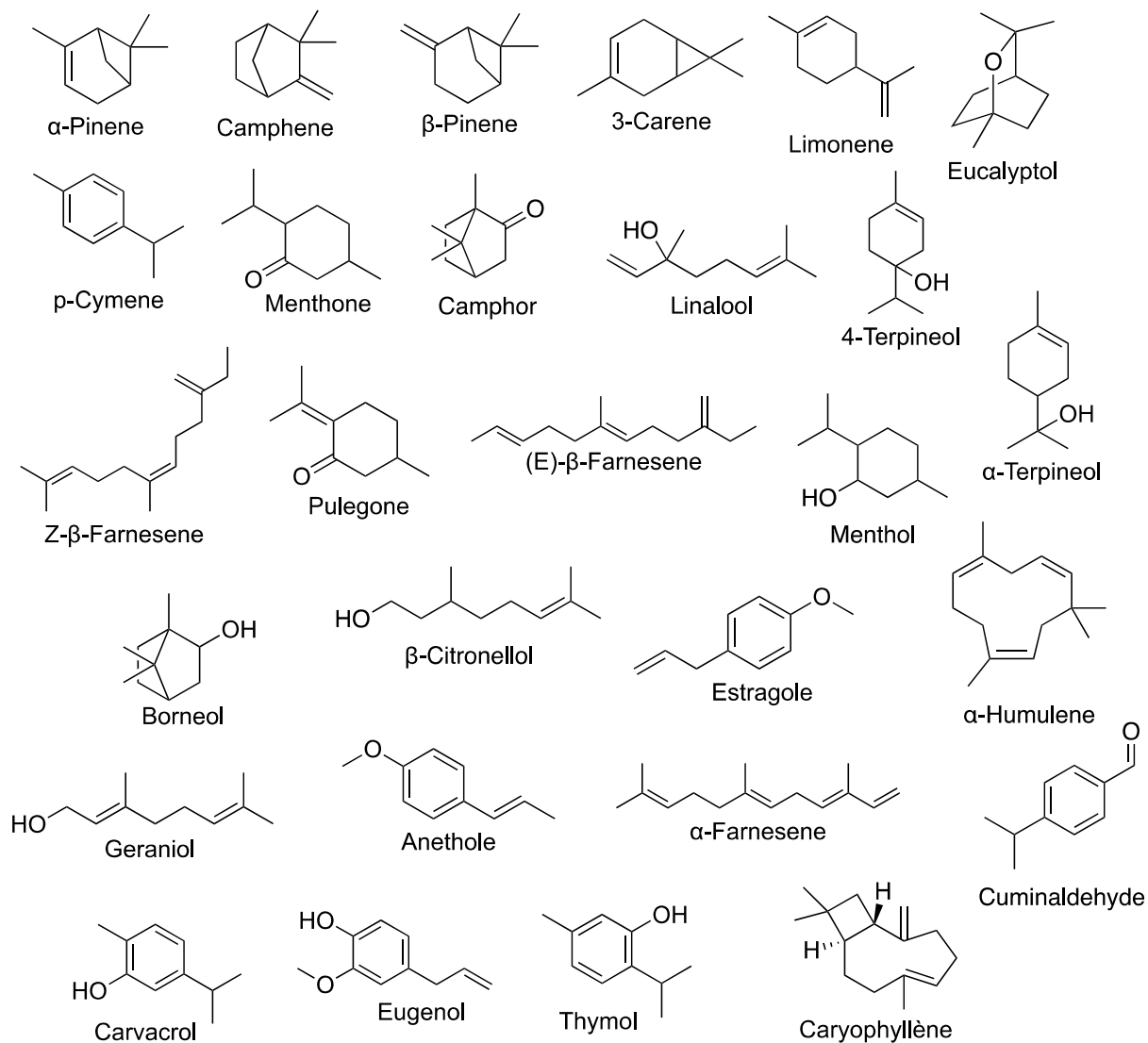


FIGURE III - 13 - Structures of the 28 standards used for the quantification analysis

TABLE III - 14 - Significant regression coefficients and fitting parameters for all 28 responses of the 2<sup>2</sup> Face Centered Design for SPME extraction conditions

Compound	T	t <sub>ext</sub>	Tt <sub>ext</sub>	T <sup>2</sup>	t <sub>ext</sub> <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Q <sup>2</sup>	LoF
α-Pinene	- <sup>a</sup>	ns <sup>b</sup>	+ <sup>c</sup>	ns	ns	0.936	0.557	ns
β-Pinene	-	ns	+	ns	ns	0.906	<0.500	ns
Sabinene	-	ns	+	ns	ns	0.923	0.577	ns
3-Carene	-	ns	ns	ns	ns	0.909	<0.500	ns
β-Myrcene	-	ns	+	ns	ns	0.911	0.560	ns
α-Phellandrene	-	ns	ns	ns	ns	0.849	<0.500	ns
4-Carene	-	ns	+	ns	ns	0.918	<0.500	ns
Limonene	-	ns	+	ns	ns	0.934	0.554	ns
β-Phellandrene	-	+	+	+	ns	0.980	0.905	ns
γ-Terpinene	-	ns	+	ns	ns	0.881	<0.500	ns
p-Cymene	-	+	ns	ns	ns	0.864	<0.500	ns
Terpinolene	-	ns	ns	ns	ns	0.807	<0.500	ns
α-Cubebene	+	+	ns	+	ns	0.968	0.803	ns
Copaene	+	+	ns	+	ns	0.975	0.810	ns
Linalool	+	ns	ns	ns	ns	<0.800	<0.500	ns
Bornyl acetate	ns	+	+	+	+	0.917	<0.500	ns
4-Terpineol	+	+	+	+	ns	0.968	0.853	ns
Caryophyllene	+	+	ns	+	ns	0.989	0.953	ns
α-Terpineol	+	+	+	+	+	0.991	0.947	ns
α-Terpineol acetate	+	+	ns	+	ns	0.988	0.964	ns
Geranyl acetate	+	+	ns	ns	ns	0.992	0.964	ns
δ-Cadinene	+	+	ns	ns	ns	0.991	0.950	ns
Safrole	+	+	+	+	+	0.969	0.882	ns
Methyl eugenol	+	+	+	ns	ns	0.995	0.964	ns
Eugenol	+	+	+	+	ns	0.994	0.947	ns
Isoeugenol methyl ether	+	+	ns	ns	ns	0.972	0.745	ns
Elemicin	+	+	ns	ns	ns	0.987	0.927	ns
Myristicine	+	+	ns	ns	ns	0.990	0.972	ns

T: extraction temperature, t<sub>ext</sub>: extraction time, LoF: lack of fit

<sup>a</sup> Negative effect

<sup>b</sup> Not significant

<sup>c</sup> Positive effect

TABLE III - 15 - Significant regression coefficients and fitting parameters for all 28 responses of the 2<sup>2</sup> Face Centered Design for HSSE extraction conditions

Compound	T	t <sub>ext</sub>	Tt <sub>ext</sub>	T <sup>2</sup>	t <sub>ext</sub> <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Q <sup>2</sup>	LoF
α-Pinene	- <sup>a</sup>	ns <sup>b</sup>	ns	ns	-	0.896	0.677	ns
β-Pinene	-	ns	ns	ns	-	0.944	0.785	ns
Sabinene	-	ns	ns	ns	-	0.950	0.800	ns
3-Carene	-	ns	ns	ns	-	0.951	0.811	ns
β-Myrcene	-	ns	ns	ns	-	0.964	0.830	ns
α-Phellandrene	-	ns	ns	ns	-	0.931	0.772	ns
4-Carene	-	ns	ns	ns	-	0.927	0.753	ns
Limonene	-	ns	ns	ns	-	0.970	0.887	ns
β-Phellandrene	-	ns	ns	ns	-	0.976	0.903	ns
γ-Terpinene	-	ns	ns	ns	-	0.952	0.811	ns
p-Cymene	-	ns	ns	ns	-	0.972	0.888	ns
Terpinolene	-	ns	ns	ns	-	0.958	0.827	ns
α-Cubebene	+ <sup>c</sup>	+	ns	ns	ns	0.941	<0.500	ns
Copaene	+	+	ns	ns	ns	0.969	0.803	ns
Linalool	ns	ns	ns	ns	ns	<0.800	<0.500	ns
Bornyl acetate	-	+	ns	ns	ns	0.950	0.566	ns
4-Terpineol	+	+	ns	ns	ns	0.878	<0.500	0.01
Caryophyllene	+	+	ns	ns	ns	0.971	0.784	ns
α-Terpineol	+	+	ns	ns	ns	0.913	<0.500	0.03
α-Terpineol acetate	+	+	ns	ns	ns	0.968	0.796	ns
Geranyl acetate	+	+	ns	ns	ns	0.982	0.872	ns
δ-Cadinene	+	+	+	ns	ns	0.987	0.952	ns
Safrole	+	+	ns	ns	ns	0.930	0.525	ns
Methyl eugenol	+	+	ns	ns	ns	0.980	0.885	ns
Eugenol	+	+	ns	ns	ns	0.956	0.725	ns
Eugenol methyl ether	+	+	ns	ns	ns	0.977	0.873	ns
Elemicin	+	+	+	+	ns	0.982	0.917	ns
Myristicine	+	+	+	ns	ns	0.976	0.879	ns

T: extraction temperature, t<sub>ext</sub>: extraction time, LoF: lack of fit

<sup>a</sup> Negative effect

<sup>b</sup> Not significant

<sup>c</sup> Positive effect

TABLE III - 16 - Composition of cinnamon extracts obtained by SPME and HSSE

Compound	Peak area (%)	
	SPME	HSSE
Eucalyptol	<0.01	<0.01
Copaene	5.013	0.784
$\alpha$ -Gurjunene	0.095	- <sup>a</sup>
Cyclosativene	0.129	-
$\alpha$ -Begamotene	0.700	0.094
Bornyl acetate	-	0.183
4-Terpineol	0.447	0.109
Caryophyllene	2.286	0.346
Alloraromadendrene	0.366	-
$\alpha$ -Humulene	1.381	0.102
$\alpha$ -Terpineol	0.233	0.233
$\alpha$ -Muurolene	1.685	0.256
Borneol	0.566	0.352
$\alpha$ -Amorphene	1.128	0.118
$\gamma$ -Muurolene	8.531	1.349
$\beta$ -Selinene	0.191	-
$\delta$ -Cadinene	9.161	1.354
$\gamma$ -Cadinene	0.366	-
$\alpha$ -Curcumene	0.251	-
Anethole	0.368	-
Geraniol	0.131	-
Calamenene	5.439	1.147
$\alpha$ -Calacorene	1.297	0.273
Cinnamaldehyde	33.437	87.814
Cubenol	1.993	0.575
T-Muurool	2.161	0.523
T-Cadinol	1.508	-
Cadalene	1.572	-
$\alpha$ -Cadinol	0.562	-

<sup>a</sup> Not extracted or not detected

TABLE III - 17 - Composition of cumin extracts obtained by SPME and HSSE

Compound	Peak area (%)	
	SPME	HSSE
$\beta$ -Pinene	- <sup>a</sup>	<0.01
$\gamma$ -Terpinene	0.689	0.379

p-Cymene	0.386	0.333
Copaene	2.004	0.667
Linalool	-	<0.01
1-Terpineol	0.094	0.136
trans- $\alpha$ -Bergamotene	0.881	0.180
4-Terpineol	<0.01	0.149
Caryophyllene	1.563	0.467
(E)- $\beta$ -Farnesene	1.726	0.447
$\alpha$ -Terpineol	0.160	0.145
di-epi- $\alpha$ -Cedrene	3.474	1.203
Germacrene D	0.822	-
$\alpha$ -Himachalene	0.644	-
Phellandral	0.347	0.292
$\beta$ -Chamigrene	0.355	-
Cuminaldehyde	64.621	77.226
Anethole	-	<0.01
Caryophyllene oxide	0.230	-
Carotol	1.015	0.347
Cuminic alcool	1.045	1.182
Spathunelol	0.215	-
Thymol	<0.01	<0.01
Carvacrol	0.380	0.266

<sup>a</sup> Not extracted or not detected

TABLE III - 18 - Composition of fennel seeds extracts obtained by SPME and HSSE

Compound	Peak area (%)	
	SPME	HSSE
Limonene	0.523	<0.01
Estragole	47.114	62.073

TABLE III - 19 - Composition of clove extracts obtained by SPME and HSSE

Compound	Peak area (%)	
	SPME	HSSE
Limonene	<0.01	- <sup>a</sup>
Eucalyptol	<0.01	-
p-Cymene	<0.01	<0.01
Ylangene	0.033	-
Copaene	0.787	0.261
Linalool	<0.01	0.021

$\alpha$ -Gurjunene	0.011	-
$\beta$ -Elemene	0.013	-
Caryophyllene	34.489	14.115
(Z)- $\beta$ -Farnesene	-	0.023
Alloaromadendrene	0.062	0.025
$\alpha$ -Humulene	4.078	1.538
$\alpha$ -Muurolene	0.258	0.097
$\alpha$ -Amorphene	0.119	0.022
$\gamma$ -Muurolene	0.073	-
Valencene	0.070	-
$\beta$ -Selinene	0.094	0.026
$\alpha$ -Farnesene	0.299	0.105
$\delta$ -Cadinene	0.750	0.240
$\gamma$ -Cadinene	0.174	0.042
Methyl salicylate	0.114	0.089
Cuminaldehyde	0.082	0.079
Anethole	0.018	0.010
Calamenene	0.044	0.016
$\alpha$ -Calacorene	0.027	0.011
Caryophyllene oxide	0.348	0.159
Cubenol	0.035	-
Eugenol	47.259	75.583
Eugenyl acetate	8.789	6.139
Carvacrol	-	0.758

<sup>a</sup> Not extracted or not detected

TABLE III - 20 - Composition of nutmeg extracts obtained by SPME and HSSE

Compound	Peak area (%)	
	SPME	HSSE
$\alpha$ -Pinene	9.152	0.916
Camphene	0.097	0.020
$\beta$ -Pinene	7.596	2.128
Sabinene	22.799	5.772
3-Carene	0.708	0.417
$\beta$ -Myrcene	1.807	0.825
$\alpha$ -Phellandrene	0.898	0.288
4-Carene	1.796	1.196
Limonene	4.146	2.965
$\beta$ -Phellandrene	3.052	1.998
Eucalyptol	- <sup>a</sup>	0.163

$\gamma$ -Terpinene	3.246	3.344
p-Cymene	1.079	1.396
Terpinolene	1.459	1.622
$\alpha$ -Cubebene	0.360	0.205
$\delta$ -Elemene	0.165	-
Copaene	1.201	1.439
Linalool	0.299	0.811
1-Terpineol	1.337	5.177
Bornyl acetate	0.330	0.587
trans- $\alpha$ -Bergamotene	0.391	0.259
$\beta$ -Elemene	0.090	-
4-Terpineol	2.517	10.108
Caryophyllene	0.580	0.537
(E)- $\beta$ -Farnesene	0.161	0.098
$\alpha$ -Humulene	-	0.095
$\alpha$ -Terpineol	0.357	1.416
Borneol	-	<0.01
$\alpha$ -Terpineol acetate	0.438	0.858
$\alpha$ -Amorphene	0.484	-
$\alpha$ -Himachalene	0.251	0.114
$\alpha$ -Farnesene	0.157	0.311
Geranyl acetate	0.353	0.557
$\beta$ -Citronellol	<0.01	0.055
$\delta$ -Cadinene	0.336	0.234
Anethole	0.108	<0.01
Geraniol	0.020	0.048
p-Cymen-8-ol	-	0.119
Calamenene	0.041	-
Safrole	2.389	8.052
Methyl eugenol	3.583	9.051
Cubenol	0.026	-
Eugenol	0.324	0.893
Isoeugenol methyl ether	1.096	1.728
Carvacrol	-	0.041
Elimicin	7.812	5.995
Myristicine	13.053	20.009

<sup>a</sup> Not extracted or not detected



TABLE III - 21 - Composition of thyme extracts obtained by SPME and HSSE

Compound	Peak area (%)	
	SPME	HSSE
$\alpha$ -Pinene	0.521	0.186
Camphene	0.213	0.124
$\beta$ -Pinene	0.049	<0.01
3-Carene	- <sup>a</sup>	<0.01
$\beta$ -Myrcene	0.289	0.140
$\alpha$ -Terpinene	0.688	0.302
Limonene	0.198	0.114
Eucalyptol	0.737	0.426
$\gamma$ -Terpinene	5.538	1.961
p-Cymene	20.520	10.893
Linalool oxide	0.061	0.088
Ylangene	0.056	-
Copaene	0.190	0.051
Camphor	<0.01	0.209
Linalool	6.389	6.922
$\alpha$ -Gurjunene	0.041	-
1-Terpineol	0.110	-
Linalyl acetate	0.479	0.613
Thymol methylether	1.291	0.668
4-Terpineol	0.599	0.462
Caryophyllene	8.849	2.098
(Z)- $\beta$ -Farnesene	0.122	-
(E)- $\beta$ -Farnesene	0.292	0.038
$\alpha$ -Humulene	0.472	0.082
$\alpha$ -Terpineol	0.189	0.230
$\alpha$ -Muurolene	0.532	0.106
Borneol	0.648	0.791
$\alpha$ -Himachalene	0.165	-
$\gamma$ -Muurolene	0.212	-
$\beta$ -Citronellol	0.046	<0.01
$\delta$ -Cadinene	0.840	0.167
$\gamma$ -Cadinene	0.846	0.154
Cuminaldehyde	-	<0.01
Geraniol	0.051	0.052
Calamenene	0.320	0.145
Caryophyllene oxide	1.441	0.613
Thymol	22.111	36.647
Carvacrol	18.485	33.097

<sup>a</sup> Not extracted or not detected

## III.4. RÉFÉRENCES

- [1] S. Zwenger, C. Basu, Plant terpenoids: applications and future potentials, *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 3 (2008) 1–7.
- [2] W. Schwab, C. Fuchs, F.C. Huang, Transformation of terpenes into fine chemicals, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 115 (2013) 3–8.
- [3] D. Trombetta, F. Castelli, M.G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti, G. Bisignano, Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 2474–2478.
- [4] A. Koziol, A. Stryjewska, T. Librowski, K. Sałat, M. Gawel, A. Moniczewski, S. Lochyński, An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes, *Mini-Reviews Med. Chem.* 14 (2014) 1156–1168.
- [5] S. Yano, Y. Suzuki, M. Yuzurihara, Y. Kase, S. Takeda, S. Watanabe, M. Aburada, K.-I. Miyamoto, Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 553 (2006) 99–103.
- [6] D. V Fonsêca, P.R.R. Salgado, H. de C. Aragão Neto, A.M.F.O. Golzio, M.R.D. Caldas Filho, C.G.F. Melo, F.C. Leite, M.R. Piuvezam, L.C. de M. Pordeus, J.M. Barbosa Filho, R.N. Almeida, Ortho-eugenol exhibits anti-nociceptive and anti-inflammatory activities, *Int. Immunopharmacol.* 38 (2016) 402–408.
- [7] N.F. Salakhutdinov, K.P. Volcho, O.I. Yarovaya, Monoterpenes as a renewable source of biologically active compounds, *Pure Appl. Chem.* 89 (2017) 1105–1117.
- [8] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, *J. Nat. Prod.* 70 (2007) 461–477.
- [9] R.M. Smith, Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques, *J. Chromatogr. A.* 1000 (2003) 3–27.
- [10] V.F. Péres, J. Saffi, M.I.S. Melecchi, F.C. Abad, R. De Assis Jacques, M.M. Martinez, E.C. Oliveira, E.B. Caramão, Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth, *J. Chromatogr. A.* 1105 (2006) 115–118.
- [11] S.M. Kéita, C. Vincent, J.P. Schmit, A. Blanger, Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L., *O. gratissimum* L. and *O. suave* L. in the Republic of Guinea, *Flavour Fragr. J.* 15 (2000) 339–341.
- [12] D. Lorenzo, E. Dellacassa, I. Bonaccorsi, L. Mondello, Uruguayan essential oils. Composition of leaf oil of *Myrcianthes cisplatensis* (Camb.) Berg. ('Guayabo colorado') (Myrtaceae), *Flavour Fragr. J.* 16 (2001) 97–99.
- [13] K. Kerrola, B. Galambosi, H. Kallio, Characterization of volatile composition and odor of angelica (*Angelica archangelica* Subsp. *archangelica* L.) root extracts, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1979–1988.
- [14] M.I.S. Melecchi, M.M. Martinez, F.C. Abad, P.P. Zini, I. do Nascimento Filho, E.B. Caramão, Chemical composition of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers: A study of extraction methods, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 86–90.
- [15] M.D. Luque De Castro, L.E. Gariá-Ayuso, Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future, *Anal. Chim. Acta.* 369 (1998) 1–10.
- [16] B.E. Richter, B.A. Jones, J.L. Ezzell, N.L. Porter, N. Avdalovic, C. Pohl, Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1033–1039.
- [17] J. Fojtová, L. Lojková, V. Kubáň, GC/MS of terpenes in walnut-tree leaves after accelerated solvent extraction, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 162–168.
- [18] R. Rodríguez-Solana, J.M. Salgado, J.M. Domínguez, S. Cortés-Diéguez, Comparison of soxhlet, accelerated solvent and supercritical fluid extraction techniques for volatile (GC-MS and GC/FID) and phenolic compounds (HPLC-ESI/MS/MS) from lamiaceae species, *Phytochem. Anal.* 26 (2015) 61–71.
- [19] D.W. Byrd, D. Freeman, Automated static headspace sampler for gas chromatography, *J. Chromatogr. A.* 686 (1994) 235–243.
- [20] L. Caron, A. Deslauriers, V. Mshvildadze, A. Pichette, Volatile compounds in the foliage of balsam fir analyzed by static headspace gas chromatography (HS-GC): An example of the spruce budworm defoliation effect in the boreal forest of Quebec, Canada, *Microchem. J.* 110 (2013) 587–590.
- [21] E.-J. Jeong, S.H. Lee, B.-T. Kim, G. Lee, S.S. Yun, H.S. Lim, Y.-S. Kim, An analysis method for determining residual hexane in health functional food products using static headspace gas chromatography, *Food Sci. Biotechnol.* 26 (2017) 363–368.
- [22] P.S. Chatzopoulou, S.T. Katsiotis, Headspace analysis of the volatile constituents from *Juniperus communis* L. "berries" (cones) grown wild in Greece, *Flavour Fragr. J.* 21 (2006) 492–496.
- [23] R. Rodríguez-Maecker, E. Vyhmeister, S. Meisen, A. Rosales Martinez, A. Kuklya, U. Telgheder, Identification of

- terpenes and essential oils by means of static headspace gas chromatography-ion mobility spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 6595–6603.
- [24] U.M. Senanayake, T.H. Lee, R.B.H. Wills, Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils, *J. Agric. Food Chem.* 26 (1969) 822–824.
- [25] M. Kazemi, Phytochemical composition of *Thymus vulgaris* L. essential oil, *J. Essent. Oil Bear. Plants.* 18 (2016) 751–753.
- [26] R. Li, Z.T. Jiang, Chemical composition of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. from China, *Flavour Fragr. J.* 19 (2004) 311–313.
- [27] W.-R. Diao, Q.-P. Hu, H. Zhang, J.-G. Xu, Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), *Food Control.* 35 (2014) 109–116.
- [28] L. Jirovetz, G. Buchbauer, I. Stoilova, A. Stoyanova, A. Krastanov, E. Schmidt, Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 6303–6307.
- [29] G.I.C. Simpson, Y.A. Jackson, Comparison of the chemical composition of East Indian, Jamaican and other West Indian essential oils of *Myristical fragrans* Houtt., *J. Essent. Oil Res.* 14 (2002) 6–9.
- [30] S.M. Njoroge, N.T.L. Phi, M. Sawamura, Chemical composition of peel essential oils of sweet oranges (*Citrus sinensis*) from Uganda and Rwanda, *J. Essent. Oil-Bearing Plants.* 12 (2009) 26–33.
- [31] V.P. Rao, H.S. Gan, Cinnamon: A multifaceted medicinal plant, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2014 (2014) 1–12.
- [32] E. Mancini, F. Senatore, D. Del Monte, L. De Martino, D. Grulova, M. Scognamiglio, M. Snoussi, V. De Feo, Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five *Thymus vulgaris* L. essential oils, *Molecules.* 20 (2015) 12016–12028.
- [33] R. Johri, *Cuminum cyminum* and *Carum carvi*: An update, *Pharmacogn. Rev.* 5 (2011) 63–72.
- [34] M.A. Rather, B.A. Dar, S.N. Sofi, B.A. Bhat, M.A. Qurishi, *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety, *Arab. J. Chem.* 9 (2016) S1574–S1583.
- [35] V. Adiani, S. Gupta, S. Chatterjee, P.S. Variyar, A. Sharma, Activity guided characterization of antioxidant components from essential oil of Nutmeg (*Myristica fragrans*), *J. Food Sci. Technol.* 52 (2015) 221–230.
- [36] C. Torres-Alvarez, A. Núñez González, J. Rodríguez, S. Castillo, C. Leos-Rivas, J.G. Báez-González, Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils, *CyTA - J. Food.* 15 (2016) 129–135.
- [37] M. Santana De Oliveira, W. Almeida Da Costa, D. Santiago Pereira, R. Santos Botelho, T. Oliveira De Alencar Menezes, E. Helena De Aguiar Andrade, S. Helena, M. Da Silva, A. Pedro, D. Silva, S. Filho, R. Nunes De Carvalho Junior, Chemical composition and phytotoxic activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil obtained with supercritical CO<sub>2</sub>, *J. Supercrit. Fluids.* 118 (2016) 185–193.
- [38] A.L. Dawidowicz, E. Rado, D. Wianowska, M. Mardarowicz, J. Gawdzik, Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L, *Talanta.* 76 (2008) 878–884.
- [39] H. Van den Dool, P.D. Kratz, A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *J. Chromatogr.* 11 (1963) 463.
- [40] D. Helmig, T. Revermann, J. Pollmann, O. Kaltschmidt, J. Hernandez, F. Bocquet, D. David, Calibration system and analytical considerations for quantitative sesquiterpene measurements in air, *J. Chromatogr. A.* 1002 (2003) 193.
- [41] E. Abilleira, M. de Renobales, A.I. Nájera, M. Virto, J.C.R. de Gordo, F.J. Pérez-Elortondo, M. Albisu, L.J.R. Barron, An accurate quantitative method for the analysis of terpenes in milk fat by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry, *Food Chem.* 120 (2010) 1162–1169.
- [42] D. Gallart-Mateu, S. Rodriguez-Sojo, M. De La Guardia, Determination of tea tree oil terpenes by headspace gas chromatography mass spectrometry, *Anal. Methods.* 8 (2016) 4576–4583.
- [43] E.A. Ibrahim, M. Wang, M.M. Radwan, A.S. Wanas, C.G. Majumdar, B. Avula, Y.-H. Wang, I.A. Khan, S. Chandra, H. Lata, G.M. Hadad, R.A. Abdel Salam, A.K. Ibrahim, S.A. Ahmed, M.A. ElSohly, Analysis of terpenes in *cannabis sativa* L. using GC/MS: method development, validation, and application, *Planta Med.* 85 (2019) 431–438.
- [44] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2642–2666.
- [45] J.I. Cacho, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba, Evaluation of three headspace sorptive extraction coatings for the determination of volatile terpenes in honey using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1399 (2015) 18–24.

- [46] H. Prosen, M. Kokalj, D. Janeš, S. Kreft, Comparison of isolation methods for the determination of buckwheat volatile compounds, *Food Chem.* 121 (2010) 298–306.
- [47] A. Yashin, Y. Yashin, X. Xia, B. Nemzer, Antioxidant activity of spices and their impact on human health: A review, *Antioxidants.* 6 (2017) 1–18.
- [48] E.I. Opara, M. Chohan, Culinary herbs and spices: Their bioactive properties, the contribution of polyphenols and the challenges in deducing their true health benefits, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 19183–19202.
- [49] K. Srinivasan, Plant foods in the management of diabetes mellitus: Spices as beneficial antidiabetic food adjuncts, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 56 (2005) 299–414.
- [50] C.M. Kaefler, J.A. Milner, The role of herbs and spices in cancer prevention, *J. Nutr. Biochem.* 19 (2008) 347–361.
- [51] N.K. Rakhi, R. Tuwani, J. Mukherjee, G. Bagler, Data-driven analysis of biomedical literature suggests broad-spectrum benefits of culinary herbs and spices, *PLoS One.* 13 (2018) 1–20.
- [52] D.P. De Sousa, Analgesic-like activity of essential oils constituents, *Molecules.* 16 (2011) 2234–2252.
- [53] C.F. Forney, J. Song, Flavors and aromas: Chemistry and biological functions, in: *Fruit Veg. Phytochem. Chem. Hum. Heal. Second Ed.*, 2017: pp. 515–539.
- [54] H.H. Jeleń, M. Majcher, M. Dziadas, Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review, *Anal. Chim. Acta.* 738 (2012) 13–26.
- [55] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737–747.
- [56] F. David, P. Sandra, Stir bar sorptive extraction for trace analysis, *J. Chromatogr. A.* 1152 (2007) 54–69.
- [57] C. Bicchi, E. Liberto, M. Matteodo, B. Sgorbini, L. Mondello, B. d'Acampora Zellner, R. Costa, P. Rubiolo, Quantitative analysis of essential oils: a complex task, *Flavour Fragr. J.* 23 (2008) 382–391.
- [58] B.T. Weldegergis, A.G.J. Tredoux, A.M. Crouch, Application of a headspace sorptive extraction method for the analysis of volatile components in south african wines, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 8696–8702.
- [59] C. Barba, T. Thomas-Danguin, E. Guichard, Comparison of stir bar sorptive extraction in the liquid and vapour phases, solvent-assisted flavour evaporation and headspace solid-phase microextraction for the (non)-targeted analysis of volatiles in fruit juice, *LWT - Food Sci. Technol.* 85 (2017) 334–344.
- [60] K. Hevia, R. Castro, R. Natera, Juan, A. González García, Carmelo, G. Barroso, E. Durán Guerrero, Optimization of head space sorptive extraction to determine volatile compounds from oak wood in fortified wines, *Chromatographia.* 79 (2016) 763–771.
- [61] E. Robotti, F. Campo, M. Riviello, M. Bobba, M. Manfredi, E. Mazzucco, F. Gosetti, G. Calabrese, E. Sangiorgi, E. Marengo, Optimization of the extraction of the volatile fraction from honey samples by SPME-GC-MS, experimental design, and multivariate target functions, *J. Chem.* 2017 (2017) 1–14.
- [62] C. Rodrigues, F.C.M. Portugal, J.M.F. Nogueira, Static headspace analysis using polyurethane phases – Application to roasted coffee volatiles characterization, *Talanta.* 89 (2012) 521–525.
- [63] C. Stalikas, Y. Fiamegos, V. Sakkas, T. Albanis, Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 175–189.
- [64] S.I. Abdelwahab, A.A. Mariod, M. Mohamed, E. Taha, F.Q. Zaman, A. Hassan, A. Abdelmageed, S. Khamis, Y. Sivasothy, K. Awang, Chemical composition and antioxidant properties of the essential oil of *Cinnamomum altissimum* Kosterm. (Lauraceae), *Arab. J. Chem.* 10 (2017) 131–135.
- [65] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escaleira, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta.* 76 (2008) 965–977.
- [66] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, sa Nyström, J. Pettersen, R. Bergma, Experimental design and optimization, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 42 (1998) 3–40.
- [67] K. Patel, C. Ruiz, R. Calderon, M. Marcelo, R. Rojas, Characterisation of volatile profiles in 50 native Peruvian chili pepper using solid phase microextraction–gas chromatography mass spectrometry (SPME–GCMS), *Food Res. Int.* 89 (2016) 471–475.
- [68] H.H. Jeleń, A. Gracka, Analysis of black pepper volatiles by solid phase microextraction-gas chromatography: A comparison of terpenes profiles with hydrodistillation, *J. Chromatogr. A.* 1418 (2015) 200–209.
- [69] W. Wardencki, J. Curyło, J. Namieśnik, Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70 (2007) 275–288.
- [70] E.D. Guerrero, R.N. Marín, R.C. Mejías, C.G. Barroso, Optimisation of stir bar sorptive extraction applied to the determination of volatile compounds in vinegars, *J. Chromatogr. A.* 1104 (2006) 47–53.
- [71] C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, B. Sgorbini, P. Sandra, Impact of phase ratio, polydimethylsiloxane

- volume and size, and sampling temperature and time on headspace sorptive extraction recovery of some volatile compounds in the essential oil field, *J. Chromatogr. A.* 1071 (2005) 111–118.
- [72] C. Bicchi, C. Iori, P. Rubiolo, P. Sandra, Headspace Sorptive Extraction ( HSSE ), Stir Bar Sorptive Extraction ( SBSE ), and Solid Phase Microextraction ( SPME ) applied to the analysis of roasted arabica coffee and coffee brew, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 449–459.
- [73] L. Sghaier, J. Vial, P. Sassiati, D. Thiebaut, M. Watiez, S. Breton, D.N. Rutledge, C.B.Y. Cordella, An overview of recent developments in volatile compounds analysis from edible oils: Technique-oriented perspectives, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118 (2016) 1853–1879.



---

## CHAPITRE IV

# ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DES EXTRAITS TERPENIQUES DE PLANTES

---





## CHAPITRE IV – ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DES EXTRAITS TERPENIQUES DE PLANTES

L'objectif de ce chapitre est de mesurer l'activité anti-inflammatoire de différents extraits de plantes. L'activité anti-inflammatoire de deux plantes peu communes, le *Calamintha nepeta* et l'*Asarum europaeum*, a été comparée à celle de deux plantes couramment utilisées pour leurs propriétés biologiques, le *Thymus vulgaris* et la *Mentha piperita*.

Dans un premier temps, différents paramètres du test anti-inflammatoire *in vitro* ont été étudiés, à savoir la concentration minimum en lipopolysaccharide (LPS) nécessaire pour induire la sécrétion du facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et le pourcentage maximum d'éthanol à utiliser sans influence sur le test biologique. Puis les extraits des 4 plantes étudiées obtenus par PLE et par HSSE ont été analysés et testés pour leur activité anti-inflammatoire. La composition des extraits d'*Asarum europaeum* était faible en composés volatils. Le composé majoritaire des extraits de *Calamintha nepeta* obtenus est le pulégone. La structure chimique du pulégone est très proche de celle du menthol, composé connu notamment pour son activité analgésique mais aussi anti-inflammatoire [1]. Le menthol est présent en grande quantité dans les extraits de *Mentha piperita* et aussi en plus faible quantité dans les extraits de *Calamintha nepeta*. Les activités anti-inflammatoire du pulégone et du menthol purs ont été mesurées et comparées à celles des extraits de plantes afin d'évaluer si ces molécules présentes en grande quantité dans les extraits peuvent être responsables de l'activité de l'extrait ou si la présence d'autres composés dans les extraits permet de moduler l'activité anti-inflammatoire de celui-ci. L'activité anti-inflammatoire de l'eugénol, composé majoritaire du clou de girofle, a aussi été évaluée. L'eugénol, très utilisé en odontologie, est reconnu pour sa forte activité anti-inflammatoire [2]. Ainsi l'activité anti-inflammatoire du pulégone, très peu étudiée, a pu être comparée à celle de deux composés fortement anti-inflammatoire, le menthol et l'eugénol. Chaque test d'activité anti-inflammatoire est aussi accompagné d'une mesure de toxicité des extraits et des composés purs. En effet, si l'activité anti-inflammatoire d'un extrait s'accompagne d'une toxicité importante pour les cellules, l'étude de celui-ci n'a pas grand intérêt.

### IV.1. OPTIMISATION DE DIFFERENTS PARAMETRES DU TEST ANTI-INFLAMMATOIRE

La lignée de monocytes humains THP-1 a été utilisée pour réaliser les tests anti-inflammatoires car il a été démontré qu'une stimulation au LPS sur les cellules THP-1 conduit à la production mais aussi à la libération extracellulaire de cytokines inflammatoires et notamment du TNF- $\alpha$  [3,4]. Ainsi les cellules THP-1 sont un modèle *in vitro* approprié pour étudier l'activité anti-inflammatoire de différents composés. L'activité anti-inflammatoire mesurée dans cette étude est liée au potentiel inhibiteur de la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les composés présents dans les extraits de plantes.

La présence de TNF- $\alpha$  dans le milieu extracellulaire est mesurée par cytométrie en flux. Pour chaque analyse, un cytogramme est obtenu représentant les cellules en fonctions de leur fluorescence. Comme expliqué précédemment (chapitre II), l'utilisation d'anticorps spécifiques au TNF- $\alpha$  possédant un fluorochrome jaune (la R-phycoérythrine) permet de suivre la quantité de TNF- $\alpha$  présente dans le milieu cellulaire. L'ajout d'un colorant intercalant de l'ADN fluorescent rouge, l'iodure de propidium, permet d'identifier les cellules mortes par intégrité membranaire. Ainsi les cellules mortes sont exclues de la mesure et l'activité anti-inflammatoire de l'extrait n'est évaluée que pour les cellules vivantes. Les cytogrammes de la FIGURE IV - 1 montrent la démarche utilisée pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits. Un extrait anti-inflammatoire va inhiber la sécrétion de TNF- $\alpha$  au sein de la cellule, ce qui va se traduire par une baisse importante de la fluorescence jaune sur le cytogramme correspondant par rapport aux contrôles positifs. Un extrait toxique pour les cellules va se traduire par une hausse importante de la fluorescence rouge. Le pourcentage de fluorescence jaune traduit ainsi le potentiel anti-inflammatoire de l'extrait tandis que le pourcentage de fluorescence rouge reflète sa toxicité.

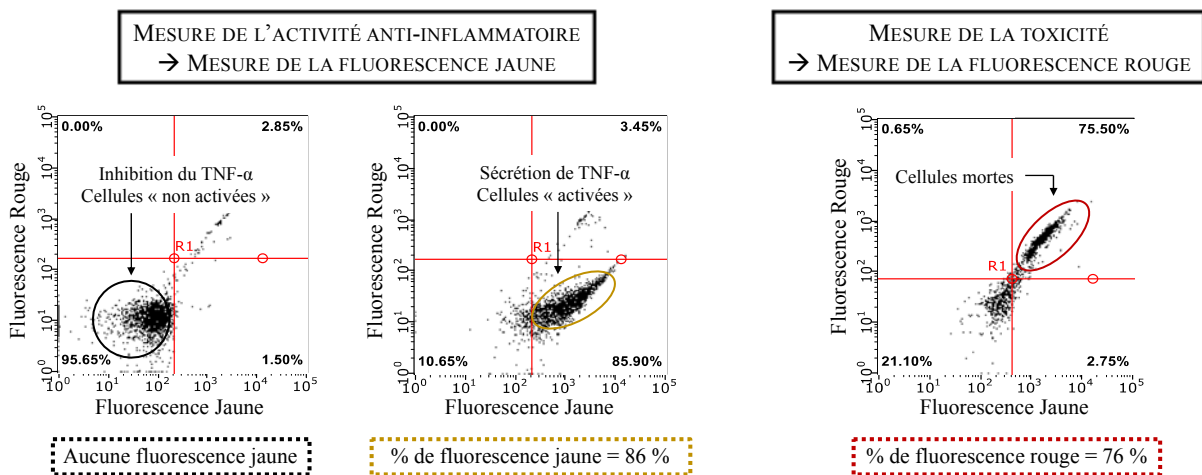


FIGURE IV - 1 - Démarche d'analyse des résultats obtenus par cytométrie en flux pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire

La FIGURE IV - 2 montre les différents contrôles utilisés pour mesurer l'activité anti-inflammatoire des extraits. Le célastrol, à une concentration de 0,5  $\mu$ M, a été utilisé comme contrôle positif de l'inhibition de la sécrétion de TNF- $\alpha$ . Le célastrol diminue la quantité de TNF- $\alpha$  présente dans le milieu extracellulaire, seulement 15 % des cellules ont une fluorescence jaune, et donc sécrètent du TNF- $\alpha$  en présence de cette molécule. Un deuxième contrôle positif correspondant aux cellules non stimulées par le LPS est utilisé permettant de suivre l'efficacité de l'activation des cellules par le LPS. Ce contrôle permet de déterminer la limite entre les cellules non activées et celles activées sur le cytogramme en fonction de leur fluorescence jaune. En effet, le contrôle non stimulé au LPS correspond à une fluorescence jaune proche de 0. Inversement, un contrôle négatif stimulé au LPS ne contenant ni solvant, ni extrait, est utilisé pour évaluer le pourcentage maximum de cellules activées

en fonction du contrôle positif sans activation. Dans la FIGURE IV - 2, les cellules vivantes ont presque toutes été activées par le LPS (90 %). Enfin, un dernier contrôle négatif est utilisé correspondant à l'influence du solvant des extraits. Le solvant ne doit pas être toxique pour les cellules (% de fluorescence rouge proche de 0) et ne doit pas lui-même inhiber la sécrétion du TNF- $\alpha$  (% de fluorescence jaune maximum c'est-à-dire proche du contrôle positif sans solvant).

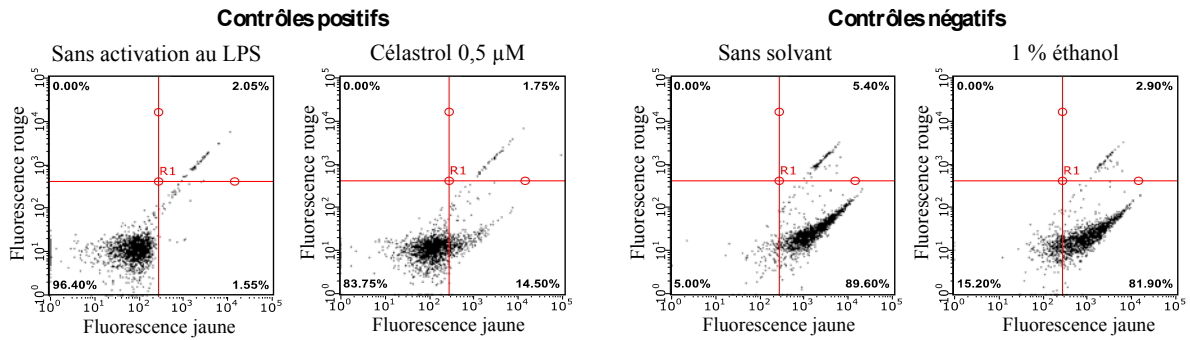


FIGURE IV - 2 - Cytogrammes des contrôles positifs et négatifs utilisés pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits

L'influence de différents paramètres du test *in vitro* utilisé ont été étudiés afin de maximiser l'activation des cellules. En effet si seulement 50 % des cellules sont activées, il est plus difficile de mesurer l'activité anti-inflammatoire des extraits. Le but de l'optimisation du test biologique est d'obtenir un pourcentage de cellules activées, c'est-à-dire de fluorescence jaune, proche de 100 %.

- La concentration en LPS

Différentes concentrations en LPS ont été utilisées pour activer les cellules, le LPS ne doit cependant pas être toxique pour les cellules (FIGURE IV - 3).

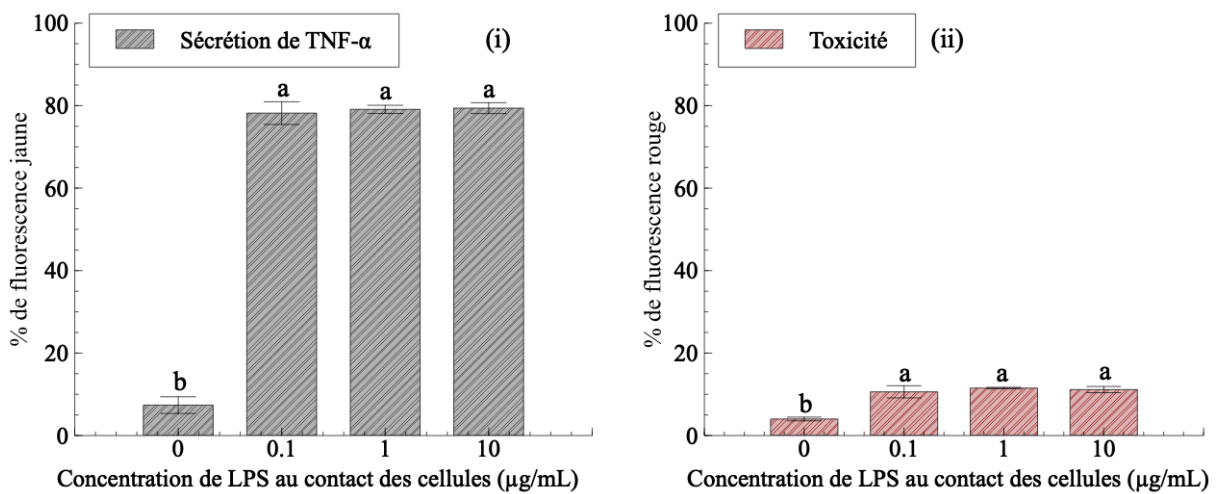


FIGURE IV - 3 - Influence de la concentration de LPS sur la sécrétion de TNF- $\alpha$  (i) et sur la mort cellulaire (ii) (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ )

- La concentration en éthanol

Le solvant des extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction est l'éthanol. Les extraits HSSE se trouvent dans 100 % d'éthanol tandis que les extraits PLE se trouvent dans 50 % d'éthanol. Lors de l'élaboration d'un test biologique, il est important de connaître l'influence du solvant sur la réponse attendue du test, c'est-à-dire sur l'inhibition de la sécrétion de TNF- $\alpha$  dans cette étude. La quantité de TNF- $\alpha$  sécrétée par les cellules stimulées par le LPS ainsi que la toxicité ont été évalués pour des solutions contenant différentes concentrations en éthanol de 0 à 5 % final au contact des cellules (FIGURE IV - 4).

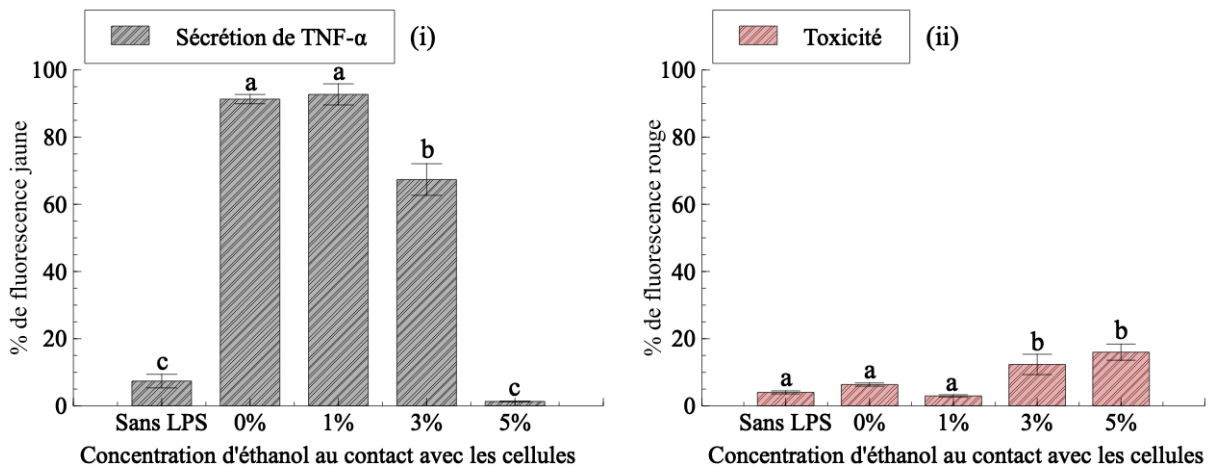


FIGURE IV - 4 - Influence de la concentration d'éthanol dans le milieu cellulaire sur la sécrétion de TNF- $\alpha$  (i) et sur la mort cellulaire (ii) (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ )

Les solutions contenant plus de 1 % d'éthanol au contact des cellules ont significativement inhibées la sécrétion de TNF- $\alpha$ . L'éthanol a donc une activité anti-inflammatoire non négligeable à une concentration supérieure à 1 %. De plus, ces mêmes solutions contenant plus de 1 % d'éthanol sont statistiquement toxiques pour les cellules et induisent une mort cellulaire d'environ 20 %. Les extraits étant composés de molécules volatiles, il n'est pas possible de les sécher et de les redissoudre dans 10 % d'éthanol, la perte des molécules d'intérêt est trop importante. La seule possibilité pour diminuer la concentration en éthanol est alors de diluer les extraits au risque de perdre leur activité potentielle. Ainsi, avant de mesurer leur activité anti-inflammatoire, les extraits sont dilués dans l'eau afin d'obtenir une concentration maximale en éthanol de 10 % (concentration finale dans le puits au contact des cellules de 1 %). Après dilution des extraits dans 90 %, aucune précipitation n'a été observée.

## IV.2. ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DES EXTRAITS DE PLANTE

### IV.2.1. Composition des extraits

Les extraits des 4 plantes étudiées, *Calamintha nepeta*, *Asarum europaeum*, *Mentha piperita* et *Thymus vulgaris*, ont été réalisés par PLE et par HSSE. Les autres méthodes d'extraction développées précédemment (chapitre III) pour l'extraction de terpènes volatils ne sont pas compatibles avec la réalisation de tests biologiques. L'hydrodistillation nécessite l'utilisation d'un solvant organique toxique pour les cellules, l'isooctane, pour récupérer les gouttes d'huile essentielle. Tandis que l'extraction par HS et par HS-SPME ne permettent pas de produire des extraits mais seulement de les analyser. Ces dernières, notamment la HS-SPME, sont cependant bien adaptées à l'analyse des terpènes volatils pour d'autres domaines d'applications. La HS-SPME étant plus sensible pour l'analyse des terpènes volatils, elle sera préférée à la HSSE. Bien que le chapitre précédent montre que la HSSE est plus efficace pour l'extraction des terpènes volatils que la PLE, les deux méthodes ont été utilisées pour réaliser les extraits de plantes. En effet, la HSSE est très sélective envers les molécules volatiles, tandis que la PLE permet d'extraire toutes les molécules ayant une affinité avec le solvant choisi. Contrairement à l'extrait HSSE, l'extrait obtenu par PLE ne contient pas seulement des composés volatils mais peut aussi contenir des flavonoïdes, des polyphénols, des sucres... composés retrouvés couramment dans les plantes et pouvant avoir une activité anti-inflammatoire. Pour une même plante, les deux extraits obtenus par les deux méthodes d'extraction n'auront donc pas la même composition. Ainsi en réalisant les tests biologiques sur les deux types d'extraits (PLE et HSSE), il sera possible de savoir si l'extrait possède une activité anti-inflammatoire et si celle-ci est due aux molécules volatiles. Les extraits des 4 plantes obtenus par les deux méthodes d'extraction ont été analysés qualitativement et quantitativement (TABLEAU IV - 1 ; TABLEAU IV - 2 ; TABLEAU IV - 3 ; TABLEAU IV - 4). Par manque de matière première, les extractions par PLE n'ont été réalisées qu'une fois pour chaque plante tandis que les extractions par HSSE ont été réalisées en triplicats. En effet, la PLE est réalisée sur 3 g de plante tandis que l'HSSE ne nécessite que 80 mg de plante par extraction.

Pour les 4 plantes, les extraits obtenus par HSSE contiennent un plus grand nombre de composés et sont plus concentrés en terpènes volatils en comparaison aux extraits obtenus par PLE. Pour une même plante, la composition des extraits obtenus par les deux méthodes d'extraction varie de quelques composés mais les composés majoritaires restent les mêmes pour les deux extraits PLE et HSSE sauf pour l'*Asarum europaeum*. De plus, la composition d'un extrait de plante varie fortement suivant les conditions environnementales dans lesquelles la plante a été cultivée mais aussi de sa récolte. Cependant, certains composés chimiques se retrouvent systématiquement dans une même espèce, ce sont des chémotypes.

TABLEAU IV - 1 - Composition des extraits de *Calamintha nepeta* obtenus par PLE et par HSSE

Composé	RI	PLE		HSSE	
		Aire (%)	Concentration (µg/g)	Aire (%)	Concentration (µg/g)
β-Pinène	1119	0,35	14	-	-
Limonène	1186	-	-	0,11	9,0 ± 0,7
Isomenthone	1468	8,61	-	7,63	-
trans-Sabinène hydrate	1469	-	-	0,38	-
Menthone	1481	0,61	4	0,29	6,1 ± 0,4
Acétate de menthyle	1564	-	-	0,14	5,1 ± 0,1
Isopulégone	1567	0,37	-	0,89	-
Caryophyllène	1603	1,95	20	3,34	115 ± 5
Menthol	1630	4,70	19	3,40	107 ± 4
Pulégone	1638	49,41	485	45,89	1729 ± 88
α-Humulène	1667	-	-	0,34	12 ± 1
α-Terpinéol	1674	<0,01	1	-	-
Bornéol	1685	-	-	<0,01	1,72 ± 0,03
Germacrène D	1690	0,94	-	2,20	-
Géraniol	1842	1,17	5	0,80	12,7 ± 0,1

TABLEAU IV - 2 - Composition des extraits de *Asarum europaeum* obtenus par PLE et par HSSE

Composé	RI	PLE		HSSE	
		Aire (%)	Concentration (µg/g)	Aire (%)	Concentration (µg/g)
β-Bourbonène	1533	-	-	0,25	-
Linalol	1540	<0,01	2	<0,01	3,4 ± 0,3
Menthol	1630	0,36	4	-	-
(E)-β-Farnesène	1646	-	-	2,24	407 ± 4
α-Humulène	1667	19,18	2	1,17	19,7 ± 0,4
Germacrène D	1690	-	-	6,30	-
β-Citronellol	1739	-	-	<0,01	4,7 ± 0,1

TABLEAU IV - 3 - Composition des extraits de *Mentha piperita* obtenus par PLE et par HSSE

Composé	RI	PLE		HSSE	
		Aire (%)	Concentration (µg/g)	Aire (%)	Concentration (µg/g)
Camphène	1085	<0,01	11	<0,01	16,6 ± 0,5
3-Carène	1148	<0,01	4	<0,01	9 ± 2
Limonène	1186	0,57	4	0,14	16 ± 3
Eucalyptol	1200	-	-	1,54	109 ± 13
p-Cymène	1258	-	-	<0,01	3,0 ± 0,2
Isomenthone	1468	1,74	-	1,64	-

trans-Sabinène hydrate	1469	-	-	2,12	-
Menthofurane	1469	-	-	0,39	-
Menthone	1481	9,51	105	8,72	76 ± 4
beta-Bourbonène	1533	-	-	0,12	-
Linalol	1540	<0,01	2	0,09	8,3 ± 0,2
Acétate de menthyle	1564	5,07	54	6,52	271 ± 5
Isopulégol	1573	-	-	0,11	-
Caryophyllène	1603	0,80	15	1,32	89 ± 1
Menthol	1630	42,85	507	50,54	2496 ± 38
(E)-β-Farnesène	1646	-	-	0,36	290 ± 4
α-Humulène	1667	-	-	0,06	6,2 ± 0,6
α-Terpinéol	1674	0,13	10	0,10	22,5 ± 0,3
Bornéol	1685	-	-	<0.01	1,38 ± 0,03
Germacrène D	1690	1,58	-	3,22	-
Pipéritone	1725	-	-	1,13	-
Thymol	2138	-	-	0,31	5,5 ± 0,3

 TABLEAU IV - 4 - Composition des extraits de *Thymus vulgaris* obtenus par PLE et par HSSE

Composé	RI	PLE		HSSE	
		Aire (%)	Concentration (µg/g)	Aire (%)	Concentration (µg/g)
3-Carène	1148	<0,01	2	0,20	12,3 ± 0,2
p-Cymène	1258	7,01	80	3,65	101 ± 6
trans-Sabinène hydrate	1469	0,42	-	0,45	-
Camphre	1529	0,80	10	0,41	10,8 ± 0,2
Linalol	1540	0,99	17	0,93	29,3 ± 0,9
4-Terpinéol	1595	-	-	0,22	5,0 ± 0,6
Éther de thymol méthylique	1594	0,71	-	-	-
Caryophyllène	1603	0,84	7	1,27	46 ± 5
α-Terpinéol	1674	0,15	2	<0,01	4,6 ± 0,5
Bornéol	1685	1,97	15	1,24	21 ± 1
δ-Cadinène	1757	-	-	0,21	-
Oxide de caryophyllène	2017	0,81	-	-	-
Thymol	2138	72,26	373	66,01	551 ± 36
Carvacrol	2167	3,96	38	2,63	61 ± 1

Dans la littérature, trois types différents d'huiles essentielles de *Calamintha nepeta* sont distingués : une dont le composé majoritaire est le pulégone accompagné de menthone et d'isomenthone, une composée d'oxide de pipéritone et de pipéritone et la dernière, la plus rare, est caractérisée par la présence de carvone et d'eucalyptol [5].

Dans cette étude on retrouve une composition d'extrait riche en pulégone (49,41 % pour l'extrait PLE et 45,89 % pour l'extrait HSSE) mais aussi en isomenthone (8,61 % pour l'extrait PLE et 7,68 % pour l'extrait HSSE). Le pulégone, composé majoritaire des extraits de *Calamintha nepeta* est présent à une concentration de 485 µg/g dans l'extrait PLE et de 1729 ± 88 µg/g dans l'extrait HSSE.

Les extraits d'*Asarum europaeum* obtenus par PLE et par HSSE sont peu riches en composés volatils : seulement 3 composés ont été identifiés dans l'extrait PLE et 6 dans l'extrait HSSE à des faibles concentrations. Le profil des composés volatils de l'*Asarum europaeum* n'a pas fait l'objet de nombreuses études. Le composé majoritaire des huiles essentielles d'*Asarum europaeum* est l'asarone, un composé toxique pour la santé humaine. Par conséquent, son utilisation dans le domaine pharmaceutique est limité [6]. Cependant, Wilczewska *et al.* [7] ont extraits par HS-SPME les composés volatils de différentes parties de la plante : les feuilles, les tiges et les racines. Ils ont montré que l'asarone se trouvait en faible quantité dans les feuilles tandis que les extraits de tiges et de racines étaient composés à plus de 50 % d'asarone. Les extraits de feuilles quant à eux sont composés d'une majorité de monoterpènes et de sesquiterpènes : 32 % de β-acoradiène et 17 % de germacrène D, les autres composés sont présents à un pourcentage inférieur à 10 %. Dans cette étude, la tige de la plante ayant une taille négligeable par rapport à la taille de la feuille, il a été considéré que la composition de l'extrait obtenu se rapproche de la composition de l'extrait de feuille décrit dans par Wilczewska *et al.* [7]. Le composé majoritaire retrouvé dans l'extrait HSSE est le germacrène D à 6,3 %. Le composé majoritaire de l'extrait d'*Asarum europaeum* obtenu par PLE est l'α-humulène à 19,2 %, ce composé est présent à 6 % dans l'extrait HS-SPME décrit dans la littérature, troisième composé le plus abondant. L'asarone ayant une température d'ébullition plutôt élevée (296 °C), il est possible qu'il soit présent dans l'extrait PLE mais qu'il n'apparaisse pas sur le chromatogramme dû à une faible volatilité et il est aussi possible qu'il n'ait pas été extrait par HSSE dû à une température d'extraction de 80 °C. L'asarone étant un composé très toxique, en mesurant la toxicité des extraits d'*Asarum europaeum* obtenus par PLE et HSSE il sera possible d'émettre une hypothèse plus précise sur la présence ou l'absence de ce composé dans les extraits.

Les extraits de *Mentha piperita* contiennent le plus grand nombre de terpènes volatils parmi les plantes étudiées : 11 composés ont été identifiés dans l'extrait PLE et 22 dans l'extrait HSSE. En effet, la *Mentha piperita* est une plante riche en monoterpènes, ses feuilles contiennent entre 1,2 et 3,9 % d'huile essentielle tandis que le *Calamintha nepeta* contient approximativement 0,35 % d'huile essentielle [8]. Les principaux composés de l'huile essentielle de *Mentha piperita* sont le menthol (33-60 %), le menthone (15-32 %), l'isomenthone (2-8 %), l'eucalyptol (5-13 %) et l'acétate de menthyle (2-11 %) entre autres [9]. Comme le *Calamintha nepeta*, la composition en composés volatils de la *Mentha piperita* dépend d'un grand nombre de facteur, à savoir les conditions environnementales, la région géographique mais aussi la maturité de la plante lors de la récolte.



Le composé majoritaire des deux extraits de *Mentha piperita* est le menthol à une concentration de 507 µg/g (42,85 %) pour l'extrait PLE et de 2496 ± 38 µg/g (50,54 %) pour l'extrait HSSE. Les extraits obtenus par PLE et HSSE contiennent aussi d'importantes quantités en menthone (9,51 % pour l'extrait PLE et 8,72 % pour l'extrait HSSE) et d'acétate de menthyle (5,07 % pour l'extrait PLE et 6,52 % pour l'extrait HSSE). Les résultats obtenus pour ces deux extraits montrent que l'HSSE est plus sensible et plus efficace pour l'extraction des terpènes volatils que la PLE.

Les composés principaux de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sont le thymol, le carvacrol, le p-cymène, le  $\gamma$ -terpinène dans des proportions différentes suivant la région où a été récoltée la plante et à quelle période de maturité [10]. Le même nombre de composés a été identifié dans les deux extraits PLE et HSSE mais ce ne sont pas les mêmes à deux composés prêts : seulement l'extrait PLE contient du  $\delta$ -cadinène, tandis que le 4-terpinéol n'est présent que dans l'extrait HSSE. Les extraits de *Thymus vulgaris* contiennent moins de terpènes volatils que les extraits de *Mentha piperita*, le *Thymus vulgaris* contient 1-2,5 % d'huile essentielle [8]. L'extrait PLE de *Thymus vulgaris* est composé à 72,26 % de thymol, 3,96 % de carvacrol et 7,01 % de p-cymène. L'extrait HSSE de la même plante est composé à 66,01 % de thymol, 2,63 % de carvacrol et 3,65 % de p-cymène. Le composé majoritaire retrouvé dans les extraits de *Thymus vulgaris* est le thymol à une concentration de 373 µg/g pour l'extrait PLE et de 551 ± 36 µg/g pour l'extrait HSSE.

Les compositions des extraits de plantes obtenus sont en accord avec ceux de la littérature obtenus pour la majorité des cas par hydrodistillation ou simple macération. Cela montre que les méthodes d'extractions utilisées, la PLE et la HSSE, sont adaptées à l'extraction de terpènes volatils et permettent d'obtenir des extraits de plantes de compositions similaires à celle de leurs huiles essentielles. De plus, les extraits de plantes obtenus sont riches en monoterpènes connus pour leurs activités anti-inflammatoires comme par exemple l'eucalyptol, le menthone, le bornéol, le thymol, le carvacrol, le linalol, l' $\alpha$ -terpinéol, l' $\alpha$ -pinène... [1].

#### IV.2.2. Activité anti-inflammatoire des extraits

L'activité anti-inflammatoire des différents extraits de plantes a été mesurée par le test *in vitro* décrit précédemment. Chaque extrait est déposé en triplicat sur la même plaque 96 puits. Les extraits PLE ont été dilués par un facteur 5 avant ajout dans le milieu extracellulaire afin d'obtenir une concentration finale en éthanol de 1 % au contact des cellules. Les résultats des tests biologiques pour l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires des extraits de plantes obtenus par PLE sont présentés dans la FIGURE IV - 5.

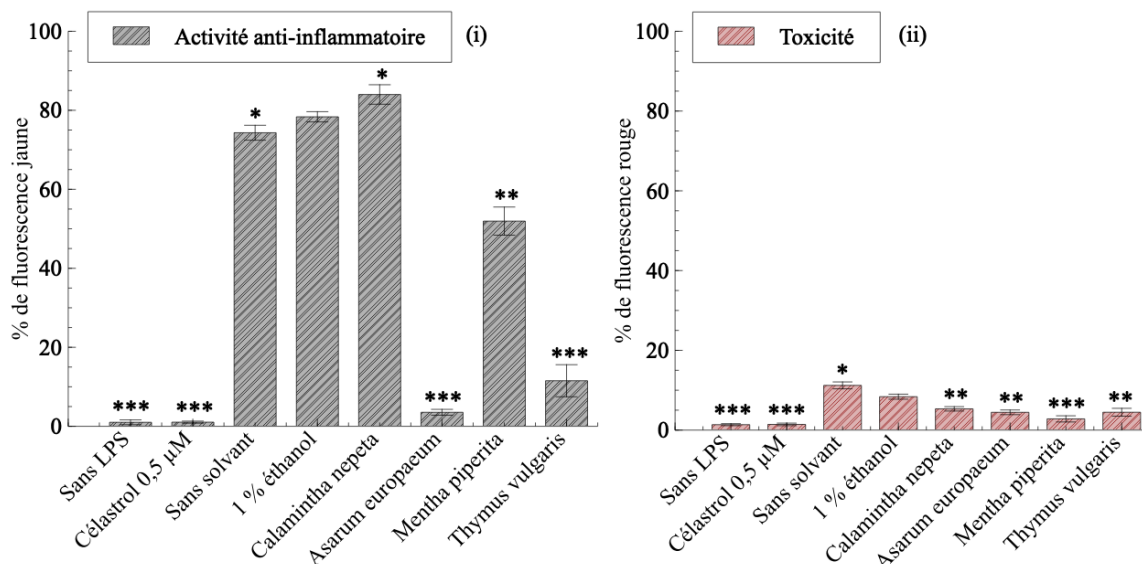


FIGURE IV - 5 - Activité anti-inflammatoire (i) et toxicité (ii) des extraits de plantes obtenus par PLE dilués par 5 (n=3, test de Student, comparé au contrôle négatif contenant 1 % d'éthanol,  $\alpha=0,05$ , \*  $0,01 < p < 0,05$  ; \*\*  $0,001 < p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Un extrait possède une activité anti-inflammatoire, si en présence de celui-ci le pourcentage de fluorescence jaune diminue significativement par rapport à celui du contrôle négatif contenant 1 % d'éthanol. Le contrôle positif en absence de LPS montre que les cellules ont bien été activées dans les autres puits en présence de LPS, il y a une différence significative de fluorescence jaune entre le contrôle sans LPS et le contrôle à l'éthanol. Le contrôle positif du célastrol à 0,5 µM montre qu'il est possible de suivre l'inhibition de la sécrétion de TNF- $\alpha$  grâce aux anticorps utilisés, en effet il y a une différence significative entre le contrôle au célastrol et celui à l'éthanol. Enfin, le contrôle négatif sans solvant montre que l'éthanol n'a pas d'influence sur la sécrétion de TNF- $\alpha$  au niveau cellulaire. Aucune baisse de fluorescence significative n'a été mesurée pour l'extrait de *Calamintha nepeta*, celui-ci n'est donc pas anti-inflammatoire. Les extraits PLE des trois autres plantes inhibent significativement la sécrétion de TNF- $\alpha$ , ils ont donc un potentiel anti-inflammatoire. L'extrait d'*Asarum europaeum*, le moins concentré en composés volatils, permet de diminuer totalement la sécrétion de TNF- $\alpha$ , c'est l'extrait qui a la plus forte activité anti-inflammatoire mais qui n'est sûrement pas due aux composés volatils. Les extraits de plantes « contrôles », *Mentha piperita* et *Thymus vulgaris*, ont une activité anti-inflammatoire moins importante mais significative. L'extrait de *Mentha piperita* inhibe la sécrétion de TNF- $\alpha$  pour environ 40 % des cellules tandis qu'en présence de l'extrait de *Thymus vulgaris* 80 % des cellules activées ne secrètent plus de TNF- $\alpha$ . Les contrôles positifs montrent que la présence d'éthanol induit une hausse légère mais significative de la mort cellulaire, comme décrit précédemment pour la FIGURE IV - 4. Les 4 extraits de plantes ne sont pas toxiques aux concentrations utilisées, ils permettent même de diminuer significativement la toxicité par rapport au contrôle négatif à l'éthanol.

Le même test biologique *in vitro* a été réalisé pour les extraits des 4 plantes obtenus par HSSE (FIGURE IV - 6). Ces extraits ont été dilués avant leur dépôt sur la plaque 96 puits par un facteur 10 afin d'obtenir une concentration finale d'éthanol de 1 % au contact des cellules.

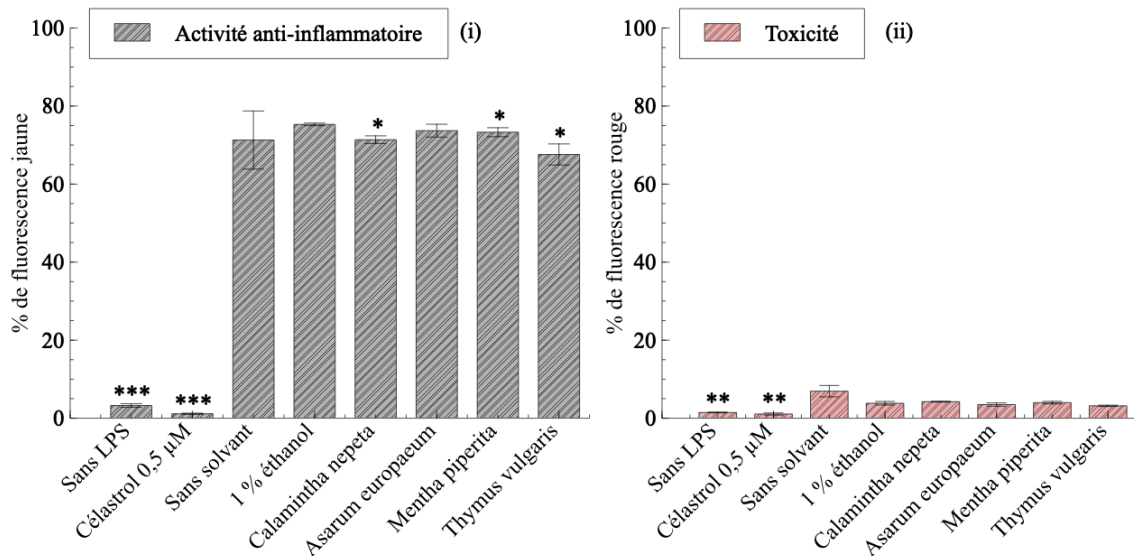


FIGURE IV - 6 - Activité anti-inflammatoire (i) et toxicité (ii) des extraits de plantes obtenus par HSSE dilués par 10 ( $n=3$ , test de Student comparé au contrôle négatif contenant 1 % d'éthanol,  $\alpha=0,05$ , \*  $0,01 < p < 0,05$  ; \*\*  $0,001 < p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

De même que pour le test des extraits PLE, les contrôles positifs et négatifs montrent que l'activation des cellules par LPS a bien été réalisé et que l'inhibition de la sécrétion de TNF- $\alpha$  est bien mesurée à l'aide des anticorps utilisés. Les extraits des plantes obtenus par HSSE ne sont pas toxiques pour les cellules. Cependant, même si la baisse de fluorescence jaune est significative pour les extraits de *Calamintha nepeta*, de *Mentha piperita* et de *Thymus vulgaris* par rapport au contrôle négatif à l'éthanol, la diminution de la sécrétion de TNF- $\alpha$  reste très faible par rapport à celle induite par le contrôle positif au célastrol qui illustre l'inhibition totale de la sécrétion de TNF- $\alpha$ . En effet, les extraits de plantes induisent une baisse de fluorescence jaune d'environ 10 % tandis que le célastrol induit une baisse de fluorescence jaune de plus de 95 %. Ainsi en comparant avec les résultats obtenus précédemment, les activités anti-inflammatoires des extraits PLE de l'*Asarum europaeum*, de la *Mentha piperita* et du *Thymus vulgaris* sont probablement dues à des composés non volatils car leurs activités ne sont pas retrouvées dans les extraits HSSE plus concentrés en molécules volatiles même après dilution. Cette absence d'activité pour les différents extraits obtenus par HSSE peut être due à une concentration trop faible des molécules présentes dans l'extrait. En effet, *Mentha piperita* et *Thymus vulgaris* sont des plantes très utilisées dans la médecine traditionnelle et les activités anti-inflammatoires de leurs huiles essentielles ont été étudiées [11,12]. Ces plantes servent ici de contrôle pour évaluer l'activité anti-inflammatoire de deux plantes beaucoup moins utilisées, le *Calamintha nepeta* et l'*Asarum europaeum*. Ainsi, si les contrôles ne répondent pas au test d'activité

anti-inflammatoire, il n'est pas possible d'évaluer les activités anti-inflammatoires des plantes d'intérêt.

### IV.3. ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DE TROIS TERPENOÏDES VOLATILS PURS

Afin d'évaluer si l'absence d'activité anti-inflammatoire des extraits HSSE de plantes étudiés précédemment vient d'une trop faible concentration en molécules bioactives, les activités anti-inflammatoires de trois terpénoïdes volatils purs ont été évaluées : le pulégone, le menthol et l'eugénol. Pour chaque composé, l'activité anti-inflammatoire de chaque concentration est mesurée en triplicats.

- Le pulégone

Le pulégone est le composé majoritaire des extraits de *Calamintha nepeta*. Quelques études récentes ont mesurées l'activité anti-inflammatoire de ce composé [13–16], mais son potentiel inhibiteur de la sécrétion de TNF- $\alpha$  sur cellules activées au LPS n'a jamais été étudié. Le TNF- $\alpha$  étant l'un des messagers principaux entrant en jeu dans le processus d'inflammation, une molécule permettant de bloquer sa sécrétion est particulièrement intéressante. L'inhibition de la sécrétion de TNF- $\alpha$  par différentes concentrations en pulégone a été mesurée ainsi que la toxicité du pulégone à différentes concentrations sur les cellules THP-1 (FIGURE IV - 7).

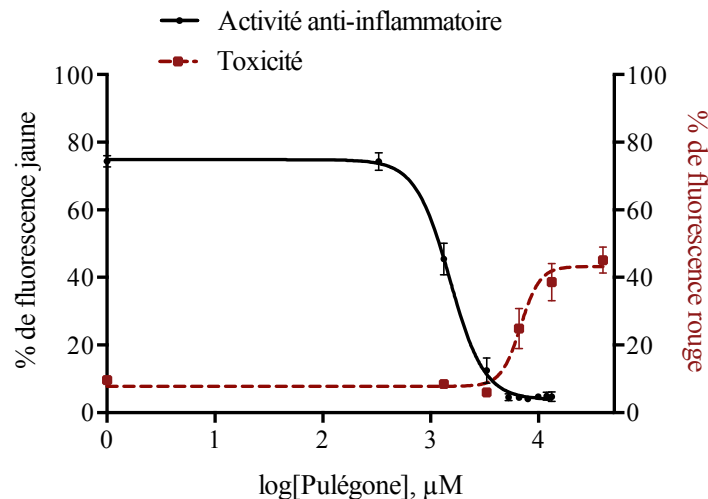


FIGURE IV - 7 - Courbe effet-dose de l'activité anti-inflammatoire du pulégone (n=3)

- Le menthol

Le menthol est le composé majoritaire des extraits de *Mentha piperita* mais il est aussi présent en plus faible quantité dans les extraits de *Calamintha nepeta*. Le menthol est très utilisé dans le domaine pharmaceutique notamment pour ses propriétés antidouleurs [17]. Le menthol est aussi un anti-inflammatoire, des études *in vitro* et *in vivo* ont montrées la diminution de la sécrétion de

différentes interleukines et notamment de TNF- $\alpha$  en présence de menthol [18,19] mais sur des lignées cellulaires différentes des THP-1.

L'activité anti-inflammatoire du menthol en fonction de sa concentration a été mesurée sur les THP-1 afin de pouvoir la comparer avec celle du pulégone mais aussi pour étudier si l'absence d'activité anti-inflammatoire de l'extrait HSSE de *Mentha piperita* est une conséquence d'une concentration trop faible en menthol. La toxicité du menthol sur les cellules THP-1 a aussi été étudiée (FIGURE IV - 8).

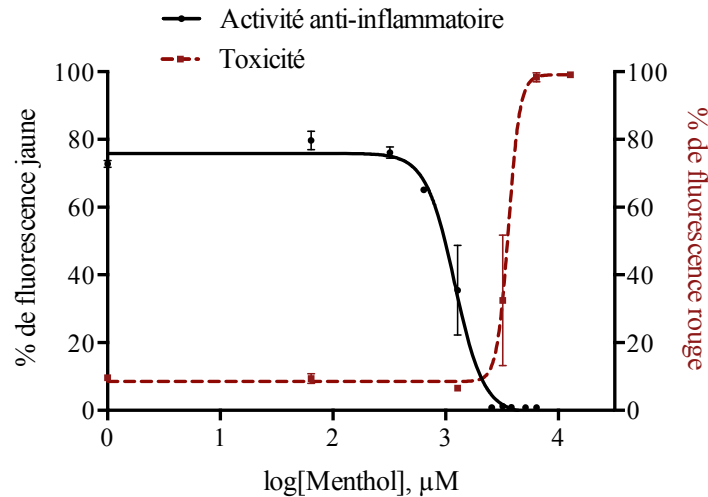


FIGURE IV - 8 - Courbe effet-dose de l'activité anti-inflammatoire du menthol (n=3)

- L'eugénol

Tout comme le menthol, l'eugénol est un anti-inflammatoire et un antidouleur très utilisé dans l'industrie pharmaceutique et plus particulièrement dans les traitements dentaires. L'activité anti-inflammatoire de l'eugénol a fait l'objet de nombreuses études [2] et il a été démontré sur cellules et sur animaux que ce composé est un inhibiteur de la sécrétion de TNF- $\alpha$ . L'eugénol est dans cette étude un contrôle du test anti-inflammatoire utilisé, afin de comparer l'efficacité de ce test à d'autres décrits dans la littérature. L'activité anti-inflammatoire de l'eugénol a donc été étudiée en fonction de sa concentration, ainsi que sa toxicité sur les cellules THP-1 (FIGURE IV - 9).

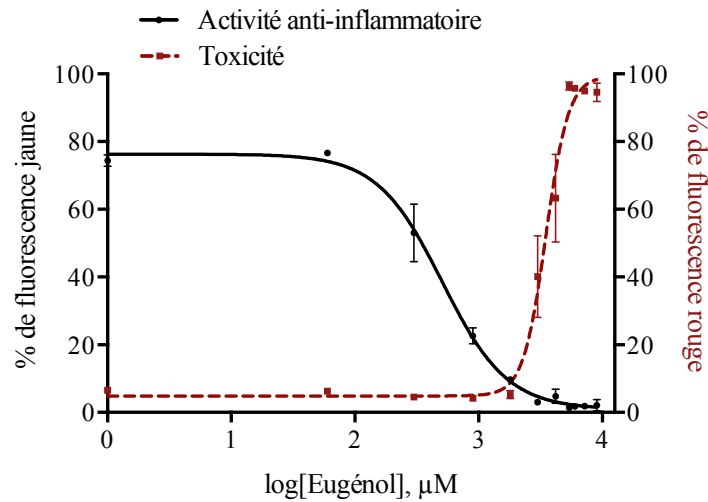


FIGURE IV - 9 - Courbe effet-dose de l'activité anti-inflammatoire de l'eugénol (n=3)

Les courbes effet-dose obtenues pour chaque composé ont permis de déterminer leur EC<sub>50</sub> d'activité anti-inflammatoire et leur EC<sub>50</sub> de toxicité sur les cellules THP-1 (TABLEAU IV - 5). A l'EC<sub>50</sub> de l'activité anti-inflammatoire, 50 % de l'inhibition maximale de la sécrétion de TNF-α est atteint. Et à l'EC<sub>50</sub> de la toxicité, 50 % des cellules sont mortes par intégrité membranaire.

TABLEAU IV - 5 - Valeurs des EC<sub>50</sub> de l'activité anti-inflammatoire et de la toxicité des différents terpénoïdes volatils étudiés

Composé	EC <sub>50</sub> (activité anti-inflammatoire)	EC <sub>50</sub> (toxicité)
[Pulégone] mM	1,5	6,8
[Menthol] mM	1,2	3,6
[Eugénol] mM	0,5	3,5

Le pulégone et le menthol sont des anti-inflammatoires moins puissants que l'eugénol. En effet, pour atteindre 50 % de l'efficacité du composé sur l'inhibition de TNF-α, les concentrations en menthol et en pulégone nécessaires sont de 1,2 mM et 1,5 mM respectivement tandis que la concentration en eugénol nécessaire est au moins deux fois moins importante (0,5 mM). Cependant, un avantage majeur de l'utilisation du pulégone comme anti-inflammatoire est dégagé grâce à cette étude : sa faible toxicité. En effet, à des concentrations d'environ 3,5 mM, l'eugénol et le menthol induisent une mort cellulaire de 50 % des cellules présentes dans le milieu. Or, à la concentration maximale utilisée pour le pulégone, un plateau correspondant à seulement 40 % de mort cellulaire est observé. Ainsi, pour le pulégone, l'EC<sub>50</sub> mesurée correspond à la concentration à laquelle 20 % des cellules sont mortes. L'EC<sub>50</sub> est alors bien plus élevée (6,8 mM) pour le pulégone que pour les deux autres composés étudiés, ce qui traduit une toxicité beaucoup plus faible de ce composé.

Tsai *et al.* [20] ont mesuré l'activité anti-inflammatoire de l'eugénol par inhibition du TNF- $\alpha$  dans les cellules THP-1 après activation par une bactérie, *Propionibacterium acnes*, pendant une période d'incubation de 24 h. Les auteurs ont montré qu'une solution d'eugénol à 0,2 mM permet d'inhiber à 50 % la sécrétion de TNF- $\alpha$ . Ainsi les résultats obtenus pour l'EC<sub>50</sub> de l'eugénol semblent cohérents et il est considéré que les EC<sub>50</sub> des deux autres composés ont été correctement évalués.

Le TABLEAU IV - 6 résume les valeurs des concentrations en pulégone et en menthol dans les extraits de *Calamintha nepeta* et de *Mentha piperita* après dilution. En effet, les extraits PLE sont dilués par 5 et les extraits HSSE par 10 afin de diminuer la concentration en éthanol à 10 % dans l'extrait. Puis 20  $\mu$ L de l'extrait sont déposés dans 180  $\mu$ L de milieu cellulaire, les extraits sont alors dilués dans le puit d'un nouveau facteur 10 afin d'obtenir une concentration finale en éthanol de 1 % au contact des cellules.

TABLEAU IV - 6 – Concentrations (en mM) en pulégone et en menthol dans les extraits de plantes après dilutions au contact des cellules

Composé	<i>Calamintha nepeta</i>		<i>Mentha piperita</i>	
	PLE	HSSE	PLE	HSSE
[Pulégone] (mM)	0,06	0,114 $\pm$ 0,006	-	-
[Menthol] (mM)	2,5 $\times$ 10 <sup>-3</sup>	6,9 $\times$ 10 <sup>-3</sup> $\pm$ 0,3 $\times$ 10 <sup>-3</sup>	0,06	0,162 $\pm$ 0,002

Les concentrations des composés étudiés sont exprimées en mM afin de pouvoir les comparer plus facilement aux valeurs des EC<sub>50</sub>. Dans les extraits HSSE, les concentrations en pulégone et en menthol sont environ 10 fois plus faibles que les valeurs d'EC<sub>50</sub> des composés respectifs. Les extraits PLE sont encore moins concentrés en ces deux composés que les extraits HSSE. Ces résultats peuvent être la cause d'une absence d'activité anti-inflammatoire des extraits de plantes étudiées.

L'extrait de clou de girofle obtenu par PLE contient de l'eugénol à une concentration de 10694  $\pm$  329  $\mu$ g/g, c'est-à-dire 65  $\pm$  2 mM (chapitre III). Un extrait de clou de girofle dilué par un facteur 10 aura une concentration finale au contact des cellules de 0,65  $\pm$  0,02 mM (20  $\mu$ L de l'extrait dilué par 10 sont déposés dans 180  $\mu$ L de cellules), correspondant à une concentration supérieure à l'EC<sub>50</sub> de l'eugénol (0,5 mM). L'activité anti-inflammatoire de cet extrait ainsi que sa toxicité ont été évaluées (FIGURE IV - 10).

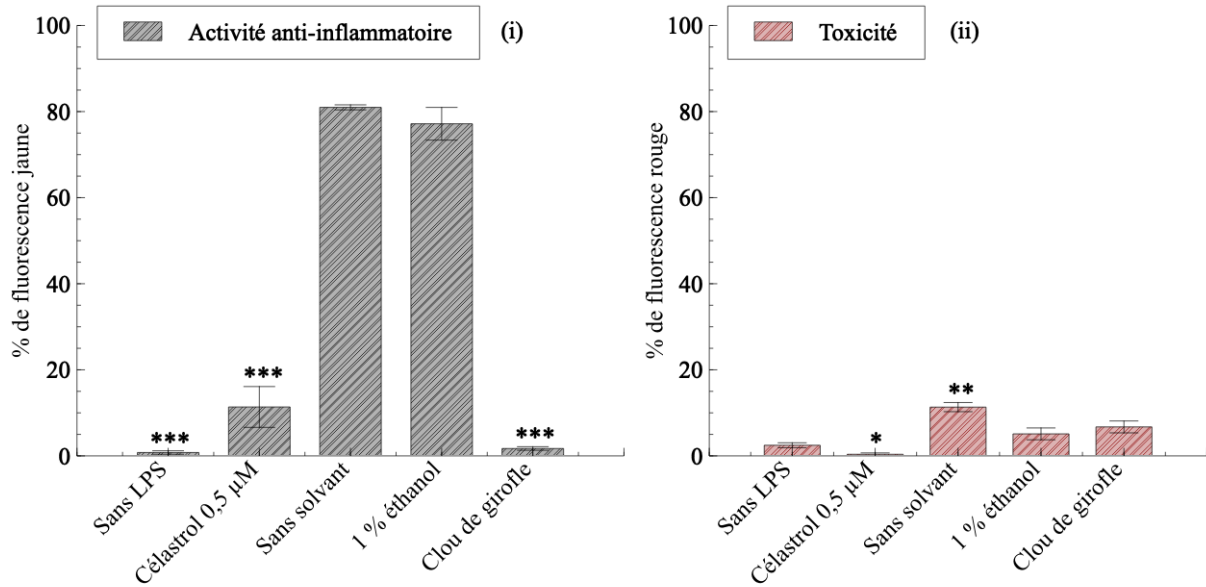


FIGURE IV - 10 - Activité anti-inflammatoire (i) et toxicité (ii) de l'extrait de clou de girofle dilué par 10 obtenu par PLE ( $n=3$ , test de Student comparé au contrôle négatif contenant 1 % d'éthanol,  $\alpha=0,05$ , \*  $0,01 < p < 0,05$  ; \*\*  $0,001 < p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

L'extrait PLE de clou de girofle permet de diminuer significativement la concentration en TNF- $\alpha$  dans le milieu cellulaire. Après traitement à l'extrait PLE de clou de girofle, la fluorescence jaune mesurée est similaire à celle du contrôle positif sans activation des cellules au LPS, ce qui traduit une forte activité anti-inflammatoire de l'extrait. Ainsi, l'hypothèse émise précédemment concernant la concentration en composé majoritaire bioactif suffisante afin d'observer une activité anti-inflammatoire est vérifiée.

Les plantes d'intérêt étudiées ont potentiellement une activité anti-inflammatoire (FIGURE IV - 6) due à la présence de molécules bioactives volatiles dans leurs extraits, mais la concentration en ces molécules est probablement trop faible pour observer une inhibition totale de la sécrétion de TNF- $\alpha$ .



#### IV.4. REFERENCES

- [1] R. De Cássia Da Silveira E Sá, L.N. Andrade, D.P. De Sousa, A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes, *Molecules*. 18 (2013) 1227–1254.
- [2] J.N. Barboza, C. da Silva Maia Bezerra Filho, R.O. Silva, J.V.R. Medeiros, D.P. de Sousa, An overview on the anti-inflammatory potential and antioxidant profile of eugenol, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018 (2018) 1–9.
- [3] K.P. Leister, R. Huang, B.L. Goodwin, A. Chen, C.P. Austin, M. Xia, Two high throughput screen assays for measurement of TNF- $\alpha$  in THP-1 cells, *Curr. Chem. Genomics*. 5 (2011) 21–29.
- [4] U. Singh, J. Tabibian, S.K. Venugopal, S. Devaraj, I. Jialal, Development of an in vitro screening assay to test the antiinflammatory properties of dietary supplements and pharmacologic agents, *Clin. Chem.* 51 (2005) 2252–2256.
- [5] M. Božović, R. Ragno, Calamintha nepeta (L.) Savi and its main essential oil constituent pulegone: Biological activities and chemistry, *Molecules*. 22 (2017) 1–50.
- [6] Y.F. Kopyt'Ko, N.N. Shchurevich, T.A. Sokol'Skaya, A.A. Markaryan, T.D. Dargaeva, Uses, chemical composition, and standardization of plant raw material and medicinal substances from plants of the genus asarum L., *Pharm. Chem. J.* 47 (2013) 157–168.
- [7] A.Z. Wilczewska, M. Ulman, Z. Chilmończyk, J. Maj, T. Koprowicz, M. Tomczyk, M. Tomczykowa, Comparison of volatile constituents of acorus calamus and asarum europaeum obtained by different techniques, *J. Essent. Oil Res.* 20 (2008) 390–395.
- [8] M. Adams, C. Berset, M. Kessler, M. Hamburger, Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders-A survey of European herbals from the 16th and 17th century, *J. Ethnopharmacol.* 121 (2009) 323–359.
- [9] D.L. McKay, J.B. Blumberg, A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (mentha piperita L.), *Phyther. Res.* 20 (2006) 619–633.
- [10] B. Salehi, M.S. Abu-Darwish, A.H. Tarawneh, C. Cabral, A. V. Gadetskaya, L. Salgueiro, T. Hosseinabadi, S. Rajabi, W. Chanda, M. Sharifi-Rad, R.B. Mulaudzi, S.A. Ayatollahi, F. Kobarfard, D.K. Arserim-Uçar, J. Sharifi-Rad, A. Ata, N. Baghalpour, M. del M. Contreras, Thymus spp. plants - Food applications and phytopharmacy properties, *Trends Food Sci. Technol.* 85 (2019) 287–306.
- [11] Y.X. Li, Y.B. Liu, A.Q. Ma, Y. Bao, M. Wang, Z.L. Sun, In vitro antiviral, anti-inflammatory, and antioxidant activities of the ethanol extract of Mentha piperita L., *Food Sci. Biotechnol.* 26 (2017) 1675–1683.
- [12] J.R. de Oliveira, D. de Jesus Viegas, A.P.R. Martins, C.A.T. Carvalho, C.P. Soares, S.E.A. Camargo, A.O.C. Jorge, L.D. de Oliveira, Thymus vulgaris L. extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity, *Arch. Oral Biol.* 82 (2017) 271–279.
- [13] S.H. Sohn, S. Cho, E.S. Ji, S.H. Kim, M. Shin, M. Hong, H. Bae, Microarray analysis of the gene expression profile of HMC-1 mast cells following Schizonepeta tenuifolia Briquet treatment, *Cell. Immunol.* 277 (2012) 58–65.
- [14] A. Roy, H.J. Park, Q.A. Abdul, H.A. Jung, J.S. Choi, Pulegone exhibits anti-inflammatory activities through the regulation of NF- $\kappa$ b and Nrf-2 signaling pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells, *Nat. Prod. Sci.* 24 (2018) 28–35.
- [15] Y.Y. Choi, M.H. Kim, H. Lee, S.Y. Jo, W.M. Yang, (R)-(+)-pulegone suppresses allergic and inflammation responses on 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in mice model, *J. Dermatol. Sci.* 91 (2018) 292–300.
- [16] Q. Yang, J. Luo, H. Lv, T. Wen, B. Shi, X. Liu, N. Zeng, Pulegone inhibits inflammation via suppression of NLRP3 inflammasome and reducing cytokine production in mice, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 41 (2019) 1–8.
- [17] R. de Cássia da Silveira E Sá, T.C. Lima, F.R. da Nóbrega, A.E.M. de Brito, D.P. de Sousa, Analgesic-like activity of essential oil constituents: An update., *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 2392–2432.
- [18] A.L. Rozza, F. Meira De Faria, A.R. Souza Brito, C.H. Pellizzon, The gastroprotective effect of menthol: Involvement of anti-apoptotic, antioxidant and anti-inflammatory activities, *PLoS One*. 9 (2014) 1–6.
- [19] M. Shahid, M.Y. Lee, A. Yeon, E. Cho, V. Sairam, L. Valdiviez, S. You, J. Kim, Menthol, a unique urinary volatile compound, is associated with chronic inflammation in interstitial cystitis, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–12.
- [20] T.H. Tsai, W.C. Huang, T.J. Lien, Y.H. Huang, H. Chang, C.H. Yu, P.J. Tsai, Clove extract and eugenol suppress inflammatory responses elicited by Propionibacterium acnes in vitro and in vivo, *Food Agric. Immunol.* 28 (2017) 916–931.



---

## CHAPITRE V

# LES « SOLVANTS EUTECTIQUES PROFONDS » POUR L'EXTRACTION DES TERPENES VOLATILS

---



## CHAPITRE V – LES « SOLVANTS EUTECTIQUES PROFONDS » POUR L'EXTRACTION DES TERPENES VOLATILS

L'objectif de ce chapitre est de développer une nouvelle méthode d'extraction permettant d'obtenir des extraits de plantes suffisamment concentrées en molécules bioactives afin d'observer une potentielle activité anti-inflammatoire.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux liquides ioniques (IL), ces solvants constitués de sels liquides à température ambiante. Des extractions solide-liquide aux ultrasons ont été réalisées dans différentes conditions (temps d'extraction, température d'extraction, concentration du IL) pour étudier le pouvoir extracteur des liquides ioniques pour l'extraction des terpènes volatils dans la muscade. Cependant, les limites majeures de l'utilisation des liquides ioniques sont apparues rapidement. Tout d'abord, ces solvants se chargent rapidement en eau présente dans l'air, il est donc nécessaire de mesurer régulièrement leur teneur en eau et de les sécher sous vide afin de toujours les utiliser dans les mêmes conditions, ce caractère rend leur manipulation plus contraignante. De plus, ces solvants sont fastidieux à synthétiser et encore plus à purifier. Leur coût alors très élevé ne permet pas de faire un nombre illimité d'expériences même en travaillant avec des faibles volumes (quelques centaines de microlitres).

Nous nous sommes alors dirigés dans un second temps vers une alternative à ces solvants coûteux et contraignants : les solvants eutectiques profonds (DESs). Il existe peu de résultats disponibles sur l'extraction des terpènes volatils par DES dans la littérature. La première piste à investiguer pour l'extraction par DES fut une extraction solide-liquide aux ultrasons. Cette méthode a montré de nombreux désavantages à savoir un manque de répétabilité dû à la viscosité des DESs mais aussi à un manque de matériel adéquate au sein du laboratoire (température du bain non contrôlée et ultrasons non homogènes dans le bain). Les DESs sont alors apparus comme un solvant idéal pour la microextraction liquide sur une goutte (single drop microextraction, SDME). Ainsi une méthode couplant les DESs et la SDME en espace de tête (HS-SDME) a été développée pour l'extraction des terpènes volatils présents dans diverses plantes. Un nombre important de combinaisons de donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène (HBD et HBA) a été réalisé pour former des DESs aux propriétés physicochimiques différentes. Un premier criblage de différents DESs a permis de sélectionner le DES le plus efficace pour l'extraction des terpènes volatils. La méthode complète d'extraction (DES-HS-SDME) a ensuite été optimisée par plan d'expérience. La méthode optimisée a ensuite été appliquée pour l'extraction des terpènes volatils dans les plantes d'intérêt afin de vérifier si elle permet d'obtenir des extraits plus concentrés que les méthodes testées précédemment (chapitre IV).

## V.1. LES LIQUIDES IONIQUES POUR L'EXTRACTION DES TERPENES VOLATILS

Les liquides ioniques (IL) utilisés dans cette partie ont été obtenus suite à une collaboration avec l'équipe de radiochimie du département recherches subatomiques (DRS) de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) de l'Université de Strasbourg. Les liquides ioniques sont des sels liquides à température ambiante et sont constitués d'un cation et d'un anion. Les structures chimiques des IL utilisés dans cette partie sont présentées dans la FIGURE V - 1. Quatre liquides ioniques différents ont été évalués pour l'extraction des terpènes volatils par extraction solide-liquide aux ultrasons. Trois d'entre eux ont pour anion le tétrafluoroborate et des cations basés sur un méthylimidazolium avec une chaîne carbonée qui varie entre 2 et 6 carbones. Ces liquides ioniques sont appelés  $C_x\text{mimBF}_4$  avec  $x$  le nombre de carbones de la chaîne carbonée sur l'azote non chargé. Un autre liquide ionique est testé, composé d'un anion trifluorométhanesulfonate ( $\text{CF}_3\text{SO}_3$ ) et d'un cation méthylimidazolium avec une chaîne carbonée à 6 carbones.

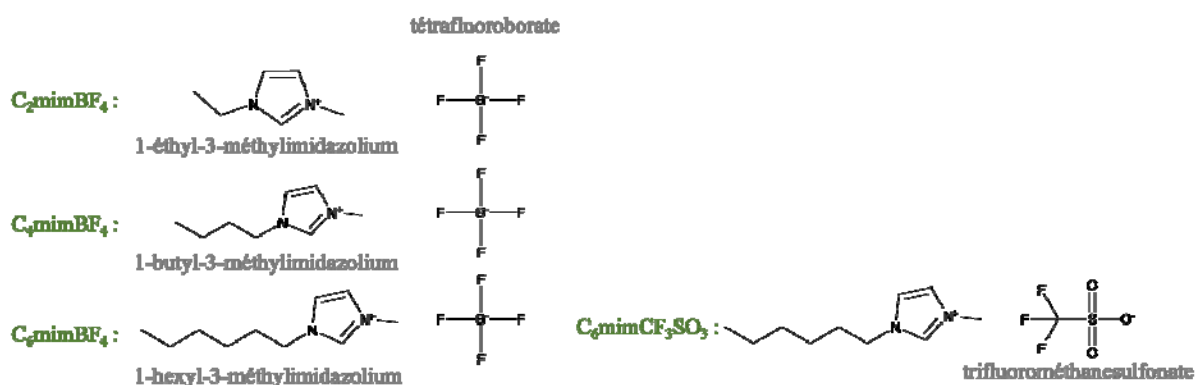


FIGURE V - 1 - Structures des liquides ioniques utilisés pour l'extraction des terpènes volatils dans la muscade

Avant extraction, les liquides ioniques sont séchés sous vide à 60 °C pendant 2 heures puis à température ambiante pendant 3 heures. Après séchage, la teneur en eau contenue dans les liquides ioniques est mesurée par la méthode de Karl Fisher. En moyenne, la teneur en eau dans les différents liquides utilisés est de 400 ppm, sauf pour  $C_2\text{mimBF}_4$  pour lequel cette valeur descend jusqu'à 200 ppm. Avant chaque extraction, la teneur en eau des liquides ioniques est mesurée et doit être proche de 400 ppm afin de toujours travailler dans les mêmes conditions. L'extraction des terpènes volatils dans la muscade est réalisée en disposant 100 mg de muscade avec 400 mg de liquide ioniques aux ultrasons pendant 10 min à température ambiante. Après centrifugation pendant 5 min à 4000 rpm, 100  $\mu\text{L}$  du surnageant sont prélevés et analysés par HS-GC-MS suivant la méthode optimisée dans le chapitre III. L'une des caractéristiques principales des liquides ioniques est leur non-volatilité, ils sont donc très bien adaptés pour l'analyse par espace de tête limitant ainsi les interférences potentielles dues aux solvants d'extraction. Les liquides ioniques étudiés sont hydrophobes, sauf  $C_2\text{mimBF}_4$  qui est plus polaire dû à une chaîne carbonée plus courte du cation et est donc hydrophile.  $C_2\text{mimBF}_4$  est dilué

dans l'eau à une concentration de 4 M et les autres liquides ioniques sont dilués dans l'éthanol à la même concentration. Deux solutions de  $C_4mimBF_4$  à 4 M sont préparées : une dans l'eau et l'autre dans l'éthanol afin d'observer l'influence de la nature du solvant de dilution sur l'extraction. La FIGURE V - 2 montre les chromatogrammes obtenus suite à l'extraction de la muscade par les différents liquides ioniques.

(a)  $C_2mimBF_4$  4 M dilué dans  $H_2O$

(b)  $C_4mimBF_4$  4 M dilué dans  $H_2O$

(c)  $C_4mimBF_4$  4 M dilué dans EtOH

(d)  $C_6mimBF_4$  4 M dilué dans EtOH

(e)  $C_6mimCF_3SO_3$  4 M dilué dans EtOH

FIGURE V - 2 - Chromatogrammes d'extraits de muscade obtenus par extraction solide-liquide avec différents liquides ioniques (10 min aux ultrasons, analyse par HS-GC-MS)

Différentes observations peuvent être faites sur ces chromatogrammes :

- L'augmentation de la chaîne carbonée du cation permet d'augmenter l'efficacité d'extraction des terpènes volatils. L'augmentation de 2 à 4 carbones permet d'augmenter significativement la réponse (chromatogrammes (a) et (b)) tandis que l'augmentation de 4 à 6 carbones permet d'augmenter la sensibilité envers les composés plutôt apolaire à faible masse moléculaire (chromatogrammes (c) et (d)).
- La nature du solvant de dilution des liquides ioniques a, a priori, une faible influence sur l'extraction au niveau du ratio entre les composés à faible masse moléculaire et ceux à masse moléculaire plus élevée. Cependant les variations entre les chromatogrammes (b) et (c) restent très faible, et aucune répétition n'a été réalisée sur l'extraction, il est donc difficile de conclure sur l'influence du solvant de dilution.
- De même, la nature de l'anion entre les deux étudiés ici ( $\text{BF}_4^-$  et  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ ) n'a a priori pas d'influence significative sur l'extraction (chromatogrammes (d) et (e)).

Ces premiers résultats sont prometteurs car ils montrent le potentiel extracteur des liquides ioniques pour l'extraction des terpènes volatils. En effet, les liquides ioniques ont été très peu étudiés pour ce genre d'application. Cependant le coût de ces solvants est un désavantage majeur, nous n'avons donc pas pu continuer l'étude des liquides ioniques pour l'extraction des terpènes volatils. Ces résultats préliminaires à l'aide de solvant innovant nous ont tout de même guidés vers par les solvants eutectiques profonds (DESs).

## V.2. RESULTATS PRELIMINAIRES SUR LA SYNTHÈSE ET L'UTILISATION DES DES

### V.2.1. Les DESs synthétisés

Les solvants eutectiques profonds (DESs) sont facilement synthétisés en mélangeant un donneur de liaison hydrogène (HBD) avec un accepteur de liaison hydrogène (HBA) à un ratio molaire bien déterminé correspondant au point eutectique. Différentes combinaisons de HBA et HBD ont été réalisés afin de former des DESs de différentes propriétés physicochimiques (TABLE V - 1). Les structures des HBA et HBD utilisés sont repris dans l'ANNEXE 2. Différentes natures de composés chimiques naturels ont été testées afin de synthétiser des DESs : des sucres (glucose, sorbitol...), des acides carboxyliques (acide citrique, acide malonique, acide lactique...), des ammoniums quaternaires (chlorure de choline, triméthylglycine...), des acides phénoliques (acide gallique et acide caféique), des acides gras (acide stéarique, acide caproïque...), des alcools (butanol, octanol...) et un composé azoté (urée). Il a été considéré qu'un DES est formé lorsqu'après avoir refroidi pendant une nuit, le mélange



des deux composés de départ est toujours liquide à température ambiante. S'il y a eu précipitation lors du refroidissement du liquide, le DES n'a pas été synthétisé.

Toutes les combinaisons testées n'ont pas abouti à la formation d'un DES. La difficulté majeure dans la synthèse des DESs est de trouver le point eutectique. En effet si le point eutectique n'est pas atteint, c'est-à-dire si les composés de départ ne sont pas introduits dans le bon ratio molaire, il n'y aura pas de formation de liquide stable d'après la définition du diagramme de phase. Certains DESs qui ne sont pas décrits dans la littérature ont pu être synthétisés avec succès comme par exemple le DES formé à partir du bromure de tétraméthylammonium et d'acide lactique dans un ratio molaire 1:2.

TABLE V - 1 - Combinaisons de HBA et HBD testés pour synthétiser différents DES

HBA	HBD	Ratio HBA:HBD	DES ?	Réf
Chlorure de choline	Urée	1:2	✓	[1]
	Acide oxalique	1:1	✓	[2]
	Acide malonique	1:1	✓	[2]
	D-Glucose	1:1	✓	[3]
	D-Fructose	1:1	✓	[3]
	Acide phénylpropionique	1:2	✓	[4]
	Acide phénylacétique	1:2	✓	[4]
	Acide lactique	2:3	✓	[2]
	Acide stéarique	1:1	X	-
		1:2	X	-
		2:1	X	-
	Acide palmitique	1:1	X	-
	Acide caproïque	1:1	X	-
		1:2	X	-
	Acide caféique	1:0.5	✓	[5]
	Sorbitol	1:1	✓	[5]
	Acide gallique	1:1	X	-
	Dodécanol	1:1	X	-
	Octanol	1:2	X	-
	Bromure de tétrabutylammonium (N <sub>4444</sub> Br)	Octanol	1:1	X
		1:2	✓	-
Urée		1:2	X	-
Acide lactique		1:2	✓	-
Nonanol		1:1	X	-
Butanol		1:2	✓	[6]
Décanol		1:1	X	-

		1:2	✓	-
	Dodécanol	1:2	✓	-
	Acide caproïque	1:1	✓	[6]
Triméthylglycine	Acide phénylacétique	1:2	✓	[7]
L-Histidine	Acide stéarique	1:1	X	-
	Dodécanol	1:1	X	-
		1:2	X	-
DL-Acide malique	D-Sorbitol	1:1	✓	[8]
Acide citrique	D-Sorbitol	1:1	X	[8]
Chlorure de méthyltrioctylammonium (N <sub>8881</sub> Cl)	Acide caproïque	1:1	✓	[6]
	Dodécanol	1:1	✓	[6]
L-Alanine	Dodécanol	1:1	X	-
	Octanol	2:1	X	-
Glycine	Dodécanol	1:1	X	-
	Octanol	2:1	X	-
Hydroxide de tétraméthylammonium	Octanol	1:1	X	-

Les DESs synthétisés dans cette partie ont ensuite été utilisés pour réaliser une extraction solide-liquide des terpènes volatils présents dans différentes matrices de plantes.

### V.2.2. Screening d'une méthode d'extraction

#### V.2.2.1. L'extraction solide-liquide aux ultrasons

Les DESs ont tout d'abord été utilisés comme solvant pour une extraction solide-liquide assistée par ultrasons. Cent milligrammes de muscade sont mélangés à 600 mg de DES et placés aux ultrasons pendant 10 min à 45 °C. Les extraits obtenus sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 4000 rpm puis 100 µL du surnageant sont prélevés et analysés en HS-GC-MS. Les chromatogrammes de la FIGURE V - 3 montrent les potentiels d'extraction des terpènes volatils dans la muscade de 9 DES différents et sont comparés à une extraction à l'eau dans les mêmes conditions.

Ces premiers résultats montrent que les DESs sont autant, voir plus efficace que les liquides ioniques pour l'extraction solide-liquide des terpènes volatils de la muscade dans les mêmes conditions. Cela permet de confirmer que les DESs sont une bonne alternative aux liquides ioniques.

La polarité des DESs étant difficile à évaluer, il est intéressant d'étudier différents DESs en faisant varier le HBA pour un même HBD ou inversement le HBD pour un même HBA. Parmi les 9 DESs testés, 8 sont formés à partir du chlorure de choline comme HBA et différents HBD de diverses natures : l'urée (A), 5 acides carboxyliques (l'acide oxalique (B), l'acide phénylpropionique (C),

l'acide malonique (D), l'acide lactique (E), et l'acide phénylacétique (H)) et 2 sucres (le D-Fructose (F) et le D-Glucose (G)).

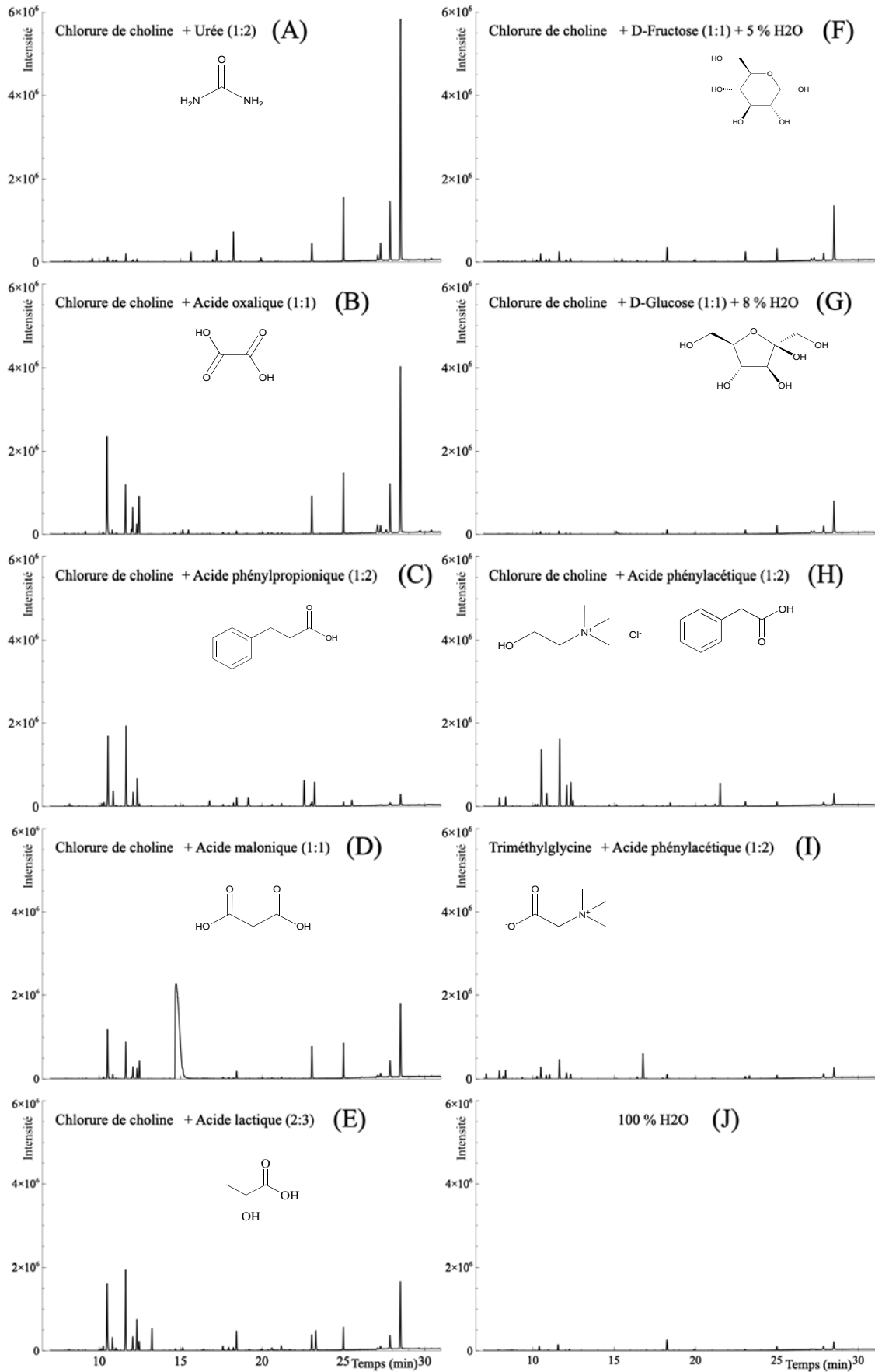


FIGURE V - 3 - Chromatogrammes d'extraits de muscade obtenus par extraction solide-liquide avec différents DESs

Les DESs synthétisés à partir des 2 sucres étaient très visqueux, une faible quantité d'eau (8 % pour le DES (G) et 5 % pour le (F)) a donc été ajoutée à ces deux DESs afin de diminuer leur viscosité. Ces deux DESs (F) et (G) ont un pouvoir extracteur beaucoup plus faible comparé à celui des autres DESs à base de chlorure de choline. Ce résultat peut être dû à une viscosité trop importante qui limite un bon mélange entre le solide et le liquide mais aussi à l'ajout de l'eau. En effet, le chromatogramme (J) représente un extrait aqueux de la muscade. L'eau diminue significativement la concentration en terpènes volatils présents dans l'extrait (F et G). Les 7 autres DESs à base de chlorure de choline ont un pouvoir extracteur des terpènes volatils similaire, mais quelques différences peuvent être observées. L'urée (A) a une sensibilité beaucoup plus importante pour l'extraction des composés à haute masse moléculaire tandis que les acides phénylpropionique (C) et phénylacétique (H) extraient préférentiellement les composés à faible masse moléculaire. Les acides oxalique (B), lactique (E) et malonique (D) permettent d'obtenir ces deux familles de composés (haute et faible masses moléculaires) dans des proportions proches. Cependant, l'acide malonique se dégrade (identification de pics de produits de dégradation sur le chromatogramme) lors de l'analyse de l'extrait ce qui conduit à une co-élution entre l'impureté de l'acide et les composés d'intérêt à analyser. Ce DES ne sera donc plus étudié par la suite. Le solvant d'extraction utilisé doit être compatible avec la méthode d'analyse.

Dans un second temps, l'influence du HBA sur l'efficacité d'extraction a été étudiée en remplaçant le chlorure de choline du solvant (H) par de la triméthylglycine (I) avec le même HBD, l'acide phénylacétique. La triméthylglycine, plus polaire que le chlorure de choline, diminue significativement le pouvoir extracteur du DES pour les terpènes volatils. Ainsi, il faut favoriser les HBA et HBD apolaires aux polaires pour l'extraction des terpènes volatils de polarités et masses moléculaires diverses.

Bien que les DESs soient des solvants prometteurs pour l'extraction des terpènes volatils, la méthode d'extraction utilisée n'est pas adaptée. La répétabilité de la méthode d'extraction solide-liquide aux ultrasons a été évaluée sur 8 extractions réalisées simultanément dans les mêmes conditions d'extraction (TABLE V - 2). Avant analyse par HS-GC-MS, un étalon interne (acétate de menthyle à 85 ppm) est ajouté à l'extrait afin de s'affranchir des variations dues à l'extraction par espace de tête ainsi que celles de l'appareil d'analyse. La variation de la méthode d'extraction aux ultrasons a ainsi pu être évaluée. Le coefficient de variation a été mesuré sur la valeur de l'aire relative (aire du composé par rapport à celle de l'étalon interne) d'une vingtaine de terpènes volatils présents dans les extraits. Les coefficients de variation calculés pour les 20 terpènes volatils étudiés étaient proches ou supérieurs à 30 %.

Différents paramètres ont été étudiés afin de diminuer ces variations :

- le temps d'extraction : un temps d'extraction trop court ne permet pas d'atteindre un équilibre, conduisant à des variations de la quantité extraite de composés,
- le solvant d'extraction : la viscosité du DES pouvant être la cause de ce manque de répétabilité, cette dernière a été évaluée en utilisant l'éthanol comme solvant extracteur.

Aucun changement de ces paramètres d'extraction n'a permis de diminuer les variations de l'extraction aux ultrasons (TABLE V - 2). La cause majeure de ces variations importantes est probablement le manque d'homogénéité des ultrasons dans le bain. En effet, l'extrait placé au centre du bain à ultrasons n'a pas la même composition que celui placé sur les bords du bain. Ainsi il est apparu nécessaire de trouver une alternative à cette méthode d'extraction tout en conservant les DESs comme solvants extracteur.

TABLE V - 2 - Coefficients de variation (RSD) de différents terpènes volatils dans différentes conditions d'extraction assistée par ultrasons couplée aux DESs (1:1) (n=8)

Composé	RSD (%)		
	10 min	20 min	Éthanol (10 min)
$\alpha$ -Pinène	27%	28%	70%
Sabinène	77%	35%	79%
3-Carène	38%	31%	79%
$\beta$ -Myrcène	57%	30%	71%
$\alpha$ -Phellandrène	55%	28%	21%
4-Carène	37%	27%	76%
Limonène	23%	29%	66%
$\beta$ -Phellandrène	173%	28%	57%
$\gamma$ -Terpinène	63%	28%	38%
p-Cymène	54%	30%	61%
Terpinolène	59%	28%	49%
Copaène	46%	23%	41%
$\delta$ -Cadinène	73%	23%	44%
Safrole	33%	9%	24%
Méthyleugénol	20%	27%	27%
Eugénol	24%	41%	32%
Méthylisoeugénol	20%	31%	47%
Élémicine	20%	40%	48%

Myristicine	32%	25%	47%
-------------	-----	-----	-----

#### V.2.2.2. La microextraction sur une goutte dans l'espace de tête (HS-SDME)

La microextraction sur une goutte dans l'espace de tête (HS-SDME) est une méthode permettant d'exploiter le pouvoir extracteur des DESs tout en étant sélectif envers les composés volatils. Grâce au nombre illimité de combinaisons de HBA et HBD possible pour la formation d'un DES, une quantité importante de différentes natures chimiques de phases absorbantes (solvants) est disponible pour la HS-SDME, ce qui n'est pas le cas pour la HS-SPME et la HSSE. Les trois DESs ayant montré la plus grande efficacité d'extraction dans la partie précédente, à savoir les DESs chlorure de choline/urée (1:2), chlorure de choline/acide oxalique (1:1) et chlorure de choline/acide lactique (2:3) ont été sélectionnés pour réaliser des premiers essais préliminaires pour l'extraction de terpènes volatils dans la muscade. Une goutte de 2  $\mu$ L de DES est suspendue dans l'espace de tête d'un échantillon de 100 mg de muscade pendant un temps d'extraction de 20 min à 80 °C. Afin de ne pas obtenir une saturation des pics sur le chromatogramme, la goutte est diluée par un facteur 10 dans l'éthanol et est analysée en GC-MS (FIGURE V - 4). La goutte pourrait être directement injectée dans la GC-MS, cependant la quantité en DES serait trop importante conduisant à la présence d'impuretés non volatiles dans l'injecteur de par la non volatilité des DESs. Ainsi en diluant l'extrait, le volume injecté dans la GC-MS contient seulement un dixième de DES, et les impuretés dans l'injecteur sont alors négligeables. Les chromatogrammes de la FIGURE V - 4 montrent l'efficacité d'extraction des terpènes volatils par HS-SDME couplé aux DESs. L'intensité des pics, principalement pour les molécules à haute masse moléculaire, a augmenté d'un facteur environ 10 pour les DESs formés à partir des acides oxalique (B) et lactique (C) pour l'extraction par HS-SDME par rapport à l'extraction aux ultrasons.

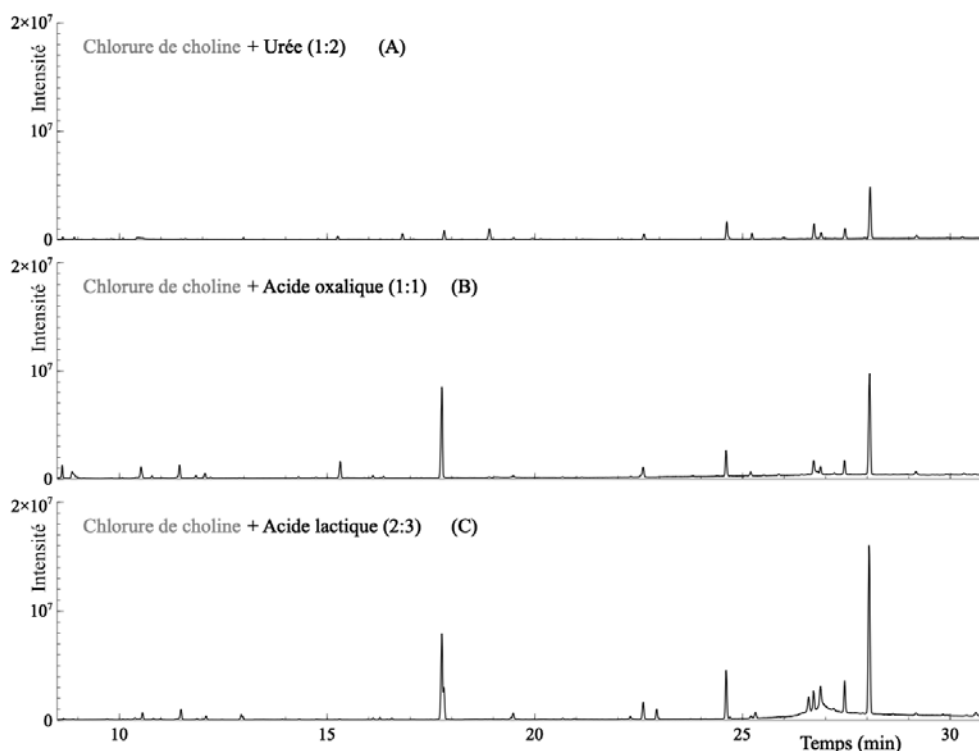


FIGURE V - 4 - Chromatogrammes d'extraits de muscade obtenus par HS-SDME avec différents DESs

La répétabilité de la méthode d'extraction DES-HS-SDME a été évaluée en réalisant 6 extractions simultanées dans les mêmes conditions d'extraction. Avant analyse par GC-MS, un étalon interne (acétate de menthyle à 50 ppm) a été ajouté à l'extrait afin de s'affranchir des variations potentielles dues à l'appareil d'analyse. De même que pour l'extraction aux ultrasons, le coefficient de variation de l'aire relative (aire du composé par rapport à celle de l'étalon interne) d'une vingtaine de terpènes volatils a été calculé. Les coefficients de variations obtenus étaient, pour la grande majorité des composés étudiés, inférieurs à 10 % (TABLE V - 3). Il a donc été considéré que la méthode d'extraction DES-HS-SDME est répétable.

TABLE V - 3 - Coefficients de variation (RSD) de l'extraction de différents terpènes volatils par DES-HS-SDME ( $n=6$ )

Composé	RSD (%)
$\alpha$ -Pinène	16%
Sabinène	9%
3-Carène	12%
$\beta$ -Myrcène	8%
$\alpha$ -Phellandrène	4%
4-Carène	7%
Limonène	8%
$\beta$ -Phellandrène	1%



$\gamma$ -Terpinène	5%
p-Cymène	9%
Terpinolène	4%
Copaène	3%
$\delta$ -Cadinène	4%
Safrole	3%
Méthyleugénol	4%
Eugénol	10%
Méthylisoeugénol	4%
Élémicine	6%
Myristicine	3%

Dans la suite, les paramètres d'extraction de la DES-HS-SDME ont été optimisés par plan d'expérience sauf pour la vitesse d'agitation. En effet, il est conseillé de garder au minimum le nombre de facteur à étudier lors de l'utilisation d'un plan d'expérience. Le temps d'extraction, la température d'extraction ainsi que la taille de la goutte de DES sont des paramètres ayant démontrés une influence significative sur l'efficacité de l'extraction en HS-SDME [9]. En effet, la température ainsi que le temps d'extraction ont une influence sur le coefficient de partage des composés entre l'échantillon et la phase gazeuse. L'agitation d'un échantillon permet d'aider le transfert des composés volatils dans l'espace de tête et ainsi augmenter l'efficacité de l'extraction. Cependant, pour les méthodes de microextraction en espace de tête étudiées précédemment, la HS-SPME ainsi que la HSSE, l'agitation n'avait pas démontré d'influence significative (chapitre III) sur l'efficacité de l'extraction de ces méthodes. Ainsi dans cette partie, avant l'élaboration du plan d'expérience pour l'optimisation des paramètres d'extraction, l'influence de l'agitation de l'échantillon sur l'efficacité de l'extraction a été étudiée. Des extraits de muscade ont été réalisés avec et sans d'agitation lors de l'extraction par DES-HS-SDME et leurs compositions ont été comparés (FIGURE V - 5). L'agitation de l'échantillon n'a pas d'influence significative sur l'extraction des terpènes volatils dans la muscade par DES-HS-SDME. Ce facteur n'a donc pas été pris en compte dans l'élaboration du plan d'expérience, et les extractions ont été réalisés sans agitation afin de favoriser au maximum la stabilité de la goutte de DES en suspension.

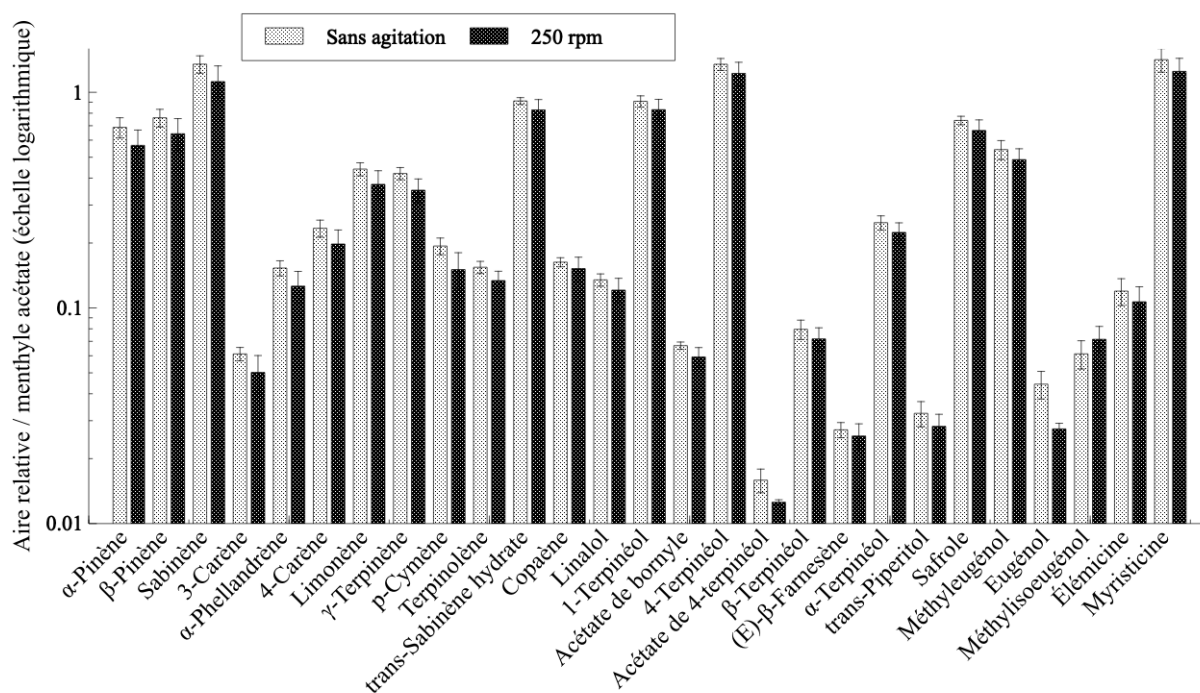


FIGURE V - 5 - Étude de l'influence de l'agitation de l'échantillon sur l'extraction des terpènes volatils dans la muscade par DES-HS-SDME

La méthode d'extraction DES-HS-SDME semble prometteuse pour l'obtention d'extraits concentrés en terpènes volatils mais un certain nombre de paramètres restent à optimiser comme par exemple le temps et la température d'extraction qui seront optimisés dans la suite par plan d'expériences mais aussi la nature du DES. En effet, les DESs employés dans ces premiers résultats préliminaires permettent une bonne extraction des composés à haute masse moléculaire mais en négligeant ceux à faible masse moléculaire. Il sera donc important dans un premier temps de réaliser un criblage de différents DESs afin de trouver le solvant permettant d'obtenir le meilleur compromis pour l'extraction des terpènes volatils de propriétés physicochimiques différentes.

### V.3. ARTICLE : DEEP EUTECTIC SOLVENTS-BASED HEADSPACE SINGLE DROP MICROEXTRACTION FOR THE QUANTIFICATION OF TERPENES IN SPICES

Zélie Triaux<sup>a,b</sup>, Hugues Petitjean<sup>b</sup>, Eric Marchioni<sup>a</sup>, Maria Boltoeva<sup>a</sup>, Christophe Marcic<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France.

<sup>b</sup> Benephyt, 16 rue d'Austerlitz, 67000 Strasbourg, France.

Article soumis dans *Talanta* le 5 Août 2019

### V.3.1. Abstract

Deep eutectic solvents (DESs) were investigated as extracting solvent for headspace single drop microextraction (HS-SDME). The extraction efficiency of 10 DESs mainly composed of tetrabutylammonium bromide ( $N_{4444}Br$ ) and long chain alcohols was evaluated for the extraction of terpenes from six spices (cinnamon, cumin, fennel, clove, thyme and nutmeg). The DES composed of  $N_{4444}Br$  and dodecanol at a molar ratio of 1:2 showed the highest extraction efficiency and was selected to conduct the extractions of terpenes in the rest of the study. HS-SDME was optimized by design of experiments. Only two parameters from the four studied showed a significant influence on the efficiency of the method: the extraction time and the extraction temperature. The optimal extraction conditions were determined by response surface methodology. All extracts were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). More than 40 terpenes were extracted and identified in nutmeg, the richest extract in terpenes in this study. Quantitative analysis based on 29 standards was conducted for each extract. Good linearity was obtained for all standards ( $R^2 > 0.99$ ) in the interval of 1 to 500  $\mu g/g$ . Limits of quantification ranged from 0.47  $\mu g/g$  (borneol) to 86.40  $\mu g/g$  ( $\alpha$ -farnesene) with more than half of the values under 2  $\mu g/g$ . HS-SDME is simple, rapid and cheap compared to conventional extraction methods. The use of DESs makes this extraction method “greener” and it was shown that DESs can be suitable solvents for the extraction of bioactive compounds from plants.

Keywords: Deep eutectic solvents; Microextraction; Chemometric; Terpenes, GC-MS.

### V.3.2. Introduction

The search of natural products for drug discovery has become a keen interest among researchers in the past few decades [10]. Natural products and their bioactive compounds have been used from ancient times for the treatment of various diseases and their potential to substitute chemical drugs has been widely studied [11]. Natural bioactive components mostly come from secondary metabolites. Compared to primary metabolites essential to physiological processes of a living organism (growth, development and reproduction), secondary metabolites are slightly less vital. Secondary metabolites are synthesized by the organism and can have different functions in the organism. They can serve as a defense against predatory agents or, on the contrary, attract species with beneficial effects (such as pollinators), or even allow communication between plants by sending warning signals [12].

There are three main categories of plant secondary metabolites : terpenes and terpenoids, alkaloids and phenolic compounds [13]. With 70,000 known structures [14], terpenes represent the widest family of

natural compounds. They are categorized by their isoprene (five-carbon) units. As such, monoterpenes are composed of two linked isoprene units, sesquiterpenes of three, diterpenes of four, sesterpene of five and so on. Monoterpenes, as well as some sesquiterpenes, are highly volatile compounds and the main constituents of essential oils [15]. They are broadly used in different fields such as fragrances in perfume industry or as flavor enhancers in food industry but their use as natural drugs has drawn the attention of many researchers and pharmaceutical industries [16]. Due to the diversity of their chemical structures, monoterpenes have shown a wide variety of biological activities such as antioxidant [17], anti-inflammatory [18], antibacterial [19], anticonvulsant [20], antinociceptive [21]. The biological activity of a product is closely linked to its concentration. Thus, to evaluate precisely the concentration of the potential bioactive compound in an extract, the extraction and analytical steps should not be neglected.

The conventional methods used for the extraction of terpenes in natural products include maceration, Soxhlet extraction, percolation and solvent extraction [16]. Usually these processes involve long and complicated extraction period, low yield and large volume of hazardous organic solvents. In the search of making sample preparation “greener”, microextraction techniques have emerged. These methods have high sensitivity, require low volumes of organic solvents, and can even be solventless. Moreover, they are simple to use, low cost and amenable to automation. Different microextraction techniques have been applied for the determination of volatile chemicals in plants such as solid phase microextraction (SPME), stir bar sorptive extraction (SBSE), single drop microextraction (SDME), hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) and dispersive liquid liquid microextraction (DLLME) [22]. To enhance the sensitivity towards volatile compounds, headspace microextraction techniques can be implemented without any sample pretreatment process. Headspace single drop microextraction (HS-SDME) was first introduced by Theis *et al.* in 2001 [23]. In HS-SDME, a solvent drop of few microliters is suspended at the tip of a microsyringe needle and exposed to the headspace of a sample. The sample is heated, the target compounds volatilized and adsorbed on the solvent drop.

After extraction, the suspended drop is retracted back into the microsyringe and analyzed most often by gas chromatography. This method is fast, simple, inexpensive and requires only microliters of solvents. One of the most important parameters of HS-SDME is the choice of the extracting solvent. The latter should answer to essential criteria to ensure the stability of the drop: low volatility, low vapor pressure, thermal stability and enough viscosity. The common solvents used for SDME such as toluene, hexane, isooctane, decane, *n*-octyl alcohol are toxic for the environment and often have non-negligible volatility which can cause the evaporation of the drop [24]. First ionic liquids (ILs) have emerged as an alternative to organic solvents in HS-SDME due to their negligible vapor pressure [25]. However, concerns about the application of ILs for the extraction of bioactive compounds have arisen due to the toxicity of these solvents, their potential effects on health and environment, and the high cost associated with their synthesis and purification requirements [26].

To overcome the limitations of ILs, deep eutectic solvents (DESs) have emerged. A DES is usually composed of a mixture consisting of a hydrogen bond acceptor (HBA) with a hydrogen bond donor (HBD). Those two compounds are mixed at a precise molar ratio called a eutectic point at which, simply by heating, they form a new solvent liquid at room temperature. The first DES was introduced by Abbot et al. and was made of choline chloride and urea at a molar ratio of 1:2 [1]. DESs have similar solvent characteristics to ILs but are cheaper to produce due to the low costs of raw materials, less toxic and often biodegradable. In addition to being ecofriendly, physicochemical properties of DESs are easily tunable by changing one of the two components of the system. An unlimited number of combinations exist to form DESs allowing them to have a wide range of applications. They have been used as dissolution solvents, catalysis solvents, in organic synthesis, in electrochemistry, in the preparation of nanoparticles and as extraction solvents [27]. DESs have been used for the extraction of bioactive compounds by different extraction techniques such as microwave-assisted extraction, ultrasonic-assisted extraction, heating-stirring extraction, liquid-liquid extraction [26]. However, DESs have rarely been used for HS-SDME [28] or for the extraction of terpenes [29–31] and only once for the extraction of terpenoids by HS-SDME to our knowledge [32].

Based on the discussion above, the aim of the present study was to develop a robust and efficient extraction method for terpenes by coupling novel green solvents (DESs) to a well-known extraction method sensitive to volatiles compounds (HS-SDME). To conduct this study, the development of the extraction method was done for spices, model of plant rich in terpenes. DES-HS-SDME was first optimized by design of experiments and then applied to six spices (cinnamon, cumin, fennel, clove, thyme and nutmeg) to evaluate the efficiency of the method for the extraction of terpenes from plants. Qualitative and quantitative analysis based on 29 standards were conducted for each extract.

### V.3.3. Experimental

#### V.3.3.1. Chemicals and materials

Tetrabutylammonium bromide ( $N_{4444}\text{-Br}$ ,  $\geq 99\%$ ), decanol ( $\geq 99\%$ ),  $\beta$ -citronellol ( $\geq 95\%$ ), anethole ( $\geq 98\%$ ) and  $\alpha$ -terpineol ( $\geq 97\%$ ) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Butanol ( $\geq 99.5\%$ ) and ethanol ( $\geq 99.8\%$ ) were purchased from Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). Methanol ( $99.9\%$ ) was obtained from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). Methyltrioctylammonium chloride ( $N_{8881}\text{-Cl}$ ,  $\geq 97\%$ ), octanol ( $99.3\%$ ), dodecanol ( $\geq 98\%$ ), hexanoic acid ( $99\text{--}100\%$ ), lactic acid ( $\geq 85\%$ ), choline chloride ( $\geq 98\%$ ), urea ( $\geq 99.5\%$ ),  $\alpha$ -pinene ( $99\%$ ),  $\beta$ -pinene ( $99\%$ ), camphene ( $95\%$ ), p-cymene ( $99\%$ ), 3-carene ( $\geq 90\%$ ), linalool ( $97\%$ ), limonene ( $97\%$ ), pulegone ( $97\%$ ), 4-terpineol ( $\geq 95\%$ ), caryophyllene ( $\geq 98.5\%$ ), menthone ( $97\%$ ), camphor ( $96\%$ ), menthol ( $99\%$ ), borneol ( $\geq 99\%$ ), estragole ( $98\%$ ),  $\alpha$ -humulene ( $96\%$ ), farnesene (mixture of isomers), eucalyptol ( $99\%$ ), cuminaldehyde ( $98\%$ ), eugenol ( $99\%$ ), carvacrol ( $98\%$ ), menthyl

acetate (97 %) and thymol (98 %) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Geraniol (98 %) was purchased from Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany).

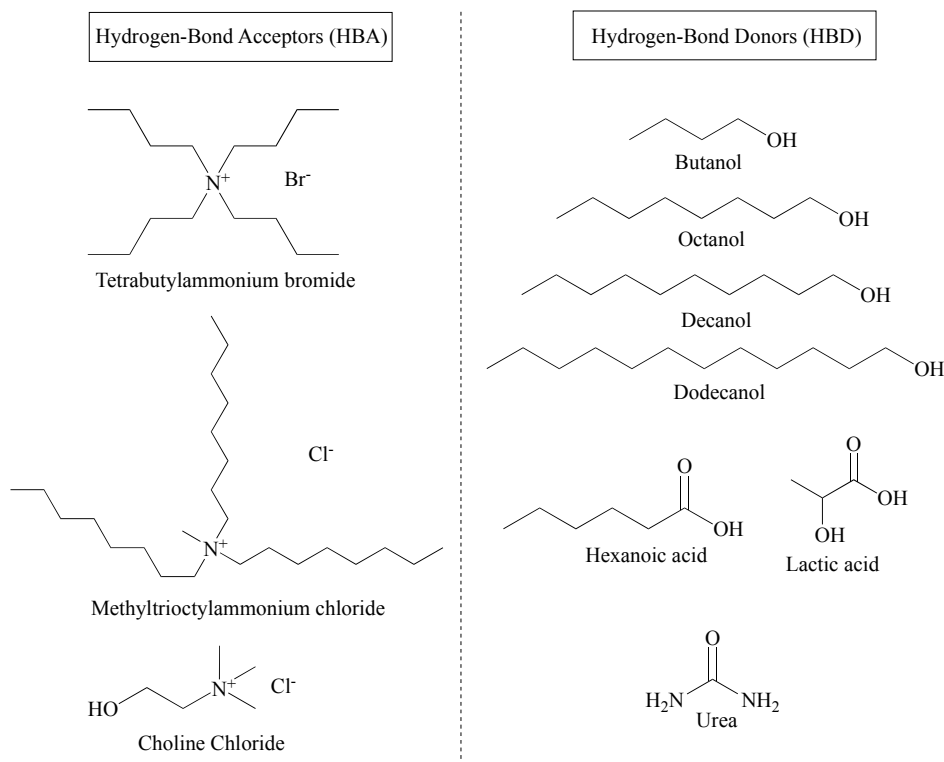
Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*, Chamsyl), thyme (*Thymus vulgaris*, Chamsyl), cumin (*Cuminum cyminum*, Conquête des saveurs), fennel (*Foeniculum vulgare*, Ducros), clove (*Syzygium aromaticum*, Ducros) and nutmeg (*Myristica fragrans*, Ducros) were all bought from a local shop. Spices were obtained as fine-grained powders, except for fennel which was seeds, and thyme which was cut in small pieces. All food samples were used as bought; no additional grinding was done.

### V.3.3.2. Preparation of deep eutectic solvents (DESs)

The synthesis of DESs was adapted from Tang *et al.* [6]. Briefly, two components, a hydrogen-bond donor (HBD) and a hydrogen-bond acceptor (HBA), were weighed according to their appropriate molar ratio and put in a closed glass vessel. To form the DES, the mixture of HBD and HBA was heated at 80 °C under constant stirring until a homogeneous liquid was formed (approximately 2 hours). With 3 different HBAs and 7 HBDs, ten combinations of DESs (TABLE V - 4) were prepared.

TABLE V - 4 - List of synthesized DES and their chemical structures

Abbreviations	HBA	HBD	Molar ratio
N <sub>4444</sub> Br/But	N <sub>4444</sub> -Br	Butanol	1:2
N <sub>4444</sub> Br/Oct	N <sub>4444</sub> -Br	Octanol	1:2
N <sub>4444</sub> Br/Dec	N <sub>4444</sub> -Br	Decanol	1:2
N <sub>4444</sub> Br/DoDec	N <sub>4444</sub> -Br	Dodecanol	1:2
N <sub>4444</sub> Br/HexA	N <sub>4444</sub> -Br	Hexanoic acid	1:1
N <sub>4444</sub> Br/LactA	N <sub>4444</sub> -Br	Lactic acid	1:2
N <sub>8881</sub> Cl/HexA	N <sub>8881</sub> -Cl	Hexanoic acid	1:1
N <sub>8881</sub> Cl/DoDec	N <sub>8881</sub> -Cl	Dodecanol	1:1
ChCl/Urea	Choline Chloride	Urea	1:2
ChCl/LactA	Choline Chloride	Lactic acid	2:3



### V.3.3.3. Headspace single drop microextraction (HS-SDME) procedure

Fifty milligrams of sample were weighed in a 20 mL headspace vial (23 x 75 mm) which was closed with PTFE-lined silicon septa and metallic screw caps. The needle of a 10  $\mu$ L GC microsyringe (10R, SGE Analytical Science Pty Ltd, Australia) containing 1.5  $\mu$ L of DES was introduced in the headspace of the sample vial through the septum. The volume of DES was then pushed down the microsyringe to form a drop at the tip of the needle. The vial with the microsyringe was placed in an incubator at 80 °C during 90 min allowing the absorption of the volatile compounds on the DES drop. Once the extraction process was completed, the drop was withdrawn into the microsyringe, disposed in a 250  $\mu$ L insert (29 x 5.7 mm) placed in a 2 mL vial and weighed. To prevent the analytical instruments from damages, the drop was diluted in ethanol and spiked with an internal standard prior to injection in GC-MS. The microsyringe was washed 4 times with ethanol and 2 times with the extraction DES before each extraction.

### V.3.3.4. Optimization of DES-HS-SDME conditions by design of experiments

A design of experiments approach was used to optimize the different parameters of DES-HS-SDME. This approach allows to identify which parameters have a significant influence on the response, if there are interactions between the parameters and to find the optimal extraction

conditions. The response was defined as the area of the peak of the corresponding compound: one peak corresponds to one response.

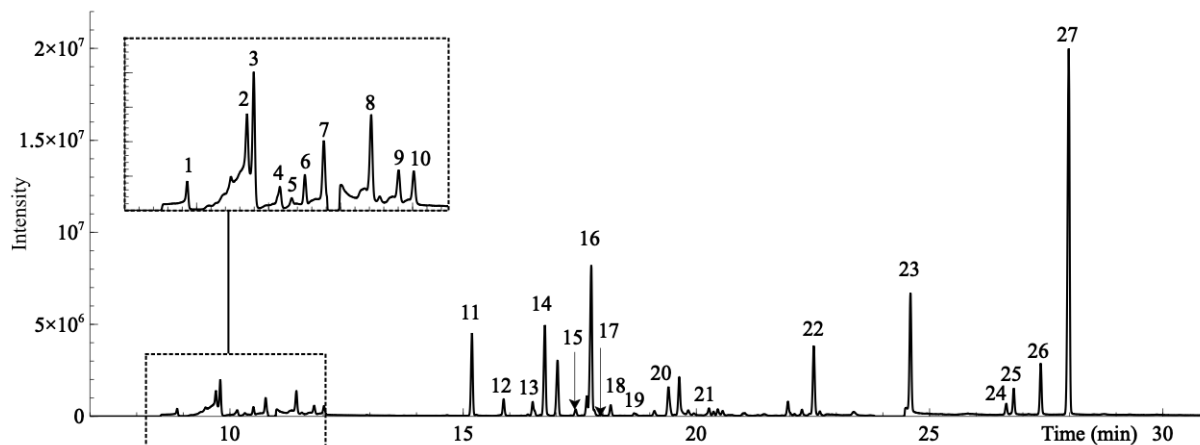


FIGURE V - 6 - Total ion chromatogram obtained for nutmeg extracts by DES-HS-SDME. Selected compounds for the optimization by design of experiments. 1,  $\alpha$ -Pinene; 2,  $\beta$ -Pinene; 3, Sabinene; 4, 3-Carene; 5,  $\alpha$ -Phellandrene; 6, 4-Carene; 7, Limonene; 8,  $\gamma$ -Terpinene; 9, *p*-Cymene; 10, Terpinolene; 11, *trans*-Sabinene hydrate; 12, Copaene; 13, Linalool; 14, 1-Terpineol; 15, Bornyl acetate; 16, 4-Terpineol; 17, 4-Terpineol acetate; 18,  $\beta$ -Terpineol; 19, (*E*)- $\beta$ -Farnesene; 20,  $\alpha$ -Terpineol; 21, *trans*-Piperitol; 22, Safrole; 23, Methyl eugenol; 24, Eugenol; 25, Isoeugenol methyl ether; 26, Elemicin; 27, Myristicine.

To optimize the extraction conditions for a maximum of compounds, 27 different characteristic terpenes in nutmeg (FIGURE V - 6) were used as responses. This way, the influence of the extraction parameters on 27 different compounds will be analyzed by the design of experiments approach. The 27 compounds all have different chemical properties, such as polarities and boiling points. The aim is to find optimal conditions which are a compromise of the optimal conditions for each individual terpene found in nutmeg.

For data manipulation, JMP<sup>®</sup> Statistical Discovery<sup>™</sup> 8 (SAS Institute) was used. First, for the screening of the influential parameters, a  $2^4$  full factorial design was built. The number of experiments required for this design was equal to 19 ( $2^4 +$  three central points). The data obtained from those experiments were fitted according to the following equation corresponding to a second order model [33]:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_4x_4 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{14}x_1x_4 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{24}x_2x_4 + \beta_{34}x_3x_4 + \varepsilon \quad \text{EQUATION V - 1}$$

where  $y$  is the response (the area of a selected peak);  $x_i$  are the studied parameters;  $\beta_0$  is the constant;  $\beta_i$  are the coefficients of the parameters;  $\beta_{ij}$  are the coefficients of the interaction parameters; and  $\varepsilon$  is the experimental error. The aim of this first design is to calculate the significance of the coefficient of each factor on the response.



Then, choosing only the significant parameters, a  $2^2$  faced centered design was used to determine the optimal extraction conditions for each response. The number of experiments required for this design was equal to 11 :  $2^2=4$  points corresponding to the full factorial design + 3 central points + 4 points on each face of the experimental domain corresponding to a square for a  $2^2$  design. The data obtained from those experiments were fitted according to the following equation, adding quadratic terms to the previous equation for the determination of the optimum conditions [33]:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \varepsilon \quad \text{EQUATION V - 2}$$

where  $\beta_{ii}$  represents the coefficients of the quadratic parameters.

With this design, for each response, optimal extraction conditions were obtained, i.e. 27 slightly different optimal extraction conditions were determined. To find optimal conditions which are a compromise for all 27 responses, the desirability function approach was used [34]. This method consists of first drawing desirability functions ( $d$ ) for each response. The desirability is defined as such :  $d=0$ , lowest desirability obtained for the lowest peak area;  $d=1$ , highest desirability obtained for the highest peak area. Then an overall desirability function ( $D$ ) is drawn from the partial desirability functions obtained for each compound. Optimal extraction conditions are found when the overall desirability is maximized, the aim being maximizing the peak area of each compound (corresponding to maximizing the extraction efficiency).

The experimental data was fitted by least squares. To validate the adequacy of the model's design to fit the experimental data, three values were evaluated. Model's explained variations  $R^2 \geq 0.8$  and predicted variations  $Q^2 \geq 0.5$  showed an acceptable fitting of the data [35]. The values of  $Q^2$  are not needed for the screening design because the aim of this design is not to predict the responses. They are calculated for the face centered design for which the aim is to predict the optimal conditions for the responses. The lack of fit (LoF) of the model was calculated by comparing the model error to the experimental error by an  $F$ -test. The statistical significance of the coefficients of the extraction parameters ( $\beta_i$ ,  $\beta_{ij}$  and  $\beta_{ii}$ ) were estimated using an analysis of variance (ANOVA) with a 95 % confidence level.

#### V.3.3.5. Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) conditions

GC-MS analyses were conducted on a 450-GC/240-MS system (Varian, Les Ulis, France). Two microliters of the extract were injected in a split/splitless injector at 210 °C. The compounds were then carried on a DB-WAX capillary column (60 m x 0.25 mm x 0.15  $\mu$ m) (Agilent Technologies, Les Ulis, France) by helium (purity 99.9999 %) at 1 mL/min. They were separated along the column according to the following heating program : 1 min at 40°C, increased to 100°C at 10°C/min, heated to 130°C at 5 °C/min, heated to 150°C at 10°C/min, heated to 180°C at 5°C/min, heated to 230°C at

10°C/min and then held isothermal at 230°C for 5 min. For the MS parameters, the transfer line was set at 200 °C and the ion source at 150 °C. The electron multiplier was set to 70 eV. The mass spectra were recorded in a full scan mode in the range of 50 – 200 *m/z*. Peaks were identified by referring mass spectra to the NIST mass spectral database considering a match factor higher than 800 a good match. The identification was then confirmed by calculating the retention index (RI) of each compound and comparing it to the literature for DB-WAX type columns.

#### V.3.3.6. Quantification of terpenes in spices

Quantification of terpenes in the extracts was carried out by using 29 standards (FIGURE V - 7). Those compounds were chosen based on their difference in terms of physicochemical properties, namely polarity, volatility and molecular mass to cover the widest possible range of terpenes. For each compound, calibration curves were drawn with 10 points in two concentration ranges: from 1 µg/g to 10 µg/g and from 10 µg/g to 500 µg/g. Solutions were prepared in methanol. Each concentration was extracted in triplicates. For the extraction, 20 µL of the standards solution was mixed with 50 mg of inert Fontainebleau sand (previously heated at 600 °C for 4 hours) and placed in a 20 mL headspace vial (23 x 75 mm) which was closed with PTFE-lined silicon septa and metallic screw caps. The extraction was then carried out according to 2.3. Each standard was quantified according to the area of the compound's selected ion which was extracted from the TIC analysis (usually the main ion of compound's mass spectra). The limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ), defined as the lowest concentrations detected at a signal-to-noise ratio of three or ten respectively, were calculated for each standard. The calibration curves were drawn above the LOQ for all standards.

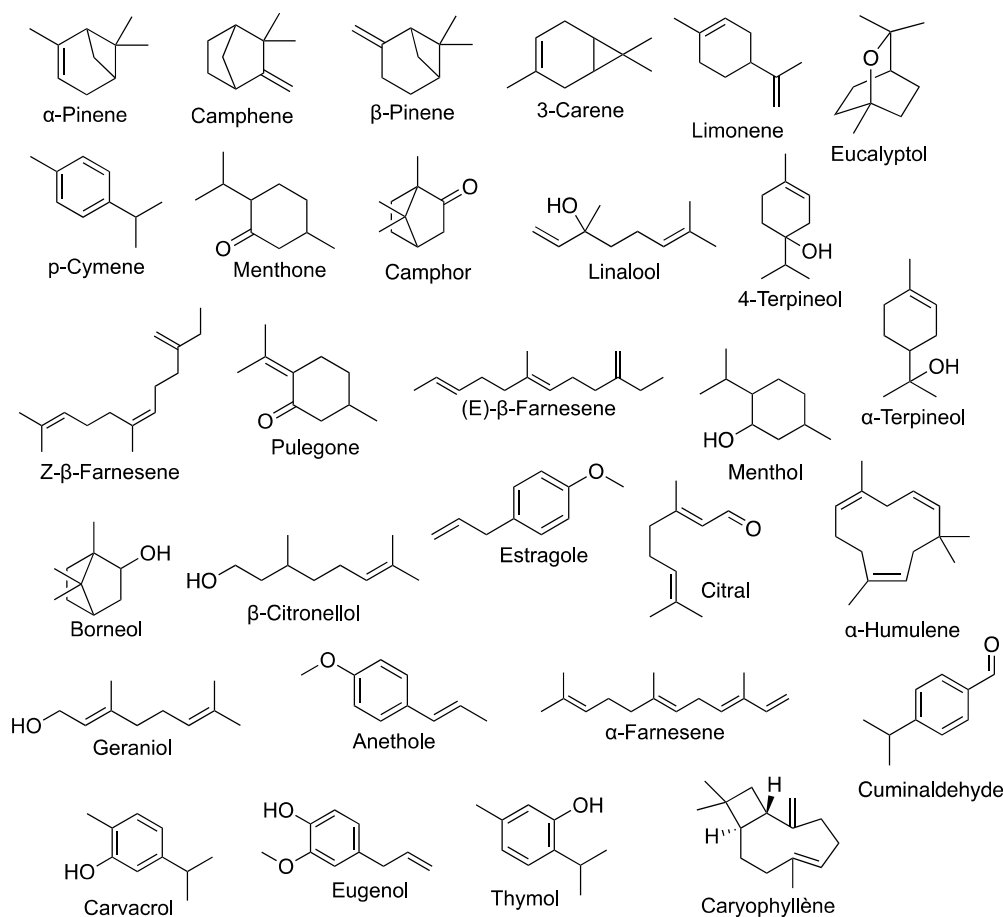


FIGURE V - 7 - Structures of the 29 standards used for the quantification analysis

### V.3.4. Results and discussion

#### V.3.4.1. Screening of DESs

The choice of the extracting solvent is a crucial parameter in the HS-SDME extraction. In HS mode, to ensure drop stability the solvent should have low volatility, low vapor pressure and enough viscosity [24]. DESs have high thermal stability and negligible volatility [36]. With hundreds of combinations possible to obtain a DES, one can easily be tailored made to meet the physicochemical properties (such as the viscosity, for example) needed for HS-SDME and its polarity can conveniently be tuned to the one of the studied compounds.

10 different DESs were tested for the extraction of terpenes in nutmeg. In this study, nutmeg was selected as a model as it is a plant rich in a wide variety of terpenes [37]. The effect of the extracting solvent on the extraction efficiency is shown in FIGURE V - 8. This figure presents the number of identified compounds in the extracts obtained with the various DESs but also the quantity extracted (relative to the peak area) for 27 characteristic terpenes found in nutmeg. Those compounds have

different polarities and boiling points, the aim is to find a DES able to extract the widest range of terpenes.

DESs are composed of two components, a HBA and a HBD, changing one of them can change the physicochemical properties of the DES. To find the most efficient DES for the extraction of terpenes, different combination of DESs were tested. The influence of an increase of the alkyl chain from 4 carbons (butanol) to 12 carbons (dodecanol) of the HBD on the extraction efficiency was studied (FIGURE V - 8(a)). The corresponding HBA used was  $N_{4444}Br$ . For most compounds, increasing the carbon chain from 4 carbons to 8 carbons increases the extraction efficiency. Beyond 8 carbons, the amount of terpenes extracted does not increase but using a carbon chain of 12 carbons (dodecanol) allows to extract more compounds (42) than the other HBDs studied (39, 34, 32 compounds for butanol, octanol and decanol, respectively). Even though the physicochemical properties of DESs are difficult to evaluate, an increase of the carbon chain decreases probably the polarity of the solvent which is more suitable for the studied compounds according to the results. From those results,  $N_{4444}Br/DoDec$  was selected and compared to other  $N_{4444}Br$  based DESs by changing the chemical nature of the HBD.

Two other HBDs were studied: hexanoic acid and lactic acid. Using hexanoic acid as the HBD of the DES allowed to extract 36 compounds from nutmeg while with lactic acid as the HBD, only 30 compounds were identified in the extract (FIGURE V - 8(b)). As lactic acid is likely to be more polar than hexanoic acid,  $N_{4444}Br/LactA$  is less adequate for the extraction of terpenes than the other two DESs tested. For almost all studied compounds,  $N_{4444}Br/hexanoic\ acid$  extracts with the same extraction efficiency as  $N_{4444}Br/dodecanol$ . However, some compounds have more affinity with dodecanol than for hexanoic acid as 36 compounds are extracted by  $N_{4444}Br/HexA$  compared to 42 by  $N_{4444}Br/DoDec$ .

$N_{4444}Br/DoDec$  was again selected after those observations and compared to another DES by changing its HBA to  $N_{8881}Cl$ .  $N_{8881}Cl$  seems to be more apolar than  $N_{4444}Br$ , however the latter extracts more compounds (42) than the first one (32) (FIGURE V - 8(c)). The extraction efficiency of  $N_{4444}Br/DoDec$  was also compared to the one of other DESs and in particular to the most used DES [38]: choline chloride/urea (1:2).  $ChCl/Urea$  showed a very weak extraction efficiency for the studied compounds as well as  $ChCl/LacA$ : only 7 compounds were extracted by  $ChCl$  from nutmeg and 11 by  $ChCl/LacA$  (FIGURE V - 8(d)).  $ChCl$  has an alkyl chain shorter than the other two HBA studied which results in a higher polarity.  $ChCl$  based DESs are thus not well adapted for the extraction of terpenes.  $N_{4444}Br/DoDec$  (1:2) showed higher extraction efficiency than the other 9 DESs studied in this work and was selected for the optimization of the DES-HS-SDME extraction parameters.

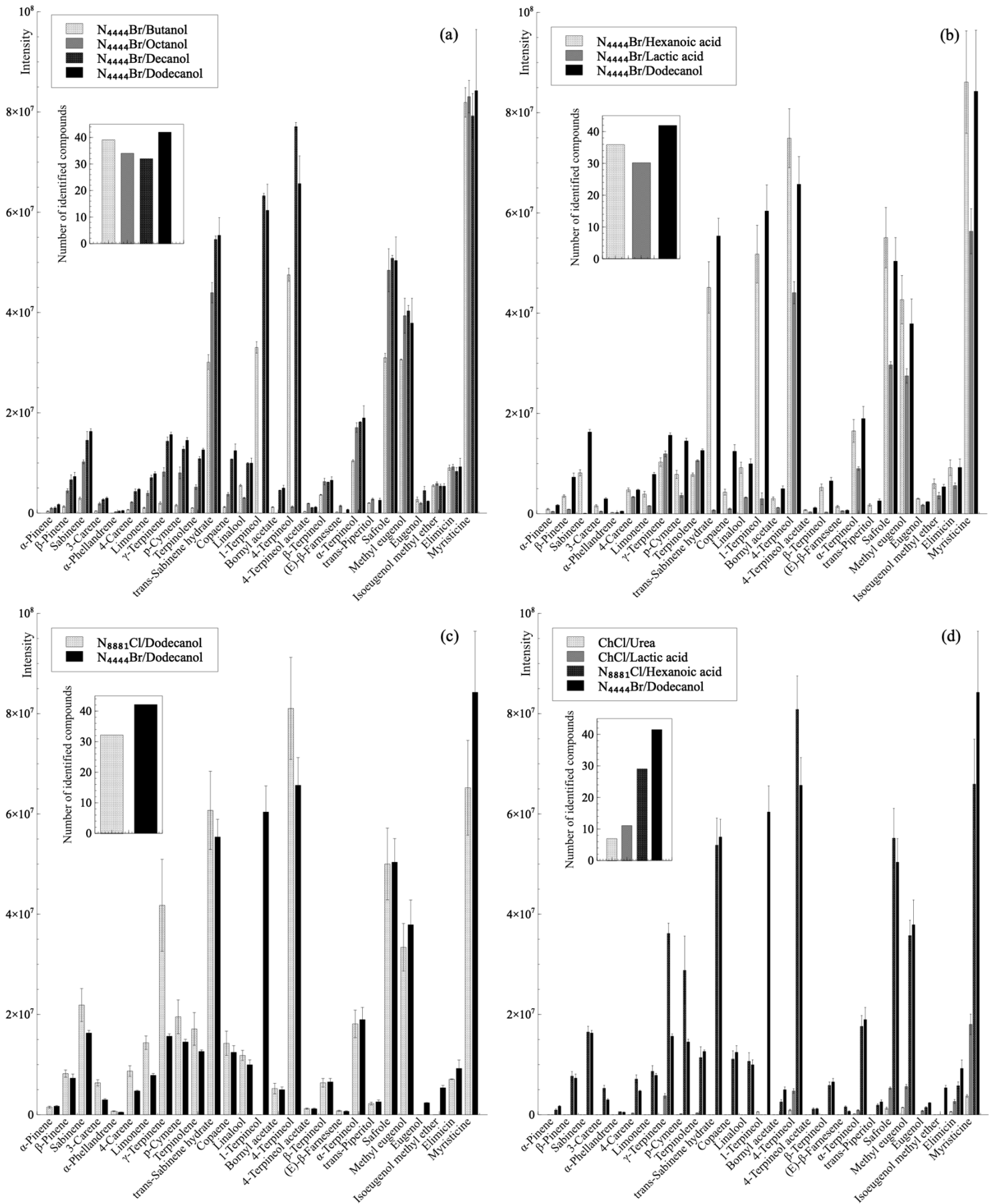


FIGURE V - 8 - Screening of DESs for the extraction of terpenes from nutmeg. (a) Increasing the alkyl chain of the HBD. (b) Changing the chemical nature of the HBD. (c) Changing the chemical nature of the HBA. (d) Other natures of DESs

### V.3.4.2. Optimization of DES-HS-SDME conditions by design of experiments

#### V.3.4.2.1. Screening of the significant extraction conditions: 2<sup>4</sup> full factorial design

The optimization of the extraction parameters is an essential step of developing a robust and repeatable extraction method. When dealing with solid/gas and gas/liquid equilibria, like for HS-SDME, it is necessary to have extraction parameters at which the equilibrium state is reached. In most cases, the optimization of the HS-SDME parameters is done by optimizing one-variable-at-a-time (OVAT) while holding the others fixed [39–42]. Though this approach can lead to the best extraction conditions, it does not consider the interactions between the variables. With the design of experiments approach, the optimal conditions are found with a minimal number of experiments necessary while determining the influential parameters and their potential interactions.

The first step is to screen the different interaction parameters and find the influential ones. The parameters studied and their respective levels are reported in Table V - 5. Four parameters (extraction temperature  $T$ , extraction time  $t_{ext}$ , drop volume  $V$  and sample mass  $M$ ) were tested at three levels (-1; 0; +1). Three experiments at the central point of each parameter have been carried out. A 2<sup>4</sup> full factorial design was used.

Table V - 5 - Factors and levels used in 2<sup>4</sup> Full Factorial Design

Factor	Factor notation	Levels		
		-1	0	+1
Extraction temperature (°C)	T	60	70	80
Extraction time (min)	$t_{ext}$	5	17.5	30
Drop volume (μL)	V	0.5	1.5	2.5
Sample mass (mg)	M	50	75	100

The model used to fit the data of the experiments was considered well adapted (TABLE V - 6):  $R^2 > 0.8$  for all responses and no lack of fit was observed.  $T$  and  $t_{ext}$  had a statistical positive influence on most responses (78 % of the responses for  $T$  and 96 % for  $t_{ext}$ ). That means that an increase of those parameters results in an increase of the responses. The data also showed a strong correlation between  $T$  and  $t_{ext}$  as the coefficient of their interaction was statistically significant for 96 % of the responses. This demonstrates that those two variables shouldn't be studied separately from one another. No statistically significant interactions between the other factors were observed. The increase of the drop volume from 0.5 μL to 2.5 μL resulted in an increase of one response ( $\alpha$ -pinene) and a decrease of 34 % of the responses, while the mass sample was statistically significant for only one response. As those two factors were not significant for almost all responses, they were fixed for the rest of the study.

The volume of the drop was fixed at 1.5  $\mu\text{L}$ . The sample mass was fixed at 50 mg, the lower value of the interval studied, in order to work with the lowest quantity of raw material possible. In fact, raw material can be rare or difficult to obtain, an extraction method needing few raw materials is therefore a great advantage.

TABLE V - 6 - Validation of the model's fitness (explained variations ( $R^2$ ) and lack of fit (LoF) of the 2<sup>4</sup> Full Factorial Design screening the influence of the extraction parameters (extraction temperature (T), extraction time (text), drop volume (V) and sample mass (M)) of DES-HS-SDME

Compound	T	t <sub>ext</sub>	V	M	T*t <sub>ext</sub>	T*V	t <sub>ext</sub> *V	T*M	t <sub>ext</sub> *M	V*M	R <sup>2</sup>	LoF
$\alpha$ -Pinene	+	+	+	+	+	-	ns	ns	+	ns	0.919	0.0328*
$\beta$ -Pinene	ns	+	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	0.873	ns
Sabinene	ns	+	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	0.906	ns
3-Carene	ns	+	ns	ns	+	ns	ns	+	ns	ns	0.891	ns
$\alpha$ -Phellandrene	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.829	ns
4-Carene	+	+	ns	ns	+	ns	ns	+	ns	ns	0.912	ns
Limonene	ns	+	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	0.886	ns
$\gamma$ -Terpinene	+	+	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	0.897	ns
p-Cymene	ns	+	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	0.872	ns
Terpinolene	+	+	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	0.895	ns
trans-Sabinene hydrate	+	+	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	0.951	ns
Copaene	+	+	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	0.925	ns
Linalol	+	ns	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	0.927	ns
1-Terpineol	+	+	ns	ns	+	ns	ns	+	ns	ns	0.964	ns
Bornyl acetate	+	+	ns	ns	+	ns	ns	+	ns	ns	0.964	ns
4-Terpineol	+	+	ns	ns	+	ns	ns	+	ns	ns	0.959	ns
4-Terpineol acetate	+	+	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	0.953	ns
$\beta$ -Terpineol	+	+	-	ns	+	ns	ns	+	ns	ns	0.964	ns
(E)- $\beta$ -Farnesene	+	+	-	ns	+	ns	ns	+	ns	ns	0.977	ns
$\alpha$ -Terpineol	+	+	-	ns	+	ns	ns	+	+	ns	0.972	ns
trans-Piperitol	+	+	-	ns	+	ns	-	ns	ns	ns	0.973	ns
Safrole	+	+	ns	ns	+	ns	ns	ns	ns	ns	0.965	ns
Methyl eugenol	+	+	-	ns	+	ns	-	ns	ns	ns	0.982	ns
Eugenol	+	+	-	ns	+	-	ns	ns	ns	ns	0.932	ns
Isoeugenol methyl ether	+	+	-	ns	+	ns	-	ns	ns	ns	0.987	ns
Elimicin	+	+	-	ns	+	ns	-	ns	ns	ns	0.991	ns
Myristicine	+	+	-	ns	+	ns	-	ns	ns	ns	0.983	ns

<sup>a</sup> Positive effect

<sup>b</sup> Negative effect

<sup>c</sup> Not significant

### V.3.4.2.2. Finding the optimum: 2<sup>2</sup> face centered design

For the determination of the optimal extraction conditions, a 2<sup>2</sup> face centered design was built with only the parameters who had a statistically influence on the responses (V.3.4.2.1.): the extraction temperature  $T$ , and the extraction time  $t_{ext}$ . As observed from the previous design (V.3.4.2.1.), an increase of  $T$  from 60 to 80 °C and  $t_{ext}$  from 5 to 30 min leads to a significative increase of the responses. The studied intervals were therefore increased (from 70 to 90 °C for  $T$  and from 60 to 120 min for  $t_{ext}$ ) to find the optimum settings. TABLE V - 7 resumes the levels chosen for each factor.

TABLE V - 7 - Factors and levels used in 2<sup>2</sup> Face Centered Design

Factor	Factor notation	Levels		
		- $\alpha$ (-1)	0	+ $\alpha$ (+1)
Extraction temperature (°C)	T	70	80	90
Extraction time (min)	$t_{ext}$	60	90	120

The model used to fit the data obtained from the experiments was considered well adapted: values of  $R^2 > 0.8$  were obtained for all responses but one (4-terpineol acetate), values of  $Q^2 > 0.5$  were obtained for 93% of the responses and no lack of fit was observed for any of the responses (TABLE V - 8).  $t_{ext}$  was found not statistically significant in this interval as an increase of  $t_{ext}$  from 60 to 120 min had a significative impact on less than half the responses (41%).

A known phenomenon was observed regarding the results obtained for  $T$ . An increase of this parameters led to an increase of 29 % of the responses but led to a decrease of 59 % of the responses. This observation is strongly linked to the physicochemical properties of the studied compounds. In Table 5, the terpenes are ordered by their retention indexes which is directly related to their boiling point, i.e.  $\alpha$ -pinene has the lowest boiling point (156 °C) while myristicine has the highest one (277 °C). The 29 % of the responses (from  $\alpha$ -terpineol to myristicine) which were increased by an increase of the temperature are the ones with high boiling point, those compounds are volatile at higher temperatures. On the contrary, the 59 % of the responses (from  $\alpha$ -pinene to 4-terpineol) which were decreased by an increase of the temperature are the ones with lowest boiling points, those compounds are volatile at lower temperatures. When an increase of temperature occurs, the gas phase will be enriched in molecules with higher boiling points in addition with the ones with low boiling points, thus more high boiling points components will absorb in the DES drop resulting in an increase of their responses. Furthermore, at high temperatures, compounds with low boiling points might have more affinity with the gas phase than with the DES drop, which leads to the decrease of their responses. This phenomenon can be associated to the back-extraction of the compounds in the headspace [43].



TABLE V - 8 - Validation of the model's fitness (explained variations ( $R^2$ ), predicted variation ( $Q^2$ ) and lack of fit (LoF) of the 22 Face Centered Design determining the optimal extraction conditions (extraction temperature (T) and extraction time (text)) of DES-HS-SDME

Compound	T	t <sub>ext</sub>	T*t <sub>ext</sub>	T <sup>2</sup>	t <sub>ext</sub> <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Q <sup>2</sup>	Lack of fit
α-Pinene	-	ns	ns	ns	ns	0.878	<0.500	ns
β-Pinene	-	ns	+	ns	ns	0.960	0.638	ns
Sabinene	-	ns	+	ns	ns	0.951	0.565	ns
3-Carene	-	ns	+	ns	-	0.976	0.857	ns
α-Phellandrene	-	ns	+	ns	-	0.970	0.767	ns
4-Carene	-	ns	+	ns	ns	0.942	0.505	ns
Limonene	-	ns	+	ns	ns	0.951	0.615	ns
γ-Terpinene	-	ns	+	ns	-	0.954	0.606	ns
p-Cymene	-	ns	+	ns	-	0.955	0.648	ns
Terpinolene	-	ns	+	-	-	0.982	0.834	ns
trans-Sabinene hydrate	-	ns	+	-	+	0.985	0.878	ns
Copaene	-	ns	ns	-	+	0.968	0.913	ns
Linalol	-	ns	+	-	ns	0.956	0.702	ns
1-Terpineol	-	ns	+	-	+	0.953	0.675	ns
Bornyl acetate	-	ns	+	-	+	0.956	0.831	ns
4-Terpineol	-	+	+	-	ns	0.967	0.806	ns
4-Terpineol acetate	ns	ns	ns	ns	ns	<0.800	<0.500	ns
β-Terpineol	ns	+	ns	ns	ns	0.945	0.640	ns
(E)-β-Farnesene	ns	+	ns	-	ns	0.922	0.660	ns
α-Terpineol	+	+	ns	-	+	0.939	0.548	ns
trans-Piperitol	+	+	ns	ns	ns	0.969	0.813	ns
Safrole	+	+	+	-	+	0.976	0.794	ns
Methyl eugenol	+	+	ns	ns	ns	0.976	0.792	ns
Eugenol	+	+	ns	+	+	0.984	0.845	ns
Isoeugenol methyl ether	+	+	ns	ns	ns	0.989	0.906	ns
Elimicin	+	+	ns	+	ns	0.991	0.921	ns
Myristicine	+	+	ns	ns	ns	0.989	0.900	ns

<sup>a</sup> Positive effect

<sup>b</sup> Negative effect

<sup>c</sup> Not significant

The optimization approach used in this study shows the necessity to consider the greatest number of responses (i.e. the greatest number of analytes) when investigating the extraction parameters. Considering only the sum of peaks or number of peaks as done in most optimization by design of experiments cases [44] is not enough to fully understand the extraction process. The second step to optimize the extraction conditions by this approach is to find an optimum which is a compromise between all the optimums for each response, i.e. for each compound studied.

The use of the desirability function allows to find such an optimum. The aim was to maximize the individual desirability functions for each response and to plot an overall desirability function. The contour plot of this function is shown in FIGURE V - 9. The maximum overall desirability ( $D=0.556$ ) is reached at the following extraction conditions: 80 °C for  $T$  and 90 min for  $t_{ext}$ . The overall desirability was not equal to 1 as it is a compromise between the desirabilities of the different compounds. If all 27 responses had the same optimums, the overall desirability would have been equal to 1.

The optimal extraction conditions selected for DES-HS-SDME were: 50 mg sample mass, 1.5  $\mu$ L drop volume, 80 °C extraction temperature and 90 min extraction time.

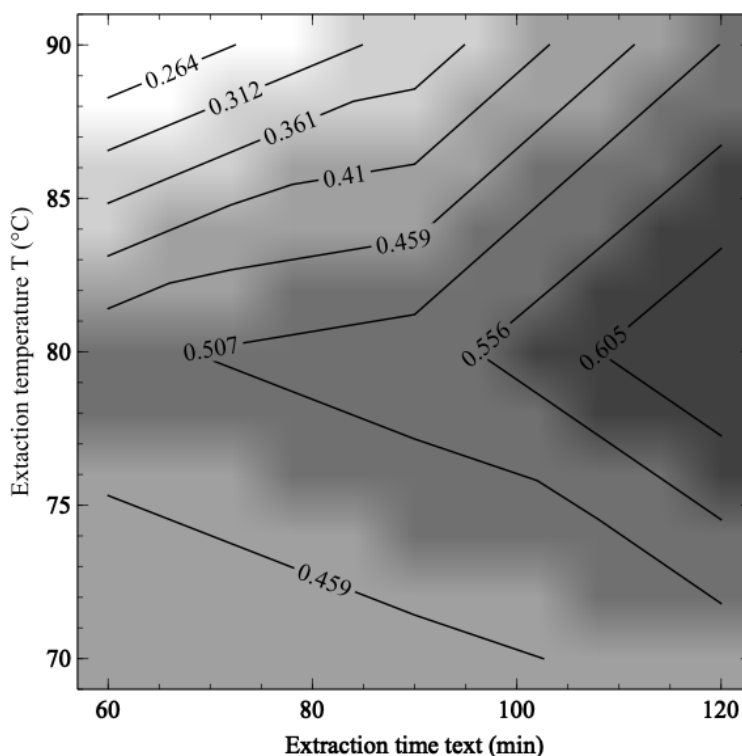


FIGURE V - 9 - Contour plots of the overall desirability for DES-HS-SDME as a function of extraction temperature and extraction time for the extraction of terpenes from nutmeg by DES-HS-SDME using  $N_{444}Br$ /Dodecanol (1:2) as extracting solvent

### V.3.4.3. Calibration

After determination of the optimal extraction parameters, calibration by DES-HS-SDME coupled to GC-MS was conducted for 29 terpenes. TABLE V - 9 summarizes the results obtained for the calibration of each terpene. The values of the correlation coefficient ( $R^2$ ) were above 0.99 for all studied compounds, which indicates good linearity in the concentration ranges studied of the extraction method. To analyze the repeatability of the calibration, the relative standard deviation (RSD) was calculated at 10  $\mu$ g/g for each compound ( $n=3$ ). Most compounds showed acceptable

repeatability (RSD<20 %), only three compounds (limonene, 4-terpineol and  $\alpha$ -farnesene) had higher RSDs.

LODs and LOQs were determined for each compound. LOQs were in the ranges of 0.47 to 86.40  $\mu\text{g/g}$ . This result shows the importance of conducting a full qualitative analysis as semi-quantitative analysis is not reliable enough. Each compound, even compounds from the same chemical family, has its own reactivity with the extraction method but also with the analytical method. The sensibility of the process is related to the compound's response for the analytical method, i.e. low LOQs shows high response thus high sensibility, on the contrary, high LOQs shows low response thus low sensibility. More than half of the studied compounds had LOQs lower than 2  $\mu\text{g/g}$ , showing that DES-HS-SDME is well adapted for the extraction of terpenes.

TABLE V - 9 - Calibration parameters of standards for DES-HS-SDME: retention index (RI), slope, ion extracted from the TIC analysis, relative standard deviation (RSD) calculated on a 10  $\mu\text{g/g}$  standard mixture, concentration ranges, coefficient of determination ( $R^2$ ), and limit of quantification (LOQ)

Compound	RI	Ion	Concentration range ( $\mu\text{g/g}$ )	Slope	$R^2$	RSD	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )
$\alpha$ -Pinene	1049	93	[50;500]	0.24	0.9902	12%	43.11
Camphene	1085	93	[50;500]	0.58	0.9975	3%	26.25
$\beta$ -Pinene	1119	93	[10;500]	0.66	0.9998	1%	9.89
3-Carene	1148	93	[10;500]	0.93	0.9988	16%	6.27
Limonene	1186	67	[10;500]	1.72	0.9946	27%	5.41
Eucalyptol	1200	138	[10;500]	1.56	0.9992	6%	1.69
p-Cymene	1258	119	[3;10]	7.43	0.9982	12%	1.47
			[10;500]	6.33	0.9988		
Menthone	1481	139	[1;10]	6.09	0.9937	6%	0.50
			[10;500]	5.95	0.9972		
Camphor	1529	108	[1;10]	11.60	0.9929	7%	0.74
			[10;500]	7.09	0.9988		
Linalool	1540	93	[1;10]	10.60	0.9979	8%	0.67
			[10;500]	10.50	0.9960		
4-Terpineol	1595	93	[3;10]	24.30	0.9989	22%	0.89
			[10;500]	14.40	0.9989		
Caryophyllene	1603	91	[1;10]	16.30	0.9977	6%	0.52
			[10;500]	14.70	0.9952		
(Z)- $\beta$ -Farnesene	1620	133	[25;500]	37.70	0.9943	19%	24.49
Menthol	1630	81	[1;10]	36.80	0.9906	0%	0.73
			[10;500]	21.80	0.9983		
Pulegone	1638	151	[1;10]	11.80	0.9952	3%	0.60
			[10;500]	11.00	0.9953		

(E)- $\beta$ -Farnesene	1646	133	[25;500]	0.93	0.9983	4%	19.49
Estragole	1657	147	[1;10]	17.40	0.9977	7%	0.75
			[10;500]	16.40	0.9969		
$\alpha$ -Humulene	1667	93	[1;10]	43.30	0.9941	3%	0.86
			[10;500]	25.70	0.9990		
$\alpha$ -Terpineol	1674	93	[3;10]	24.40	0.9982	9%	1.88
			[10;500]	21.10	0.9959		
Borneol	1685	95	[1;10]	66.70	0.9970	20%	0.47
			[10;500]	108.00	0.9862		
Citral	1717	136	[10;500]	0.98	0.9991	23%	8.83
$\alpha$ -Farnesene	1729	133	[100;500]	0.60	0.9995	5%	86.40
$\beta$ -Citronellol	1739	67	[25;500]	27.90	0.9973	10%	16.43
Cuminaldehyde	1793	105	[1;10]	62.80	0.9970	7%	0.56
			[10;500]	59.90	0.9957		
Anethol	1827	147	[3;10]	108.00	0.9988	4%	1.70
			[10;500]	56.90	0.9983		
Geraniol	1842	123	[10;500]	3.76	0.9995	7%	8.71
Thymol	2138	135	[1;10]	23.80	0.9987	9%	1.18
			[10;500]	21.20	0.9993		
Eugenol	2159	163	[10;500]	18.40	0.9945	13%	4.24
Carvacrol	2167	135	[1;10]	22.10	1	12%	1.44
			[10;500]	19.00	0.9992		

#### V.3.4.4. Application to the extraction of terpenes from spices

The optimized DES-HS-SDME method was applied to the extraction of terpenes from six spices, namely from cinnamon, cumin, fennel seeds, clove, thyme and nutmeg. Chromatograms of each extract with their main identified components are shown in FIGURE V - 10.

The main constituents identified in the extracts (regarding the % peak area) are consistent with previous works on spices: cinnamaldehyde in cinnamon [45], cuminaldehyde in cumin [46], eugenol in clove [47], thymol in thyme [48] and myristicine in nutmeg [49]. The main component of fennel extract obtained by DES-HS-DES was estragole, however anethole is known to be the main compound in fennel [50]. Anethole might lack affinity with the DES used for HS-SDME. Furthermore, the boiling point of estragole (216 °C) is lower than the one of anethole (234 °C) which can explain the difference of sensibility of the extraction method between the two compounds ( $LOQ_{Anethole} = 1.70 \mu\text{g/g}$  and  $LOQ_{Estragole} = 0.75 \mu\text{g/g}$ ).

The choice of the extraction method is an important step of analytical chemistry as the content of an extract depends heavily on the extraction method. Those first results show that the DES-HS-SDME method is well adapted for the extraction of terpenes from natural materials.

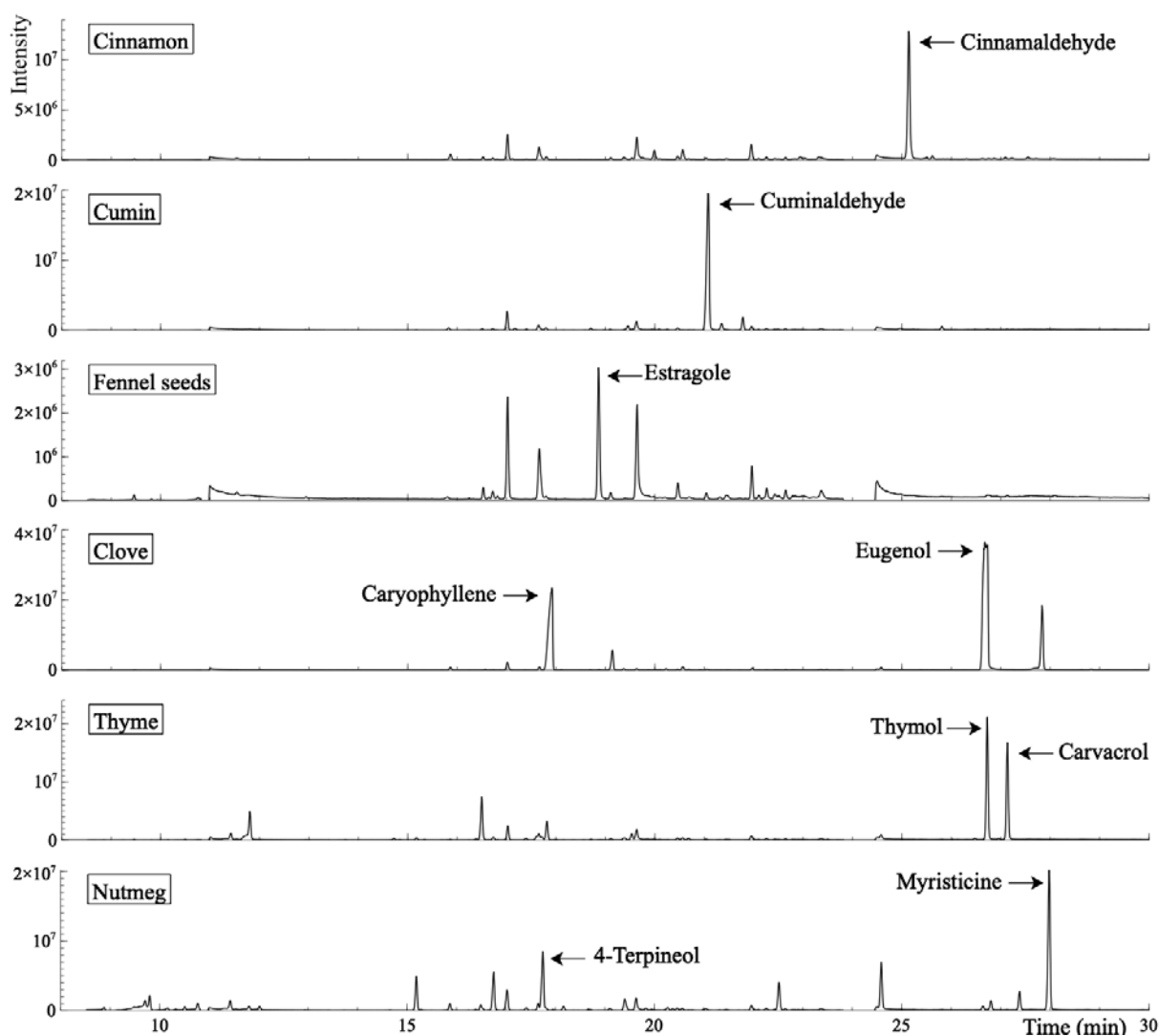


FIGURE V - 10 - Chromatograms of the spices extracts with the identification of their main constituents (scaled is adapted to show only the peaks with the highest intensity)

Full qualitative and quantitative analysis of the different extracts are summarized in TABLE V - 10. As expected, the plant containing the most terpenes was nutmeg. 42 compounds were identified using their mass spectra and retention indexes in nutmeg extract, 32 in thyme, 20 in cumin, 16 in cinnamon and in clove and only 4 in fennel seeds. Not all identified compounds (by their mass spectra and RIs) were quantified, only the ones corresponding to the 29 standards used for the calibration (V.3.4.3). If only a semi-qualitative analysis is conducted (relative to the percentage area of each compound), the concentration might be over or under evaluated. When comparing the relative concentration of two compounds in a same extract, the percentage areas of those compounds might not relate directly to one compound being more abundant than the other. Each compound as its own sensibility towards the

extraction method, low sensibility does not necessarily mean low abundance of the compound. This is well-illustrated in the spices extracts (TABLE V - 10). In the cumin extract, (E)- $\beta$ -farnesene and carvacrol have almost the same abundance regarding the percentage of peak area (approximately 0.5 %) but their quantities calculated by the calibration differ by a factor of almost 20 ( $13,640 \pm 2,062$   $\mu\text{g/g}$  for (E)- $\beta$ -farnesene and  $758 \pm 123$   $\mu\text{g/g}$  for carvacrol). (E)- $\beta$ -farnesene is almost 20 times more abundant in cumin than carvacrol. If a semi-quantitative analysis based on the relative percentage abundance had been done, the conclusion would have been that those two components are found in cumin at approximately the same concentration. Conducting semi-quantitative analysis of different compounds using only one internal standard, relative concentrations of analytes are compared to the one of the internal standard, can also lead to false conclusions.  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene are isomers, their chemical structures are similar. Those two compounds were found in the nutmeg extract at approximately the same concentration ( $212,672 \pm 28,137$   $\mu\text{g/g}$  for  $\alpha$ -pinene and  $231,250 \pm 42,013$   $\mu\text{g/g}$  for  $\beta$ -pinene). However, if looking at only percentage peak area,  $\beta$ -pinene is 6 times more abundant in nutmeg (2.7 %) than  $\alpha$ -pinene (0.43 %). If a compound with a chemical structure close to the ones of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene, such as camphene, for example (FIGURE V - 7), had been used as a standard to evaluate the relative concentration of  $\beta$ -pinene, it would have been over evaluated by a factor of 6. The DES-HS-SDME method allows to produce extract concentrated in a wide range of terpenes and terpenoids. The quantitative analysis used in this study provides a well-understanding of the extraction and analytical method.

TABLE V - 10 - Qualitative and quantitative analysis of the spices extracts obtained by DES-HS-SDME

16 compounds identified in the CINNAMON extract			
Compound	RI	Peak area (%) $\pm$ SD	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ SD
Ylangene	1501	$0.107 \pm 0.002$	-
Copaene	1512	$1.5 \pm 0.2$	-
$\alpha$ -Bergamotene	1571	$0.16 \pm 0.02$	-
Bornyl acetate	1583	$0.25 \pm 0.03$	-
$\beta$ -Elemene	1591	$0.09 \pm 0.01$	-
Caryophyllene	1603	$0.8 \pm 0.1$	$1170 \pm 190$
$\alpha$ -Humulene	1667	$0.60 \pm 0.04$	$203 \pm 28$
$\alpha$ -Terpineol	1674	$0.9 \pm 0.1$	$760 \pm 95$
Borneol	1685	$0.47 \pm 0.02$	$730 \pm 117$
$\gamma$ -Muurolene	1716	$3.0 \pm 0.6$	-
$\delta$ -Cadinene	1757	$3.0 \pm 0.4$	-
Hydrocinnamaldehyde	1777	$0.034 \pm 0.003$	-
Cuminaldehyde	1793	$0.13 \pm 0.02$	$45 \pm 6$
Cinnamaldehyde	2030	$46 \pm 1$	-
Cubenol	2074	$0.80 \pm 0.09$	-

$\delta$ -Cadinol	2168	0.31 $\pm$ 0.02	-
-------------------	------	-----------------	---

20 compounds identified in the CUMIN extract			
Compound	RI	Peak area (%) $\pm$ SD	Concentration ( $\mu$ g/g) $\pm$ SD
$\beta$ -Pinene	1119	0.039 $\pm$ 0.005	524 $\pm$ 112
p-Cymene	1258	<0.01	1631 $\pm$ 110
Copaene	1512	0.58 $\pm$ 0.07	-
Linalool	1540	<0.01	325 $\pm$ 86
trans- $\alpha$ -Bergamotene	1582	0.23 $\pm$ 0.01	-
4-Terpineol	1595	<0.01	323 $\pm$ 38
Caryophyllene	1603	0.72 $\pm$ 0.02	1221 $\pm$ 241
$\beta$ -Terpineol	1621	0.041 $\pm$ 0.003	-
(E)- $\beta$ -Farnesene	1646	0.54 $\pm$ 0.02	13640 $\pm$ 2062
Estragole	1657	0.039 $\pm$ 0.005	68 $\pm$ 13
$\alpha$ -Humulene	1667	0.35 $\pm$ 0.03	116 $\pm$ 15
$\alpha$ -Terpineol	1674	0.15 $\pm$ 0.02	295 $\pm$ 46
Acoradiene	1679	1.35 $\pm$ 0.03	-
Phellandral	1719	0.171 $\pm$ 0.005	-
$\alpha$ -Farnesene	1729	0.13 $\pm$ 0.01	<LOQ
$\delta$ -Cadinene	1757	0.0282 $\pm$ 0.0005	-
$\alpha$ -Curcumene	1772	0.09 $\pm$ 0.01	-
Cuminaldehyde	1793	52 $\pm$ 2	53634 $\pm$ 9482
Carotol	2040	1.52 $\pm$ 0.06	-
Carvacrol	2167	0.5 $\pm$ 0.1	758 $\pm$ 123

4 compounds identified in the FENNEL SEEDS extract			
Compound	RI	Peak area (%) $\pm$ SD	Concentration ( $\mu$ g/g) $\pm$ SD
Limonene	1186	<0.01	1424 $\pm$ 221
Estragole	1657	7.7 $\pm$ 0.6	13473 $\pm$ 106
$\delta$ -Cadinene	1757	0.044 $\pm$ 0.002	-
Anethole	1827	0.5 $\pm$ 0.1	153 $\pm$ 5

16 compounds identified in the CLOVE extract			
Compound	RI	Peak area (%) $\pm$ SD	Concentration ( $\mu$ g/g) $\pm$ SD
Ylangene	1501	0.015 $\pm$ 0.003	-
Copaene	1512	0.44 $\pm$ 0.03	-
Linalool	1540	<0.01	161 $\pm$ 27
Caryophyllene	1603	26.1 $\pm$ 0.8	289518 $\pm$ 7437
(Z)- $\beta$ -Farnesene	1620	0.053 $\pm$ 0.003	7270 $\pm$ 427

$\alpha$ -Humulene	1667	3.2 $\pm$ 0.1	38483 $\pm$ 1588
$\alpha$ -Terpineol	1674	0.23 $\pm$ 0.01	777 $\pm$ 34
Germacrene D	1690	0.038 $\pm$ 0.002	-
$\alpha$ -Amorphene	1708	0.101 $\pm$ 0.006	-
$\gamma$ -Muurolene	1716	0.070 $\pm$ 0.004	-
$\delta$ -Cadinene	1757	0.60 $\pm$ 0.01	-
Cuminaldehyde	1793	0.20 $\pm$ 0.01	699 $\pm$ 24
Anethole	1827	0.016 $\pm$ 0.003	161 $\pm$ 5
Caryophyllene oxide	2017	0.350 $\pm$ 0.008	-
Eugenol	2159	53.1 $\pm$ 0.8	1226059 $\pm$ 36216
Eugenyl acetate	2216	11.5 $\pm$ 0.3	-

32 compounds identified in the THYM extract			
Compound	RI	Peak area (%) $\pm$ SD	Concentration ( $\mu$ g/g) $\pm$ SD
$\alpha$ -Pinene	1049	<0.01	11189 $\pm$ 1135
Camphene	1085	<0.01	3975 $\pm$ 731
$\beta$ -Pinene	1119	<0.01	1910 $\pm$ 430
3-Carene	1148	0.05 $\pm$ 0.01	4803 $\pm$ 985
4-Carene	1176	0.10 $\pm$ 0.02	-
Limonene	1186	0.037 $\pm$ 0.007	3249 $\pm$ 763
Eucalyptol	1200	0.21 $\pm$ 0.01	4477 $\pm$ 947
$\gamma$ -Terpinene	1240	0.74 $\pm$ 0.02	-
p-Cymene	1258	7 $\pm$ 1	222629 $\pm$ 21000
Linalool oxide	1445	0.10 $\pm$ 0.01	-
trans-Sabinene hydrate	1469	0.49 $\pm$ 0.06	-
Ylangene	1501	0.034 $\pm$ 0.004	-
Copaene	1512	0.1120 $\pm$ 0.0005	-
Camphor	1529	0.30 $\pm$ 0.03	-
Linalool	1540	10.5 $\pm$ 0.7	84394 $\pm$ 14182
Linalyl acetate	1550	0.70 $\pm$ 0.07	-
Thymol methylether	1594	0.47 $\pm$ 0.05	-
4-Terpineol	1595	0.80 $\pm$ 0.01	3158 $\pm$ 287
Caryophyllene	1603	4.1 $\pm$ 0.5	13892 $\pm$ 1931
(E)- $\beta$ -Farnesene	1646	0.15 $\pm$ 0.02	4442 $\pm$ 160
$\alpha$ -Humulene	1667	0.345 $\pm$ 0.007	362 $\pm$ 34
$\alpha$ -Terpineol	1674	0.72 $\pm$ 0.04	1849 $\pm$ 275
Borneol	1685	1.6 $\pm$ 0.1	6059 $\pm$ 523
cis-Piperitol	1735	0.055 $\pm$ 0.006	-
$\beta$ -Citronellol	1739	0.62 $\pm$ 0.08	1519 $\pm$ 50
$\delta$ -Cadinene	1757	0.51 $\pm$ 0.07	-
Cuminaldehyde	1793	0.26 $\pm$ 0.03	72 $\pm$ 11
Geraniol	1842	1.4 $\pm$ 0.1	715 $\pm$ 40



Caryophyllene oxide	2017	1.12 ± 0.04	-
Cuminic alcohol	2076	0.05 ± 0.01	-
Thymol	2138	28 ± 2	293997 ± 43804
Carvacrol	2167	24 ± 1	251452 ± 27400
<b>42 compounds identified in the NUTMEG extract</b>			
Compound	RI	Peak area (%) ± SD	Concentration (µg/g) ± SD
α-Pinene	1049	0.43 ± 0.03	212672 ± 28137
β-Pinene	1119	2.7 ± 0.3	231250 ± 42013
Sabinene	1128	2.5 ± 0.2	-
3-Carene	1148	0.43 ± 0.02	71585 ± 9265
α-Phellandrene	1164	0.14 ± 0.03	-
4-Carene	1176	0.45 ± 0.04	-
Limonene	1186	1.0 ± 0.1	82718 ± 11980
Eucalyptol	1200	0.037 ± 0.001	2023 ± 271
γ-Terpinene	1240	1.5 ± 0.1	-
p-Cymene	1258	0.72 ± 0.07	22763 ± 1881
Terpinolene	1278	0.69 ± 0.08	-
trans-Sabinene hydrate	1469	5.6 ± 0.4	-
Copaene	1512	1.11 ± 0.03	-
Linalool	1540	1.08 ± 0.01	9450 ± 976
1-Terpineol	1544	6.6 ± 0.3	-
Fenchol	1576	0.028 ± 0.003	-
Bornyl acetate	1583	0.46 ± 0.01	-
β-Elemene	1591	0.034 ± 0.002	-
4-Terpineol	1595	11.6 ± 0.2	82752 ± 7232
Caryophyllene	1603	<0.01	262 ± 23
4-Terpineol acetate	1610	0.103 ± 0.001	-
β-Terpineol	1621	0.70 ± 0.01	-
(E)-β-Farnesene	1646	0.093 ± 0.005	<LOQ
Estragole	1657	<0.01	62 ± 3
α-Humulene	1667	0.37 ± 0.02	290 ± 22
α-Terpineol	1674	2.49 ± 0.05	11511 ± 911
Borneol	1685	0.030 ± 0.003	1100 ± 123
Germacrene D	1690	0.51 ± 0.01	-
trans-Piperitol	1728	0.64 ± 0.02	-
α-Farnesene	1729	0.26 ± 0.03	<LOQ
Geranyl acetate	1735	0.29 ± 0.01	-
β-Citronellol	1739	0.46 ± 0.04	1375 ± 86
δ-Cadinene	1757	0.38 ± 0.01	-
Cuminaldehyde	1793	0.22 ± 0.04	67 ± 12
Geraniol	1842	<0.01	706 ± 75
Safrole	1880	5.3 ± 0.2	-

Methyl eugenol	2015	$7.79 \pm 0.07$	-
Isoeugenol methylether	2143	$1.61 \pm 0.03$	-
Eugenol	2159	$0.71 \pm 0.04$	$5808 \pm 406$
Carvacrol	2167	$0.028 \pm 0.005$	$192 \pm 27$
Elimicin	2184	$3.09 \pm 0.07$	-
Myristicine	2236	$26.5 \pm 0.3$	-

### V.3.5. Conclusion

Optimal extraction conditions of DES-HS-SDME were easily determined by the use of chemometric. Full quantitative analysis of the extracts allowed a better understanding of the extraction technique and of the extracts. This study showed that DESs can be a possible alternative to organic solvent in HS-SDME for the extraction of volatiles compounds in natural samples. DES-HS-SDME is simple, cheap, rapid, made eco-friendly by the use of DESs and efficient for the extraction of terpenes from spices. DESs have an important potential in green extraction and analytical chemistry.

### V.3.6. Acknowledgements

This work has been financially supported by “Association Nationale Recherche Technologie” with the CIFRE Contract n°2016/0447.

## V.4. COMPARAISON DE TOUTES LES METHODES D'EXTRACTION DEVELOPPEES POUR L'EXTRACTION DES TERPENES VOLATILS

Une fois optimisées, toutes les méthodes d'extraction développées précédemment pour l'extraction des terpènes volatils ont été comparées. Il y a deux objectifs majeurs à cette étude. Le premier est d'un intérêt purement analytique : trouver une méthode d'extraction permettant d'extraire le plus grand nombre de composés terpéniques et d'obtenir un extrait le plus concentré possible en ces mêmes composés. Ainsi la méthode d'extraction la mieux adaptée pour l'extraction de terpènes volatils pourra être mise en place dans de nombreux domaines. Dans l'industrie alimentaire par exemple, pour l'analyse d'arômes caractéristiques dans des boissons. En contrôle contrefaçon, en effet suivant sa provenance une épice n'aura pas le même profil de composés volatils. Mais aussi dans le domaine pharmacologique pour l'analyse de résidus de solvant dans les principes actifs. Le deuxième objectif est de trouver une méthode d'extraction permettant de produire des extraits riches en composés terpéniques compatibles avec des tests biologiques, notamment en utilisant des solvants non toxiques, afin de pouvoir évaluer leurs propriétés anti-inflammatoires. Comme vu dans le chapitre précédant (chapitre IV), les extraits obtenus devront être suffisamment concentrés en molécules

bioactives afin de pouvoir mesurer une activité anti-inflammatoire de l'extrait. Pour répondre à ces deux objectifs, la composition des extraits obtenus par les différentes extractions utilisées a été comparé de manière qualitative et quantitative.

- Analyse qualitative

La FIGURE V - 11 reprend le nombre de composés identifiés dans les extraits d'épices obtenus par six méthodes d'extractions différentes : l'hydrodistillation (HD), l'extraction par liquide pressurisé (PLE), l'extraction dans l'espace de tête (HS), la microextraction sur phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME), l'extraction par sorption dans l'espace de tête (HSSE) ainsi que la microextraction liquide sur une goutte dans l'espace de tête aux solvants eutectiques profonds (DES-HS-SDME). Les comparaisons sont effectuées sur des analyses qualitative d'extraits obtenus après optimisation des méthodes d'extraction.

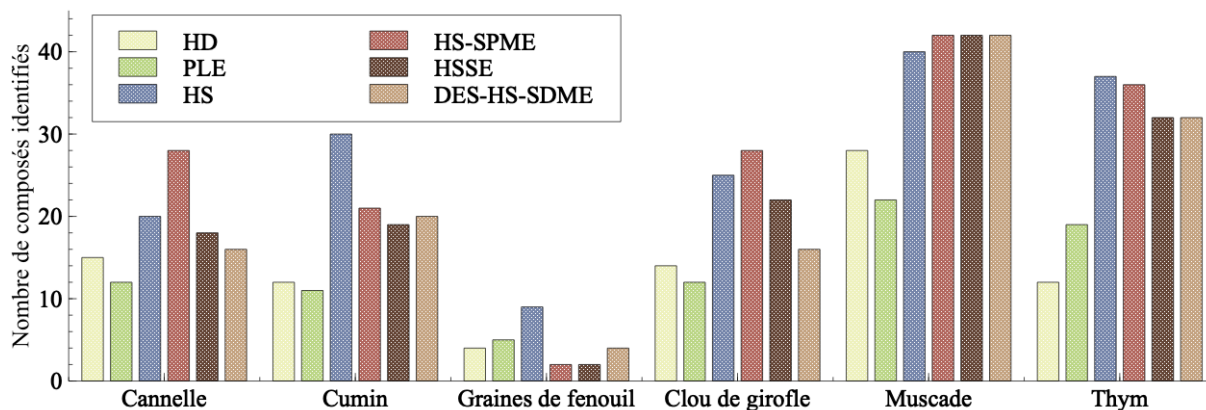


FIGURE V - 11 - Comparaison de l'analyse qualitative des extraits d'épices obtenus par six méthodes d'extraction différentes

Parmi toutes les méthodes testées, l'extraction par HS et par HS-SPME sont les deux méthodes permettant d'obtenir le plus grand nombre de terpènes volatils pour les différentes matrices étudiées. Cependant, ce sont des méthodes d'analyses, elles répondent donc bien à la problématique du premier objectif mais ne permet pas de résoudre le deuxième. Ainsi, pour réaliser des extraits riches en terpènes volatils compatibles avec des tests biologiques, les extractions par HSSE et par DES-HS-SDME semblent le plus adaptées car elles permettent d'extraire un plus grand nombre de composés volatils comparés à la PLE. Cependant, d'après les résultats du chapitre IV, l'extraction par HSSE ne permet pas d'obtenir des extraits suffisamment concentrés pour observer une activité anti-inflammatoire. C'est pourquoi il est nécessaire de comparer ces méthodes d'extraction d'un point de vue quantitatif.

- Analyse quantitative

La FIGURE V - 12 montre une comparaison de l'analyse quantitative des extraits de muscade obtenus par les différentes méthodes d'extraction. La muscade a été utilisée pour effectuer l'optimisation des différentes méthodes d'extraction, la comparaison de la concentration des extraits en molécules terpéniques a donc été réalisée sur l'extrait de muscade.

L'hydrodistillation est la méthode permettant d'obtenir un extrait le plus concentré en molécules volatiles. En effet, cette méthode permet d'obtenir des huiles essentielles riches en composés volatils concentrés dans des faibles volumes.

Pour répondre au premier objectif, il n'y a pas une seule et même méthode qui permet d'obtenir un extrait contenant le plus grand nombre de composés terpéniques et étant le plus concentré possible en ces mêmes composés. Il est donc intéressant de réaliser ces comparaisons de méthodes d'extraction afin de sélectionner la plus adaptée selon le besoin. L'hydrodistillation permet d'obtenir un extrait très concentré en un faible nombre de molécule terpénique. Cependant, en ce qui concerne le deuxième objectif, l'hydrodistillation n'est pas adaptée. Dans notre étude, seulement quelques gouttes d'huile essentielle ont été distillées et ont dû être récupérés par une extraction liquide-liquide en utilisant l'isooctane. L'extrait se trouve alors dans un solvant toxique non compatible avec la réalisation de tests biologiques cellulaire. Afin de s'abstenir de l'utilisation d'un solvant organique hydrophobe pour récupérer l'huile essentielle, il faudrait réaliser l'hydrodistillation sur un plus grand volume de plante au départ. Par manque de matière première, cette solution n'a pas été étudiée dans ce projet. La deuxième méthode permettant d'obtenir un extrait très concentré en composés terpéniques est la DES-HS-SDME. En effet, cette méthode permet d'obtenir des extraits plus concentrés que ceux obtenus par PLE et HSSE. De plus, la DES-HS-SDME extrait aussi un grand nombre de terpènes volatils, autant que la HSSE et plus que la PLE et hydrodistillation (FIGURE V - 11). La DES-HS-SDME est alors très prometteuse pour le deuxième objectif, c'est-à-dire produire des extraits riches en composés terpéniques et compatibles avec les tests biologiques grâce à la non toxicité des DESs.

Mise à part l'efficacité de la méthode d'extraction, d'autres paramètres sont à prendre en compte lors d'un choix d'une technique d'extraction : la rapidité de la méthode, le coût, la consommation en matière première mais aussi l'écoresponsabilité qui devient de plus en plus un critère de choix. Ces critères de choix ont été évalués pour les méthodes d'extractions développées dans cette étude pour l'extraction des composés terpéniques dans les épices (TABLE V - 11). Ainsi, à l'aide du TABLE V - 11, il est facile de déterminer quelle méthode est adaptée pour quel objectif visé. L'extraction par HS apparaît être le meilleur choix pour répondre au premier objectif tandis que l'extraction par DES-HS-SDME apparaît être le meilleur choix pour répondre au deuxième objectif de cette étude.

TABLE V - 11 - Avantages et inconvénients des différentes méthodes d'extractions en fonctions des objectifs de l'étude

Méthode d'extraction	OBJECTIF I				OBJECTIF II	
	Consommation matière première	Rapidité	Coût	Écoresponsable	Concentration en terpènes	Compatibilité avec tests biologiques
<b>HD</b>	+++	-	-	-	+++	-
<b>PLE</b>	+	+++	+	-	-	++
<b>HS</b>	-	++	-	+++	+++	-
<b>HS-SPME</b>	-	+	+	+++	+++	-
<b>HSSE</b>	-	+	+	++	+	++
<b>DES-HS-SDME</b>	-	+	-	+++	++	+++
Critère souhaité	-	+++	-	+++	+++	+++

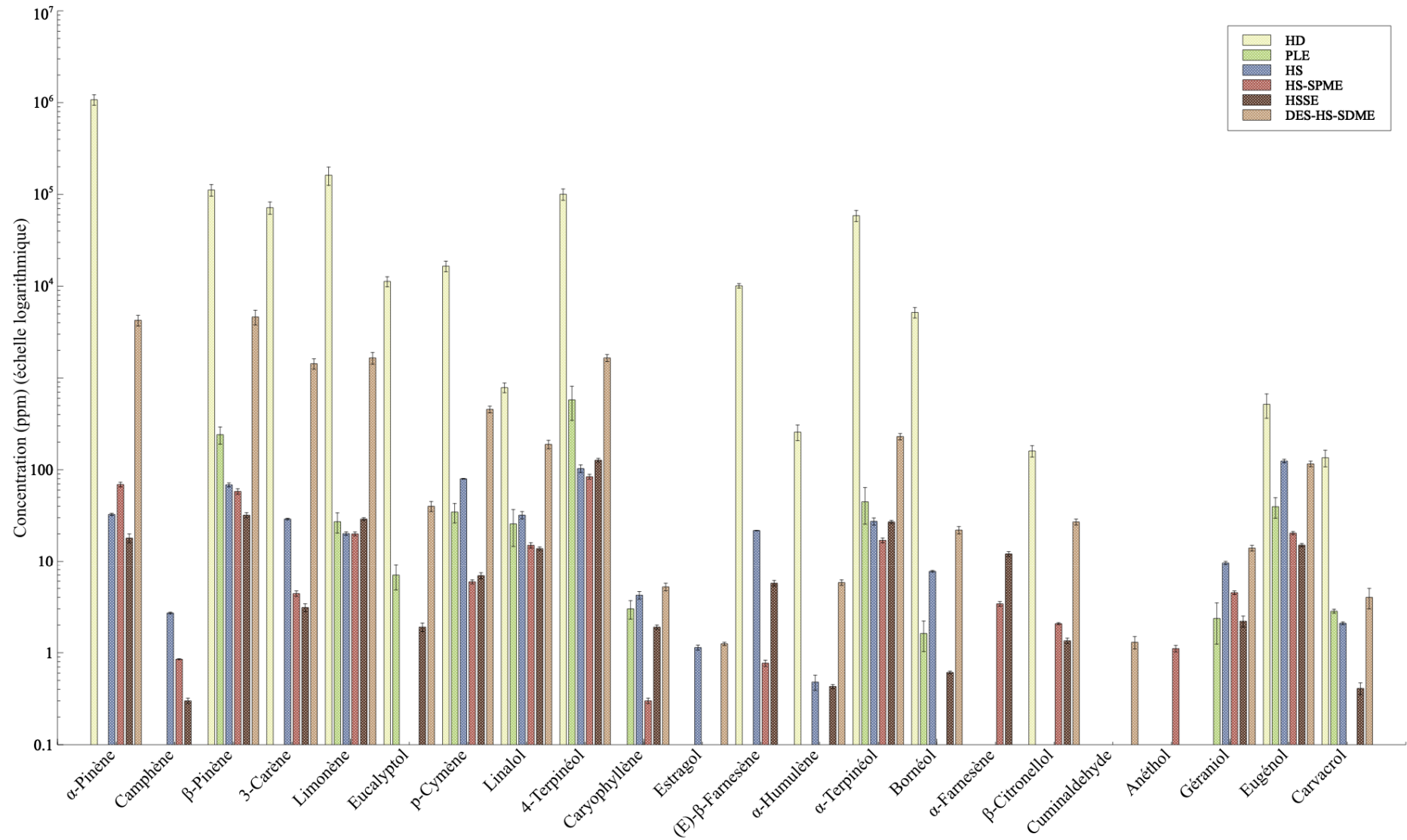


FIGURE V - 12 - Comparaison de l'analyse quantitative d'extraits de muscade obtenus par six différentes méthodes d'extraction

## V.5. EXTRACTION DES COMPOSES TERPENIQUES DANS LES PLANTES PAR DES-HS-SDME

D'après les résultats précédents, la DES-HS-SDME permet d'obtenir des extraits plus concentrés en terpènes volatils que les méthodes d'extraction par PLE ou par HSSE. Ainsi, des extraits des 4 plantes d'intérêt ont été réalisés par DES-HS-SDME. (TABLE V - 12 ; TABLE V - 13 ; TABLE V - 14 ; TABLE V - 15).

TABLE V - 12 - Composition de l'extrait de *Calamintha nepeta* obtenu par DES-HS-SDME

Composé	RI	Aire (%)	Concentration (µg/g)
β-Pinène	1119	0,03	120 ± 22
3-Carène	1148	0,02	17 ± 2
Limonène	1186	0,13	61 ± 8
trans-Sabinène hydrate	1469	0,76	-
Menthone	1481	0,28	269 ± 10
Isomenthone	1468	9,74	-
β-Bourbonène	1533	0,09	-
Acétate de menthyle	1564	0,19	131 ± 15
Isopulégone	1567	0,51	-
Caryophyllène	1603	5,62	2774 ± 286
Menthol	1630	7,25	3753 ± 617
Pulégone	1638	49,32	38201 ± 3931
α-Humulène	1667	0,57	328 ± 24
α-Terpinéol	1674	0,16	59 ± 11
Bornéol	1685	0,14	41 ± 6
Germacrène D	1690	2,50	-
δ-Cadinène	1757	0,11	-
Cuparène	1804	0,05	-
Oxide de caryophyllène	2017	1,21	-
Spathylénol	2128		-

TABLE V - 13 - Composition de l'extrait d'*Asarum europaeum* obtenu par DES-HS-SDME

Composé	RI	Aire (%)	Concentration (µg/g)
β-Bourbonène	1533	0,64	-
Linalol	1540	<0,01	66 ± 13
Acétate de bornyle	1583	0,99	-
β-Elemène	1591	0,37	-
Caryophyllène	1603	0,25	35 ± 2
Aristolène	1607	0,66	-
Menthol	1630	<0,01	9 ± 1

(E)- $\beta$ -Farnesène	1646	5,88	5762 $\pm$ 882
$\alpha$ -Humulène	1667	3,71	415 $\pm$ 45
Germacrène D	1690	14,69	-
$\beta$ -Citronellol	1739	0,64	62 $\pm$ 9
Géraniol	1842	6,12	915 $\pm$ 73
Spathuléol	2128	1,47	-
Méthylisoeugénol	2143	2,63	-

TABLE V - 14 - Composition de l'extrait de *Mentha piperita* obtenu par DES-HS-SDME

Composé	RI	Aire (%)	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ )
Camphène	1085	0,01	135 $\pm$ 16
$\beta$ -Pinène	1119	0,01	90 $\pm$ 15
3-Carène	1148	0,01	47 $\pm$ 7
Limonène	1186	0,09	116 $\pm$ 13
trans-Sabinène hydrate	1469	3,00	-
Menthone	1481	8,14	15047 $\pm$ 1450
Menthofurane	1469	0,15	-
Isomenthone	1468	1,44	-
$\beta$ -Bourbonène	1533	0,17	-
Linalol	1540	0,11	245 $\pm$ 15
Acétate de menthyle	1564	6,69	7239 $\pm$ 652
Isopulégol	1573	0,13	-
4-Terpinéol	1595	0,52	1704 $\pm$ 208
Caryophyllène	1603	2,27	2344 $\pm$ 269
Menthol	1630	57,44	95102 $\pm$ 8479
(E)- $\beta$ -Farnesène	1646	0,38	4456 $\pm$ 581
$\alpha$ -Humulène	1667	0,11	143 $\pm$ 18
$\alpha$ -Terpinéol	1674	0,18	189 $\pm$ 16
Bornéol	1685	0,03	27 $\pm$ 3
Germacrène D	1690	4,13	-
Pipéritone	1725	0,82	-
$\beta$ -Citronellol	1739	0,35	361 $\pm$ 40
$\delta$ -Cadinène	1757	0,11	-
Myrtenol	1798	0,02	-
Viridiflorol	2107	0,75	-
Spathuléol	2128	0,13	-
Thymol	2138	0,03	46 $\pm$ 4
Carvacrol	2167	<0,01	8,6 $\pm$ 0,3



TABLE V - 15 - Composition de l'extrait de *Thymus vulgaris* obtenu par DES-HS-SDME

Composé	RI	Aire (%)	Concentration (µg/g)
3-Carène	1148	0,04	24 ± 1
Limonène	1186	<0,01	13 ± 1
p-Cymène	1258	2,76	789 ± 160
trans-Sabinène hydrate	1469	1,35	-
Camphre	1529	0,60	222 ± 19
Linalol	1540	1,88	828 ± 96
Éther de thymol méthylique	1594	1,46	-
4-Terpinéol	1595	4,16	1525 ± 248
Caryophyllène	1603	3,53	806 ± 72
α-Humulène	1667	0,27	52 ± 7
α-Terpinéol	1674	0,63	100 ± 10
Bornéol	1685	4,25	814 ± 66
β-Citronellol	1739	0,61	30 ± 5
Géraniol	1842	2,51	797 ± 96
Oxide de caryophyllène	2017	1,92	-
Thymol	2138	54,58	7779 ± 923
Carvacrol	2167	2,23	393 ± 31

Comme attendu, la DES-HS-SDME permet d'extraire un plus grand nombre de terpènes volatils à partir des plantes étudiées comparé à la PLE et la HSSE (FIGURE V - 13).

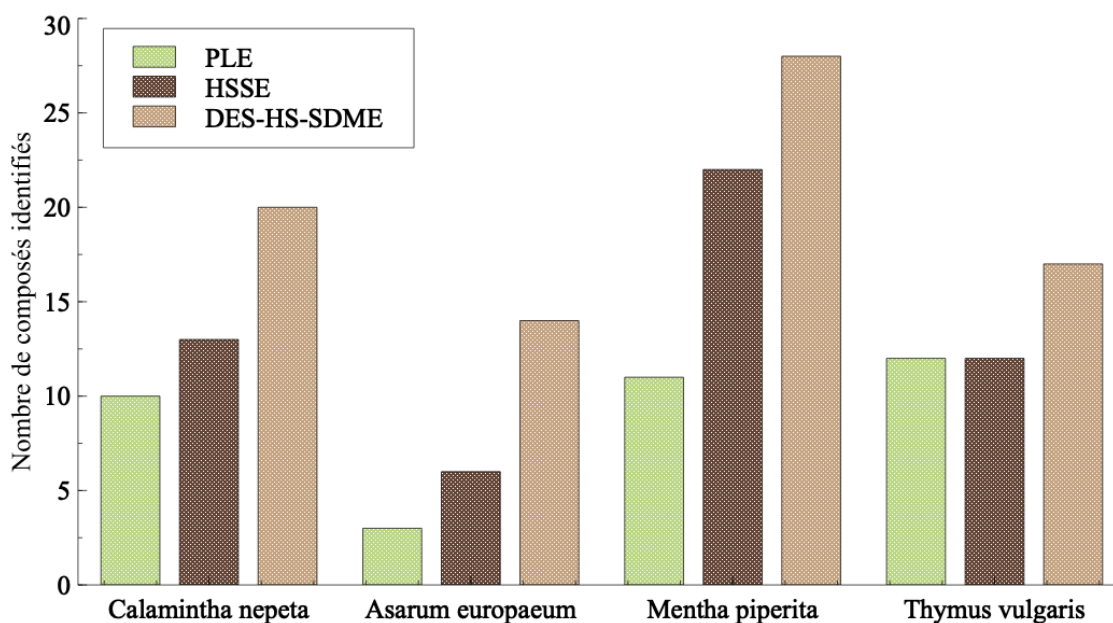


FIGURE V - 13 - Comparaison de l'analyse qualitative des extraits de plantes obtenus par trois méthodes d'extraction différentes : la PLE, la HSSE et la DES-HS-SDME

De plus les extraits DES-HS-SDME sont plus concentrés que ceux étudiés dans le chapitre précédent et notamment en molécules bioactives. En effet, l'extrait de *Calamintha nepeta* obtenu par DES-HS-SDME contient du pulégone à une concentration de  $38201 \pm 3931$  ppm, soit environ 20 fois plus que dans l'extrait de la même plante obtenu par HSSE ( $1729 \pm 88$  ppm) et 70 fois que celui obtenu par PLE (485,43 ppm). De même, l'extrait DES-HS-SDME de *Mentha piperita* contient du menthol à une concentration de  $95102 \pm 8479$  ppm, comparé à  $2496 \pm 38$  ppm pour l'extrait HSSE de la même plante et à 507,49 ppm pour l'extrait PLE. Cette augmentation de concentration peut être due au faible volume de solvant utilisé pour l'extraction DES-HS-SDME, à savoir 2  $\mu$ L de goutte comparé à environ 20 mL pour l'extraction PLE et 100  $\mu$ L pour l'HSSE. L'extraction par DES-HS-SDME permet ainsi de concentrer les molécules bioactives dans un faible volume de solvant non toxique. Deux microlitres d'extrait sont suffisants pour réaliser les tests biologiques. Une des perspectives de ce travail serait alors de mesurer les activités anti-inflammatoires des extraits de plantes obtenus par DES-HS-SDME. En effet, pour l'extrait de *Calamintha nepeta*, la concentration finale au contact des cellules de pulégone serait d'environ 382 ppm soit 2,5 mM (2  $\mu$ L de l'extrait déposé dans 180  $\mu$ L de milieu cellulaire). Cette concentration est plus élevée que l' $EC_{50}$  mesurée pour le pulégone (environ 1,5 mM). L'extrait *Calamintha nepeta* serait donc suffisamment concentré pour observer une activité anti-inflammatoire sous réserve qu'il n'y ait pas d'interactions antagonistes avec les autres molécules présentes dans l'extrait. De même, pour l'extrait de *Mentha piperita*, la concentration finale menthol au contact des cellules de serait d'environ 951 ppm soit 6,2 mM, l'extrait testé pur serait alors toxique pour les cellules dû à une concentration trop importante de menthol ( $EC_{50}(\text{toxicité}) = 3,6$  mM). Cependant, une fois dilué par un facteur de dilution adéquate, l'extrait de *Mentha piperita* pourrait montrer une activité anti-inflammatoire grâce à une concentration suffisante en menthol sous réserve encore une fois d'absence d'interactions antagonistes avec les autres composés présents dans l'extrait. Ainsi l'extraction par DES-HS-SDME semble être une bonne alternative aux autres méthodes d'extractions étudiées ici pour obtenir des extraits de plantes très riches en terpènes volatils.

## V.6. RÉFÉRENCES

- [1] A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah, Novel solvent properties of choline chloride urea mixtures, *Chem. Commun.* (2003) 70–71.
- [2] E.A. Crespo, L.P. Silva, A. R. Martins, M. Bu, O. Ferreira, G. Sadowski, C. Held, P. Pinho, A.P. Coutinho, The role of polyfunctionality in the formation of [Ch]Cl-carboxylic acid-based deep eutectic solvents, *Ind. Eng. Chem. Res.* 57 (2018) 11195–11209.
- [3] L.P. Silva, L. Fernandez, H.F. Conceic, A. R. Martins, A. Sosa, J. Ortega, P. Pinho, A.P. Coutinho, Design and characterization of sugar-based deep eutectic solvents using conductor-like screening model for real solvents, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6 (2018) 10724–10734.
- [4] A.P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 9142–9147.
- [5] Z. Maugeri, P. Domínguez De María, Novel choline-chloride-based deep-eutectic-solvents with renewable hydrogen bond donors: Levulinic acid and sugar-based polyols, *RSC Adv.* 2 (2012) 421–425.
- [6] W. Tang, Y. Dai, K.H. Row, Evaluation of fatty acid/alcohol-based hydrophobic deep eutectic solvents as media for extracting antibiotics from environmental water, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 7325–7336.
- [7] F. Cardellini, M. Tiecco, R. Germani, G. Cardinali, L. Corte, L. Roscini, N. Spreti, Novel zwitterionic deep eutectic solvents from trimethylglycine and carboxylic acids: characterization of their properties and their toxicity, *RSC Adv.* 4 (2014) 55990–56002.
- [8] Y. Dai, J. Van Spronsen, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology, *Anal. Chim. Acta.* 766 (2013) 61–68.
- [9] J. Romero, P. López, C. Rubio, R. Battle, C. Nerín, Strategies for single-drop microextraction optimisation and validation, *J. Chromatogr. A.* 1166 (2007) 24–29.
- [10] D.J. Newman, G.M. Cragg, D.G.I. Kingston, Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures, in: *Pract. Med. Chem.*, Second Ed, Elsevier Inc., 2003: pp. 91–109.
- [11] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, *J. Nat. Prod.* 70 (2007) 461–477.
- [12] D. Tholl, Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism, *Curr. Opin. Plant Biol.* 9 (2006) 1–8.
- [13] R. Croteau, T.M. Kutchan, N.L. Lewis, Natural products (secondary metabolites), in: *Biochem. Mol. Biol. Plants*, 2000: pp. 1250–1318.
- [14] K. Vavitsas, M. Fabris, C.E. Vickers, Terpenoid metabolic engineering in photosynthetic microorganisms, *Genes (Basel)*. 9 (2018) 1–19.
- [15] R.N. De Almeida, M. De Fátima Agra, F.N.S. Maior, D.P. De Sousa, Essential oils and their constituents: Anticonvulsant activity, *Molecules*. 16 (2011) 2726–2742.
- [16] H.-J. Bart, Extraction of natural products from plants – An introduction, in: *Ind. Scale Nat. Prod. Extr.*, 2011: pp. 1–25.
- [17] A. Koziół, A. Stryjewska, T. Librowski, K. Sałat, M. Gawel, A. Moniczewski, S. Lochyński, An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes, *Mini-Reviews Med. Chem.* 14 (2014) 1156–1168.
- [18] D. V Fonsêca, P.R.R. Salgado, H. de C. Aragão Neto, A.M.F.O. Golzio, M.R.D. Caldas Filho, C.G.F. Melo, F.C. Leite, M.R. Piuvezam, L.C. de M. Pordeus, J.M. Barbosa Filho, R.N. Almeida, Ortho-eugenol exhibits anti-nociceptive and anti-inflammatory activities, *Int. Immunopharmacol.* 38 (2016) 402–408.
- [19] D. Trombetta, F. Castelli, M.G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti, G. Bisignano, Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 2474–2478.
- [20] N.F. Salakhutdinov, K.P. Volcho, O.I. Yarovaya, Monoterpenes as a renewable source of biologically active compounds, *Pure Appl. Chem.* 89 (2017) 1105–1117.
- [21] S. Yano, Y. Suzuki, M. Yuzurihara, Y. Kase, S. Takeda, S. Watanabe, M. Aburada, K.-I. Miyamoto, Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 553 (2006) 99–103.
- [22] C. Yang, J. Wang, D. Li, Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review, *Anal. Chim. Acta.* 799 (2013) 8–22.
- [23] A.L. Theis, A.J. Waldack, S.M. Hansen, M.A. Jeannot, Headspace solvent microextraction, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5651–5654.
- [24] W. Wardencki, J. Curyło, J. Namieśnik, Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70 (2007) 275–288.
- [25] K.D. Clark, M.N. Emaus, M. Varona, A.N. Bowers, J.L. Anderson, Ionic liquids: solvents and sorbents in sample preparation, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 1–416.
- [26] M.H. Zainal-Abidin, M. Hayyan, A. Hayyan, N.S. Jayakumar, New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review, *Anal. Chim. Acta.* 979 (2017) 1–23.
- [27] Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, J. François, Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 7108–7146.
- [28] S.M. Yousefi, F. Shemirani, S.A. Ghorbanian, Enhanced headspace single drop microextraction method using deep eutectic solvent based magnetic bucky gels: Application to the determination of volatile aromatic hydrocarbons in water and urine samples, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 966–974.
- [29] K.M. Jeong, Y. Jin, D.E. Yoo, S.Y. Han, E.M. Kim, J. Lee, One-step sample preparation for convenient examination

- of volatile monoterpenes and phenolic compounds in peppermint leaves using deep eutectic solvents, *Food Chem.* 251 (2018) 69–76.
- [30] E. Su, M. Yang, J. Cao, C. Lu, J. Wang, F. Cao, Deep eutectic solvents as green media for efficient extraction of terpene trilactones from Ginkgo biloba leaves, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 40 (2017) 1–7.
- [31] J. Cao, L. Chen, M. Li, F. Cao, L. Zhao, E. Su, Two-phase systems developed with hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents for simultaneously extracting various bioactive compounds with different polarities, *Green Chem.* 20 (2018) 1879–1886.
- [32] B. Tang, W. Bi, H. Zhang, K. Ho Row, Deep Eutectic Solvent-Based HS-SME coupled with GC for the analysis of bioactive terpenoids in Chamaecyparis obtusa leaves, *Chromatographia.* 77 (2014) 373–377.
- [33] L.V. Candiotti, M.M. De Zan, M.S. Cámara, H.C. Goicoechea, Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development, *Talanta.* 124 (2014) 123–138.
- [34] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escalera, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta.* 76 (2008) 965–977.
- [35] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, □sa Nyström, J. Pettersen, R. Bergma, Experimental design and optimization, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 42 (1998) 3–40.
- [36] M. Espino, M. de los Ángeles Fernández, F.J. V Gomez, M.F. Silva, Natural designer solvents for greening analytical chemistry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 76 (2016) 126–136.
- [37] G.I.C. Simpson, Y.A. Jackson, Comparison of the chemical composition of East Indian, Jamaican and other West Indian essential oils of Myristical fragrans Houtt., *J. Essent. Oil Res.* 14 (2002) 6–9.
- [38] B. Tang, K.H. Row, Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences, *Monatshefte Fur Chemie.* 144 (2013) 1427–1454.
- [39] B. Tang, M. Tian, K.H. Row, Determination of terpenoids in Chamaecyparis obtusa leaves by headspace single-drop microextraction with gas chromatography detection, *Anal. Lett.* 47 (2014) 48–57.
- [40] V. Sawaddipanch, S. Chanthai, Headspace-single drop microextraction followed by gas chromatographic determination of key aroma compounds in tomato fruits and their sample products, *Orient. J. Chem.* 32 (2016) 1271–1282.
- [41] M. Moradi, M. Kaykhani, A.R. Ghiasvand, S. Shadabi, A. Salehinia, Comparison of headspace solid-phase microextraction, headspace single-drop microextraction and hydrodistillation for chemical screening of volatiles in Myrtus Communis L, *Phytochem. Anal.* 23 (2011) 379–386.
- [42] C. Jiang, S. Wei, X. Li, Y. Zhao, M. Shao, H. Zhang, A. Yu, Ultrasonic nebulization headspace ionic liquid-based single drop microextraction of flavour compounds in fruit juices, *Talanta.* 106 (2013) 237–242.
- [43] M. Jalali Heravi, H. Sereshti, Determination of essential oil components of Artemisia haussknechtii Boiss. using simultaneous hydrodistillation-static headspace liquid phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1160 (2007) 81–89.
- [44] F. Sadeghian, P. Ebrahimi, A. Shakeri, M.R. Jamali, Extraction of Citrus paradisi volatile components by headspace single-drop microextraction and statistical modeling, *J. Chromatogr. Sci.* 54 (2016) 1263–1269.
- [45] B. Marongiu, A. Piras, S. Porcedda, E. Tuveri, E. Sanjust, M. Meli, F. Sollai, P. Zucca, A. Rescigno, Supercritical CO□ extract of Cinnamomum zeylanicum: Chemical characterization and antityrosinase activity, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 10022–10027.
- [46] J. Yang, H. Wei, C. Yu, Y. Shi, H. Zhang, Extraction of the volatile and semivolatile compounds in seeds of Cuminum cyminum L. Using hydrodistillation followed by headspace-ionic liquid-based single-drop microextraction, *Chromatographia.* 75 (2012) 1435–1443.
- [47] M. Santana De Oliveira, W. Almeida Da Costa, D. Santiago Pereira, R. Santos Botelho, T. Oliveira De Alencar Menezes, E. Helena De Aguiar Andrade, S. Helena, M. Da Silva, A. Pedro, D. Silva, S. Filho, R. Nunes De Carvalho Junior, Chemical composition and phytotoxic activity of clove (Syzygium aromaticum) essential oil obtained with supercritical CO□, *J. Supercrit. Fluids.* 118 (2016) 185–193.
- [48] A.L. Dawidowicz, E. Rado, D. Wianowska, M. Mardarowicz, J. Gawdzik, Application of PLE for the determination of essential oil components from Thymus vulgaris L, *Talanta.* 76 (2008) 878–884.
- [49] A. Piras, A. Rosa, B. Marongiu, A. Atzeri, M.A. Dessi, D. Falconieri, S. Porcedda, Extraction and separation of volatile and fixed oils from seeds of myristica fragrans by supercritical CO□: Chemical composition and cytotoxic activity on caco-2 cancer cells, *J. Food Sci.* 77 (2012) 1–6.

---

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---



## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les douleurs chroniques, atteignant aujourd'hui environ 30 % des adultes de la population française, ont de sérieuses conséquences sur la qualité de vie du patient. La recherche d'un traitement à base de méthodes plus douces que la prise de médicaments pour soulager ces douleurs représente donc un enjeu important pour la santé publique. L'objectif principal de ce projet de thèse était alors de trouver une plante ou une molécule possédant des propriétés anti-inflammatoire dans le but de soulager les personnes souffrantes de douleurs chroniques inflammatoires.

Pour répondre à cette problématique, plusieurs questions se sont alors posées. Comment évaluer l'activité anti-inflammatoire d'un extrait de plante ? Quelles plantes étudier ? Quels métabolites secondaires contenus dans la plante peuvent être responsable d'une telle activité ? Lesquels étudier ? Comment extraire de manière efficace ces composés bioactifs ? Quels sont les critères à respecter pour choisir une méthode d'extraction ?

Dans un premier temps, une étude bibliographique a été conduite pour répondre à ces différentes questions. Les mécanismes de la douleur ainsi que de l'inflammation ont été étudiés : le suivi de la libération du TNF- $\alpha$ , premier messenger de l'inflammation à être sécrété après une agression, permet de déterminer rapidement et efficacement une activité anti-inflammatoire *in vitro*. Les terpènes, la plus grande famille des molécules naturelles, sont responsables d'un grand nombre d'activités biologiques attribuées aux plantes. Les monoterpènes ainsi que les sesquiterpènes volatils sont les principaux composés de l'essence d'une plante. Ces molécules ont démontré une activité anti-inflammatoire et anti-TNF- $\alpha$  mais restent encore très peu étudiées par rapport à la quantité de structures chimiques différentes composant cette grande famille de molécules. Deux plantes, encore peu étudiées mais faisant parties de familles bien connues, ont été sélectionnées pour conduire ce projet : le *Calamintha nepeta* ainsi que l'*Asarum europaeum*. Il existe aujourd'hui un grand nombre de techniques pour l'extraction des terpènes volatils : des méthodes conventionnelles, des méthodes non-conventionnelles ainsi que des méthodes de microextraction plus récentes. Chacune de ces méthodes possèdent leurs avantages et leurs inconvénients, paramètres importants à étudier lors du choix de la technique d'extraction.

Différentes méthodes d'extraction ont été mises en place avec succès pour l'extraction des terpènes dans diverses matrices végétales. Par soucis d'économie de la matière végétale, le développement des différentes techniques ainsi que leur optimisation n'ont pas été effectués sur les plantes d'intérêts mais sur des plantes modèles riches en terpènes, les épices. Les extraits ont été analysés par GC-MS. Étant à la recherche d'une méthode permettant d'extraire le plus grand nombre de composés actifs différents en grande quantité, différentes analyses des extraits ont été réalisées à partir des données obtenues par GC-MS. Une analyse qualitative basée sur le spectre de masse ainsi que sur l'indice de rétention de

chaque composé a permis d'identifier les terpènes présents dans ces extraits. Une analyse quantitative a ensuite été conduite en utilisant plus d'une vingtaine d'étalons correspondants à différentes structures de terpénoïdes. Ces deux types d'analyses ont permis de comparer l'efficacité d'extraction des différentes techniques. La première étude a porté sur la comparaison de trois méthodes d'extractions communes : l'hydrodistillation, l'extraction par liquide pressurisé (PLE) ainsi que l'extraction dans l'espace de tête (HS). L'hydrodistillation, méthode conventionnelle utilisée pour l'extraction d'huiles essentielles contenues dans les plantes, permet d'obtenir des extraits très concentrés mais seulement en quelques terpènes majoritaires présents dans les plantes étudiées. Les extraits obtenus par HS étaient quant à eux riches en un grand nombre différent de terpènes volatils. Cependant, cette méthode très sélective des composés volatils a montré une faible sensibilité. Ainsi, afin de surmonter cette limite majeure de la HS, deux méthodes de microextraction en espace de tête permettant une concentration des composés volatils ont été étudiées : la microextraction sur phase solide (HS-SPME) et l'extraction par sorption dans l'espace de tête (HSSE). Ces deux techniques ont montré une efficacité d'extraction plus importante que la HS et que la PLE. La HS-SPME, qui a été utilisée uniquement comme une méthode d'analyse dans notre étude, permet d'obtenir un profil complet des molécules volatiles présentes dans la plante. Cette technique simple à mettre en œuvre, reproductible et sans solvant, peut être intéressante pour effectuer un criblage rapide de plantes riches en terpènes volatils bioactifs. La HSSE, quant à elle, permet de produire des extraits riches en terpènes, plus riches que les extraits obtenus par PLE mais moins concentrés que les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation.

A la suite de cette première comparaison de différentes méthodes d'extraction de composés terpéniques volatils, les techniques sélectionnées pour réaliser les extraits de plantes afin de tester leur propriété anti-inflammatoire sont la PLE et l'HSSE. Les extraits de plante par hydrodistillation n'ont pas été effectués à cause de la toxicité du solvant organique utilisé pour récupérer l'huile essentielle et de la grande quantité de matière première nécessaire pour réaliser l'extraction. L'extrait HSSE obtenu pour les plantes était plus riche en terpènes que l'extrait PLE. L'intérêt de mesurer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait PLE, composé de molécules volatiles et non volatiles, était de vérifier si l'activité pouvait aussi provenir de molécules non volatiles. L'activité anti-inflammatoire des extraits obtenus a été évaluée par test cellulaire *in vitro* en suivant la sécrétion de TNF- $\alpha$  par cytométrie en flux. Les extraits PLE de *Calamintha nepeta* et d'*Asarum europaeum* ont montré une activité anti-inflammatoire contrairement aux extraits HSSE de ces mêmes plantes. Il serait intéressant dans la suite de caractériser les composés non volatils présents dans les extraits PLE, par HPLC par exemple, et de potentiellement procéder à un fractionnement bio-guidé afin d'identifier la molécule ou les molécules responsables de l'activité de ces extraits de plantes.

Afin d'étudier la cause du manque d'activité des extraits HSSE des plantes médicinales, l'activité anti-TNF- $\alpha$  du terpène présent majoritairement dans l'extrait de *Calamintha nepeta*, le pulegone, a été



mesurée. La concentration minimale nécessaire de pulégone permettant une inhibition de la sécrétion du TNF- $\alpha$  est bien supérieure à la concentration en pulégone dans l'extrait de plante. L'absence d'activité anti-inflammatoire des extraits de plante est potentiellement la conséquence d'une concentration trop faible en molécules bioactives. Afin d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire du pulégone, son activité a été comparée à celle du menthol, molécule de référence retrouvée dans de nombreux traitements anti-douleurs. Ces deux molécules très proches chimiquement ont montré une activité anti-inflammatoire très similaire mais une toxicité différente. En effet, il a été démontré qu'à même concentration le pulégone est beaucoup moins toxique. Cette molécule pourrait donc venir remplacer le menthol dans différentes préparations pharmaceutiques afin d'en diminuer les effets secondaires néfastes.

A la suite des résultats des tests biologiques, un nouveau challenge est apparu : développer une autre méthode d'extraction permettant d'obtenir des extraits plus concentrés en molécules actives. Une technique couplant des solvants « verts » émergents, les solvants eutectiques profonds (DES), à une méthode connue pour l'extraction des composés bioactifs, la microextraction liquide sur une goutte (SDME), a été mise en place dans l'espace de tête de l'échantillon. Cette méthode, appelée DES-HS-SDME, n'a fait l'objet que d'une seule étude dans la littérature pour l'extraction de molécules volatiles. Dans cette thèse, la DES-HS-SDME a été développée et optimisée avec succès pour l'extraction des terpènes volatils dans différentes matrices végétales. Les extraits de plantes obtenus par DES-HS-SDME étaient au moins 10 fois plus concentrés en composés bioactifs que les extraits obtenus par HSSE et par PLE. Par exemple, théoriquement, en comparant à l'activité du composé pur, la concentration en pulégone dans l'extrait de *Calamintha nepeta* obtenu par DES-HS-SDME serait suffisante pour observer une activité anti-TNF- $\alpha$  de l'extrait, sous réserve de l'absence d'effets antagonistes d'autres molécules présentes dans l'extrait. Les DESs s'inscrivent alors comme une alternative « verte » aux solvants organiques permettant d'extraire efficacement des composés volatils bioactifs. Dans la suite du projet, il serait alors intéressant de déposer la goutte d'extrait très riche en terpènes directement sur les cellules et de suivre la sécrétion de TNF- $\alpha$  afin de mesurer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait.

Pour conclure, ce projet de thèse a permis de mettre en avant l'importance du choix de la méthode d'extraction utilisée en amont d'un test biologique. Une nouvelle expertise sur les DESs en tant que solvants d'extraction pour les molécules bioactives a été acquise. Un développement de la méthode d'extraction DES-HS-SDME à un niveau industriel permettrait de diminuer les coûts de production (meilleur rendement, plus rapide, solvant peu cher) d'un extrait à base de plante aux propriétés anti-inflammatoire. Cet extrait pourrait alors être préconisé pour le soulagement de douleurs chroniques inflammatoires. Les résultats préliminaires de ce projet obtenus sur le pulégone sont aussi

très prometteurs. Des tests *in vivo* pour évaluer l'activité antidouleur de cette molécule vont être réalisés dans la suite afin de confirmer son potentiel pour le traitement des douleurs chroniques.



---

# ANNEXES

---



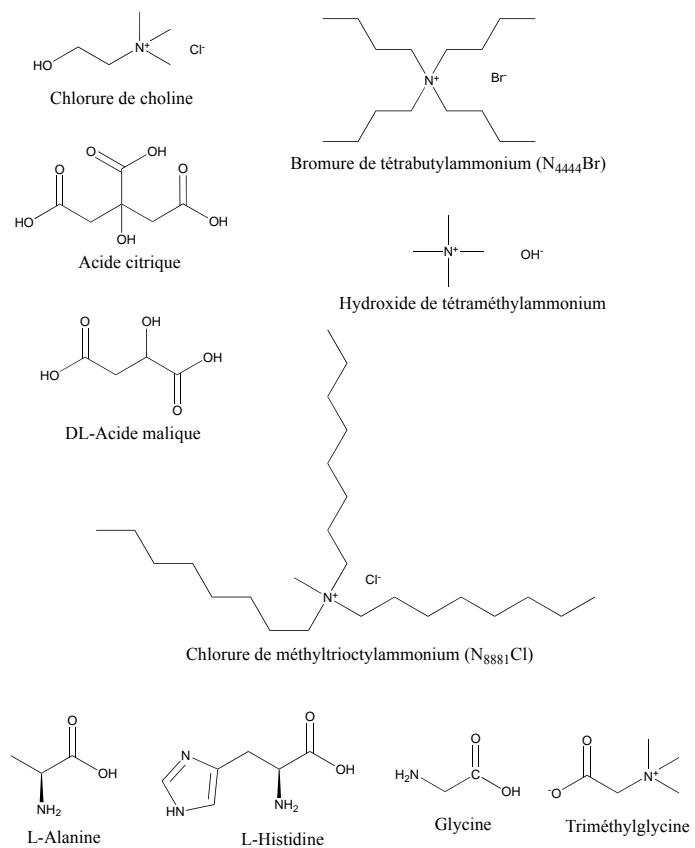
## ANNEXES

## ANNEXE 1 : TABLEAU RECAPITULATIF DES PARAMETRES DES METHODES D'EXTRACTION OPTIMISEES

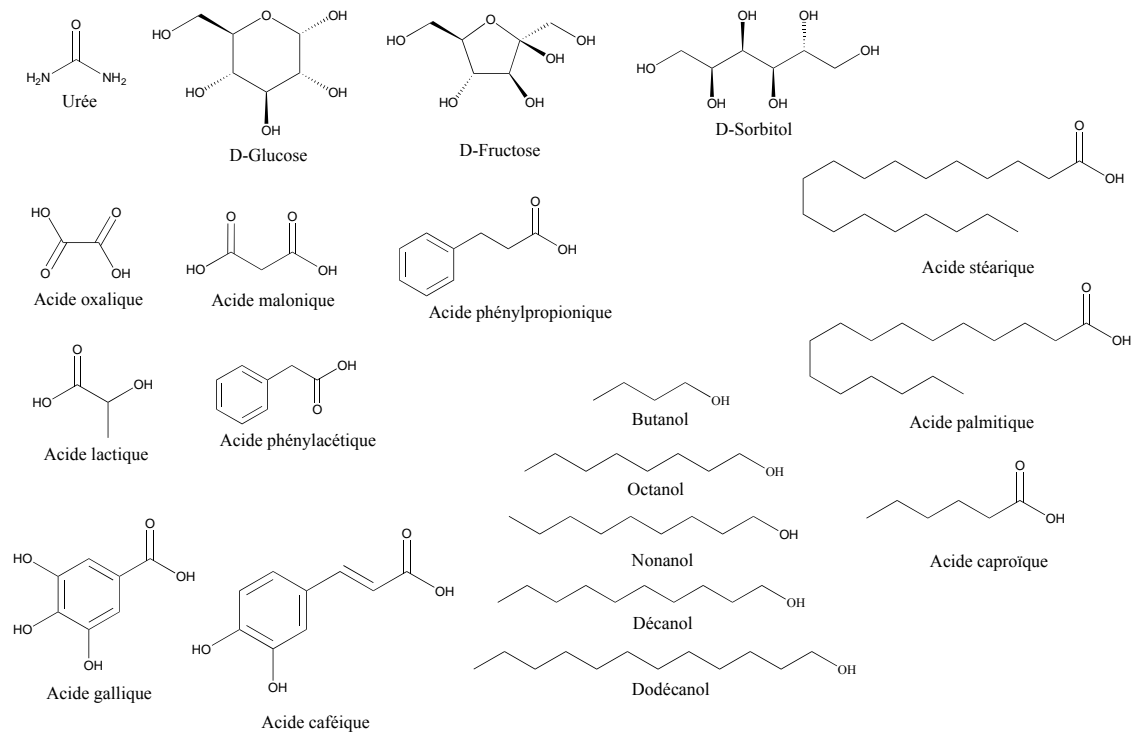
Méthode d'extraction	Abréviation	Principe de l'extraction	Masse matrice	Solvant	Température d'extraction	Temps d'extraction	Procédé de désorption	Volume d'extrait obtenu
Hydrodistillation	HD		20 g	HCl 0.1 M	150 °C	3 h	/	Huile essentielle dans 1 mL d'isooctane
Extraction par liquide pressurisé	PLE	Extraction solide-liquide sous pression	3 g	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50)	125 °C	7 min	/	20 mL
Extraction dans l'espace de tête	HS	Prélèvement des composés dans l'espace de tête	20 mg	/	125 °C	30 min	/	/
Microextraction sur phase solide dans l'espace de tête	HS-SPME	Absorption des composés dans une fibre PDMS 100 µm	70 mg	/	80 °C	60 min	Dans l'injecteur à 210 °C	/
Extraction par sorption dans l'espace de tête	HSSE	Absorption des composés sur un barreau magnétique recouvert de PDMS	80 mg	EtOH	80 °C	90 min	30 min aux ultrasons	100 µL
Microextraction liquide sur une goutte dans l'espace de tête couplée aux solvants eutectiques profonds	DES-HS-SDME	Absorption des composés dans une goutte de 2 µL de DES	50 mg	Bromure de tétrabutylammonium/ Dodecanol (1 :2)	80 °C	90 min	/	2 µL

## ANNEXE 2 : STRUCTURE DES HBA ET HBD UTILISES POUR LES DIFFERENTES COMBINAISONS DES DESs SYNTHETISES

## Accepteur de liaison hydrogène (HBA)



## Donneur de liaison hydrogène (HBD)







**RESUME** : Aujourd'hui, environ un français sur trois souffre de douleurs chroniques. Dans la plupart des cas les médicaments préconisés dans le cadre du traitement de ces maladies sont des anti-inflammatoires ou des antidouleurs dont les effets secondaires sont non négligeables. Le but de cette thèse était d'explorer les propriétés anti-inflammatoires d'extraits de plantes thérapeutiques afin de les proposer comme traitement alternatif pour les douleurs chroniques inflammatoires. Parmi les métabolites secondaires présents dans les plantes, nous avons choisi d'étudier les propriétés biologiques des terpènes et plus particulièrement des terpènes volatils (monoterpènes et sesquiterpènes volatils). Ces derniers ont été obtenus à partir de deux plantes peu étudiées : le *Calamintha nepeta* (L.) savi et l'*Asarum europaeum* (L.). Différentes techniques ont été optimisées pour l'extraction des terpènes volatils à partir de matière végétale à savoir l'hydrodistillation, l'extraction par liquide pressurisé (PLE), l'extraction dans l'espace de tête (HS), la microextraction sur phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME), l'extraction par sorption dans l'espace de tête (HSSE) et enfin la microextraction liquide sur une goutte dans l'espace de tête couplée aux solvants eutectiques profonds (DES-HS-SDME). Chaque extrait a été analysé par GC-MS et une analyse qualitative et quantitative ont été conduites sur les données obtenues. La méthode DES-HS-SDME a montré la meilleure efficacité pour l'extraction de terpènes volatils de différentes polarités, températures d'ébullition et masses moléculaire. Dans cette thèse, les DESs ont été utilisés pour l'une des premières fois pour l'extraction des composés volatils. Ces solvants émergents se présentent bel et bien comme une alternative prometteuse aux solvants organiques toxiques utilisés couramment en chimie analytique. L'activité anti-inflammatoire de chaque extrait a été évaluée par des tests *in vitro*. Pour cela, la capacité des molécules à inhiber la sécrétion de TNF- $\alpha$ , principal messenger de l'inflammation, a été mesurée par cytométrie en flux. Seuls les extraits obtenus par PLE des deux plantes étudiées ont montré une activité anti-inflammatoire. Ces extraits, dont la composition est faible en composés volatils, contiennent d'autres molécules bioactives non volatiles pouvant être responsable de l'activité biologique observée. Même si aucun extrait riche en terpènes volatils n'a permis une inhibition significative de la sécrétion de TNF- $\alpha$ , des résultats préliminaires ont montrés que les composés principaux des plantes étudiées avaient une activité anti-inflammatoire. Le pulégone, composé volatil majoritaire des extraits de *Calamintha nepeta* (L.) savi et dont la structure chimique est proche du menthol, possède une activité anti-inflammatoire similaire de celui-ci ( $EC_{50}$ (pulégone) = 1,5 mM et  $EC_{50}$ (menthol) = 1,2 mM). De plus, un avantage majeur du pulégone a été dégagé au cours de ce projet : sa faible toxicité par rapport à celle du menthol. En effet, l' $EC_{50}$  de toxicité du pulégone est de 6,8 mM tandis que celle du menthol est de 3,6 mM. Le pulégone se présente alors comme une potentielle alternative au menthol dans différentes préparations pharmaceutiques permettant ainsi d'augmenter la dose de principe actif tout en diminuant les effets secondaires dû à la toxicité de celui-ci. L'ensemble de ces résultats montre l'intérêt de s'intéresser aux molécules bioactives des plantes pour le traitement des douleurs chroniques inflammatoires mais aussi pour le traitement de toute autre maladie.

**Mots-clés** : Terpènes ; extraction ; anti-inflammatoire ; plantes thérapeutiques

**ABSTRACT** : Today, approximately one third of the French population suffers from chronic pain. In most cases, the drugs recommended for the treatment of these diseases are anti-inflammatory or painkillers with significant side effects. The aim of this thesis was to explore the anti-inflammatory properties of therapeutic plant extracts in order to recommend them as an alternative treatment for chronic inflammatory pain. Volatile terpenes were obtained from two plants not well characterized: *Calamintha nepeta* (L.) savi and *Asarum europaeum* (L.). Different techniques have been optimized for the extraction of volatile terpenes from plant material, namely hydrodistillation, pressurized liquid extraction (PLE), headspace extraction (HS), headspace solid phase microextraction (HS-SDME), headspace sorptive extraction (HSSE) and finally single drop microextraction coupled to deep eutectic solvents (DES-HS-SDME). Each extract was analyzed by GC-MS and a qualitative and quantitative analysis were conducted on the obtained data. The DES-HS-SDME method showed the best efficiency for the extraction of volatile terpenes of different polarities, boiling temperatures and molecular weights. In this thesis, DESs were used for one of the first time for the extraction of volatile compounds. These emerging solvents are a promising alternative to the toxic organic solvents commonly used in analytical chemistry. The anti-inflammatory activity of each extract was evaluated by *in vitro* tests. To this end, the ability of the molecules to inhibit the secretion of TNF- $\alpha$ , the main messenger of inflammation, was measured by flow cytometry. Only the extracts obtained by PLE from the two plants studied showed anti-inflammatory activity. Those extracts, which contain a low concentration of volatile compounds, contain other non-volatile bioactive molecules which may be responsible for the measured biological activity. Although no extract concentrated in volatile terpenes has significantly inhibited the secretion of TNF- $\alpha$ , preliminary results have shown that the main compounds of the studied plants have anti-inflammatory activity. Pulegone, the main volatile compound of *Calamintha nepeta* (L.) savi extracts and whose chemical structure is close to menthol, has a similar anti-inflammatory activity to menthol ( $EC_{50}$ (pulegone) = 1.5 mM et  $EC_{50}$ (menthol) = 1.2 mM). A major advantage of pulegone was identified in this project: its low toxicity compared to menthol. Indeed, the toxicity  $EC_{50}$  of pulegone is 6.8 mM while the one of menthol is 3.6 mM. Pulegone can thus be introduced as a potential alternative to menthol in various pharmaceutical preparations allowing to increase the dose of active ingredient while reducing the side effects linked to its toxicity. All these results show why it is important to focus on bioactive molecules in plants for the treatment of chronic inflammatory pain and why not for the treatment of any other disease.

**Keywords** : Terpenes ; extraction ; anti-inflammatory ; therapeutic plants