



**HAL**  
open science

# Méthodes extractives, analytiques et d'améliorations de la biodisponibilité des principes actifs contenus dans le *Cannabis sativa* L.

Valentin Pichon

► **To cite this version:**

Valentin Pichon. Méthodes extractives, analytiques et d'améliorations de la biodisponibilité des principes actifs contenus dans le *Cannabis sativa* L.. Autre. Université de Limoges, 2024. Français. NNT : 2024LIMO0059 . tel-04810722

**HAL Id: tel-04810722**

**<https://theses.hal.science/tel-04810722v1>**

Submitted on 29 Nov 2024

**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.



**Université de Limoges**

**ED 652 - Biologie, Chimie, Santé (BCS)**

**Laboratoire des Agroressources, Biomolécules et Chimie pour l'innovation en Santé (LABC*i*S) et Centre Lab**

Thèse pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Chimie ; Spécialité : Chimie des Substances Naturelles

Présentée et soutenue par  
**Valentin Pichon**

Le 11 octobre 2024

**Méthodes extractives, analytiques et d'amélioration de la  
biodisponibilité des principes actifs contenus dans le  
*Cannabis sativa* L.**

Thèse dirigée par Pr. Lengo MAMBU et Pr. Marylène VIANA

JURY :

Président du jury

Mr. Vincent SOL, Professeur, Université de Limoges

Rapporteurs

Mme. Anne-Sylvie FABIANO-TIXIER, Maître de conférences, Université d'Avignon

Mme. Céline RIVIERE, Professeur, Université de Lille

Examineurs

Mme. Lengo MAMBU, Professeur, Université de Limoges

Mme. Marylène VIANA, Professeur, Université de Limoges

Mr. Pierre WAFFO TEGUO, Professeur, Université de Bordeaux

Mr. Gilles DUCRET, Pharmacien responsable, Centre Lab





*L'esprit qui invente est toujours mécontent de ses progrès, parce qu'il voit au-delà.*

**Jean le Rond d'Alembert**





## Remerciements

---

En premier lieu, je souhaiterais exprimer ma gratitude à l'**ANRT** et la **Région Nouvelle-Aquitaine** pour avoir permis la réalisation de ce projet à travers les différentes aides de financements. Grâce à leurs soutiens, j'ai pu mener à bien les expérimentations et analyses qui sont le cœur de ce travail.

Je souhaiterais remercier le professeur **Vincent SOL** qui m'a donné l'opportunité de candidater et de réaliser cette thèse sur un sujet passionnant et d'actualités. Je le remercie également pour les nombreux cours de chimie organique depuis mes années de licences et masters jusqu'aux opportunités de stages au sein des anciens laboratoires (LCSN et Peirene).

Je remercie le directeur du laboratoire LABC/S, le Professeur **Bertrand LIAGRE** pour son aide continue et ses réponses à nos nombreuses interrogations en tant que futur docteur.

Je remercie bien évidemment mes directeurs de thèse sans qui tout ce travail n'aurait pu être réalisé.

Au Professeure **Lengo MAMBU**, qui m'a suivi pendant plus de trois ans sur ce sujet qui a évolué de nombreuse fois, je la remercie de m'avoir conseillé depuis mes débuts et de m'avoir permis d'évoluer au fur et à mesure en autonomie, de traverser les passages de doutes, et surtout de développer ma qualité rédactionnelle et synthétique afin de devenir docteur. J'espère que dans le futur nous travaillerons de nouveau ensemble, que ce soit pour des publications sur mes recherches sur le cannabis ou bien de futurs projets.

Au Professeure **Marylène VIANA**, je la remercie également pour avoir accepté que je puisse suivre ses cours de formulation, pour avoir pris le temps de m'expliquer les principes expérimentaux de la galénique afin de réaliser avec rigueur les comprimés sublinguaux de CBD. Je la remercie tout simplement pour m'avoir initié à un domaine qui n'était pas du tout présent dans mon cursus universitaire. Je n'ai qu'un regret c'est de ne pas avoir pu passer plus de temps en galénique (en raison des multiples complications du projet) afin d'assouvir encore plus ma soif de savoir et pratiques dans ce domaine avec des passionnés.

J'aimerais remercier l'ensemble des membres du jury de cette thèse, la Docteure **Anne-Sylvie FABIANO-TIXIER** et la Professeure **Céline RIVIERE** pour avoir accepté d'être rapporteurs, ainsi que le Professeur **Pierre WAFFO TEGUO** pour prendre le rôle d'examineur. J'ai hâte et ce sera avec plaisir de vous recevoir à la faculté de Pharmacie de Limoges et de pouvoir échanger et discuter autour de vos thématiques et de mon sujet.

Je souhaiterais remercier l'entreprise CENTRE LAB qui m'a accueilli et fait confiance et sans qui ce projet de thèse CIFRE n'aurait jamais pu avoir lieu.

Je remercie bien évidemment les directeurs du site de Guéret, **Gilles DUCRET** et **Matthieu FOURNIER**, qui m'ont encadré et épaulé tout au long de cette thèse. J'espère avoir répondu à leurs attentes, en tant que premier doctorant de l'entreprise, et ce fut un plaisir de travailler pour eux. Je souhaite toute la réussite possible pour les futurs projets de l'entreprise.

Je remercie également toute l'équipe de R&D, le responsable du service **Dylan DE SOUZA**, ainsi que mes collègues **Julie DEBARGES** et **Cléo BRANTONNE** qui m'ont parfaitement intégré, appris l'art de la validation analytique et de la conformité des batchs, et avec qui j'ai passé d'excellents moments que ce soit autour des repas ou des expériences lorsque j'étais au laboratoire. Je remercie aussi toutes les autres personnes du site de Guéret que je n'ai pas cité.

Je remercie ma collègue, et future Docteure, **Hind MAKHLOUFI** qui m'a supporté et soutenu pendant toutes ces années, avec qui j'ai partagé les gossips et cette épreuve de la thèse. J'espère t'avoir transmis la notion de remettre les choses à demain lorsqu'il se fait tard avec un ciao-bisous. Je te souhaite le meilleur pour l'obtention de ton titre de docteur et de ta réussite professionnelle.

J'exprime mes remerciements à tous les autres doctorants dont j'ai croisé la route mais également au Docteur **Guillaume HAMION** qui m'a transmis sa passion pour les réseaux moléculaires et à **Cécile LETULLE**, qui a rejoint notre équipe et partagé notre bureau pour sa dernière année. Malgré quelques désaccords sur la pomme et la crème fraîche limousine, l'entente et la bonne humeur étaient quotidiennement aux rendez-vous.

Je souhaiterais remercier aussi les autres personnes du département de pharmacognosie, la Docteure **Marion MILLOT** pour m'avoir accueilli en stage de master et fait découvrir cette voie autour des molécules naturelles (dont les lichens) ; l'assistante technique **Léa GIBOT-LECLERC** qui m'a apporté son aide technique et morale dans la vie quotidienne du labo et lors des TPs que j'ai eu l'occasion d'encadrer ; et enfin **Aline PINON** pour sa bonne humeur, sa motivation, son aide et ses commandes de réactifs.

J'aimerais remercier les personnels du département de galénique qui m'ont apporté leurs connaissances pratiques tout en prenant en compte ma faible expérience dans ce domaine, à **Nathalie PECOUT** qui m'a expliqué les techniques de formulation et avec qui on a formé un binôme de fabrication de comprimés de CBD sur des petites sessions et à la Docteure **Betty LAVERDET POUCH** qui m'a accueilli en TP de galénique comme un étudiant de Master afin de me transmettre ses connaissances.

J'envoie des remerciements aux membres du département de botanique, au Docteur **Pascal LABROUSSE** qui m'a transmis sa passion pour les plantes et leurs structures, qui m'a épaulé pour mes premiers travaux pratiques et conseillé sur mon avenir de chercheur ; et au Docteur **Philippe HOURDIN** qui m'a assisté avec sa bonne humeur pendant les TP de P2.

Je remercie brièvement tout le département de chimie organique, essentiellement la Professeure **Christelle POUGET** et le Docteur **François-Xavier TOUBLET** pour leur aide, et leur présence lors de mes expérimentations de cannabis en micro-ondes avec quelques Erlen cassés.

Je souhaiterais remercier les membres du CBRIS, la responsable de plateforme **Emilie PINAULT** pour ses nombreux conseils en LC-MS/MS ainsi que pour avoir préparé quelques extraits dilués de résines et le Docteur **Yves CHAMPAVIER** pour m'avoir aidé dans l'élucidation structurale de mes composés.

Je remercie le Professeur agrégé **François LOUVET** qui a eu la patience de m'inculquer les notions de statistiques et de plan d'expériences qui effraient énormément de personnes aux premiers abords mais qui une fois dedans nous permettent de développer nos résultats et d'en tirer des conclusions cruciales.

J'aimerais remercier aussi le personnel de l'IUT Génie biologique de Limoges, à savoir le chef de département et Professeur **Tan-Sothéa OUK**, la Docteure **Naima SAAD** et les techniciens du site pour m'avoir apporté leur aide pour réaliser mes travaux d'extractions et d'analyses GC mais également pour m'avoir accueilli il y a 10 ans de cela pour mon DUT et fait confiance jusqu'à aujourd'hui. J'espère que nos routes se recroiseront.

Un petit mot de remerciement à **Sylvie POIRIER**, gestionnaire du laboratoire et sans qui je n'aurais jamais pu partir en congrès, que ce soit à Dublin ou à Cracovie.

Enfin je souhaiterais remercier professionnellement tous les stagiaires que j'ai pu encadrer et qui m'ont permis d'avancer dans les recherches de ma thèse, mais également tous les autres professeurs et docteurs de l'ensemble des sites de la faculté des sciences, de la faculté de pharmacie que je n'aurais pas cités.

A ma famille, mes parents et mon frère qui m'ont tout d'abord encouragé dans le désir de faire des études, puis supporté jusqu'à la fin. J'aimerais les remercier du fond du cœur d'avoir été présents quand j'en ai eu le besoin, de m'avoir écouté parler pendant des heures et d'avoir compris l'intérêt de la science dans mon existence. Je les remercie tout simplement d'être là quoi qu'il arrive et je leur souhaite tout le bonheur possible aussi bien professionnellement parlant que personnellement. Je leur suis redevable de tout ce qu'ils ont fait et j'espère pouvoir leur rendre dès que je le pourrais.

A toi Elodie, ma fiancée et très bientôt ma femme, il y a trois ans de cela, on se rencontrait à peine autour de quelques cartons de déménagements. Rien ne prédestinait à ce que l'on en arrive aujourd'hui à ce niveau, à savoir des projets de vies et de mariage. Tu m'as fait grandir, évoluer et prendre conscience des responsabilités, saches que je suis fier de devenir ton mari et pour rien au monde je changerai l'histoire. J'écris ces quelques mots qui semblent sans doute peu par rapport à tout ce que j'aimerais dire, par rapport à tout ce que l'on a vécu ensemble et encore à tout ce que l'on va vivre, je t'aime et je ferais tout ce qui est en mon pouvoir pour toi, pour nous.



## Communications scientifiques et encadrements

---

### Publications scientifiques :

**Pichon, V.** ; Millot, M. ; Pinault, E. ; Hamion, G. ; Ducret, G. ; Viana, M. ; Mambu, L. (2024) Development and optimization of different eco-extraction and analytical methods on *Humulus lupulus* L. with molecular networks, quantifications and desirability approaches. *Industrial Crops and Products*. (Article sous révisions mineures)

Toure, S. ; Millot, M. ; Ory, L. ; Roullier, C. ; Khaldi, Z. ; **Pichon, V.** ; Mambu, L. (2022). Access to Anti-Biofilm Compounds from Endolichenic Fungi Using a Bioguided Networking Screening. *Journal of Fungi*, 8(10), 1012.

### Communications internationales par posters :

**Pichon V.** ; Gibot-Leclerc, L. ; Pinault, E. ; Ducret, G. ; Viana, M. ; Mambu, L. (2023). Development and optimization of extractive and analytical methods on *Humulus lupulus* L. *Planta Medica*, 89(14), P-320. *71st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA)* à Dublin, 2 au 5 juillet 2023.

**Pichon V.** ; Pinault, E. ; Louvet F. ; Ducret, G. ; Viana, M. ; Mambu, L. (2024). Development and optimization of different eco-extraction and analytical methods on *Cannabis sativa* L. *International Congress on Natural Products Research (ICNPR)* à Cracovie, du 13 au 17 juillet 2024.

### Stagiaires encadrés :

CHEVET Emeline, Master 1 (3 mois - 2022). Mise au point de méthodes extractives et dosages sur *Humulus lupulus* L.

KADIRI Amina, Master 1 (3 mois - 2023). Mise au point de dosages colorimétriques sur *Cannabis sativa* L.

DEGRE Juliette, Master 2 (1 mois - 2023). Etudes des techniques de séparations et purifications d'extraits de *Cannabis sativa* L.

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Table des matières

---

Introduction .....	33
Partie I. <i>Humulus lupulus</i> L.....	37
I.1. Structure et morphologie végétale.....	37
I.2. Histoire et cultures .....	38
I.2.1. Les origines du houblon .....	38
I.2.2. La production mondiale .....	39
I.3. Métabolites d'intérêts .....	40
I.3.1. Composition chimique .....	40
I.3.2. Terpènes .....	40
I.3.3. Polyphénols.....	42
I.3.4. Pigments photosynthétiques.....	46
I.4. Utilisations alimentaires et pharmaceutiques .....	48
Partie II. <i>Cannabis sativa</i> L.....	53
II.1. Structure et morphologie végétale.....	53
II.2. Histoire et production mondiale.....	55
II.2.1. Une culture ancestrale jusqu'à une dépénalisation progressive.....	55
II.2.2. Production européenne .....	58
II.2.3. Utilisations et consommations actuelles .....	61
II.3. Métabolites d'intérêts .....	63
II.3.1. Composition chimique .....	63
II.3.2. Phytocannabinoïdes .....	64
II.3.3. Polyphénols et alcaloïdes .....	66
II.3.4. Terpènes .....	67
II.4. Méthodes d'extraction des phytocannabinoïdes.....	68
II.5. Synthèses chimiques métabolites d'intérêts.....	69
II.5.1.1. Synthèses totales des cannabinoïdes .....	69
II.5.1.2. Réactions d'hémisynthèse du CBN .....	75
II.6. Système endocannabinoïde (Récepteur CB1/CB2) .....	77
II.6.1. Fonctionnement du système.....	77
II.6.2. Endocannabinoïdes et cannabinoïdes .....	77
II.6.3. Effets de la consommation de cannabis .....	78
II.7. Législations et expérimentation du cannabis médical.....	79
II.7.1. Deux AMM : Epidiolex et sativex .....	79
II.7.2. Expérimentation du cannabis thérapeutique en France .....	80
Partie III. Matériels et méthodes expérimentales .....	83
III.1. Matériel végétal.....	83
III.2. Equipements.....	83
III.3. Réactifs et solvants.....	84
III.4. Méthodes d'extractions .....	85
III.4.1. Méthodes d'extractions.....	85
III.4.1.1. Macération sous agitation (SE) .....	85
III.4.1.2. Extraction assistée par ultrasons (UAE) et couplage avec macération (UAE+SE).....	85
III.4.1.3. Macérations successives et triphasiques .....	86
III.4.2. Extraction par Soxhlet .....	86



III.4.3. Extraction assistée par micro-ondes (MAE) .....	87
III.4.4. Extraction liquide sous pression (PLE) .....	87
III.5. Rendement massique .....	88
III.6. Séparations et purifications .....	89
III.6.1. Préparations révélateurs et phases d'élutions .....	89
III.6.2. Séparations du THCA et d9-THC sur résines brute de cannabis .....	90
III.6.3. Séparations du CBN et d8-THC sur résines décarboxylée de cannabis .....	92
III.6.4. Analyses RMN 1D ( <sup>1</sup> H / <sup>13</sup> C) et 2D ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY, HSQC, HMBC) .....	94
III.7. Suivi de la cinétique de décarboxylation.....	94
III.7.1. Dégradation thermique du THCA en CBN .....	96
III.7.2. Hémi-synthèse CBN à partir de THC .....	96
III.8. Analyses par spectrophotométrie, chromatographies et traitements informatiques ...	96
III.8.1. Dosages colorimétriques .....	96
III.8.1.1. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux (TPC et TFC) .....	96
III.8.1.2. Teneurs en chlorophylles et caroténoïdes totaux (TCC et TCCa).....	97
III.8.1.3. Antioxydants (DPPH) .....	98
III.8.2. Analyses HS-SPME-GC-MS.....	100
III.8.3. HRLC-MS/MS.....	101
III.8.3.1. Conditions opératoires .....	101
III.8.3.2. Quantification .....	102
III.8.3.3. Déréplication par HR-LC/MS-MS .....	104
III.8.4. Réseaux moléculaires .....	104
III.8.4.1. Paramètres Mzmine 2.5 et Metgem ( <i>Humulus lupulus</i> L.) .....	107
III.8.4.2. Paramètres Mzmine 3, GNPS, Cytoscape et Sirius ( <i>Cannabis sativa</i> L.) ...	107
III.9. Optimisations et études statistiques .....	110
III.9.1. Désirabilité.....	111
III.9.2. Méthode TOPSIS .....	116
III.9.3. Plan d'expérience (DSD) et effets principaux.....	119
III.10. Formulation galénique.....	122
III.10.1. Préparation du mélange pour la compression.....	122
III.10.2. Tests pharmacotechniques.....	123
III.10.2.1. Uniformité de masse .....	123
III.10.2.2. Résistance à la rupture .....	124
III.10.2.3. Friabilité .....	124
III.10.2.4. Désagrégation.....	125
Partie IV. Résultats et discussions.....	129
IV.1. <i>Humulus lupulus</i> L. ....	129
IV.1.1. Etude préliminaire des différentes extractions .....	129
IV.1.2. Extractions et rendements massiques.....	134
IV.1.3. Analyses, quantifications et réseaux moléculaires.....	136
IV.1.3.1. Dosages colorimétriques .....	136
IV.1.3.2. Quantification par HRLC-MS/MS .....	138
IV.1.3.3. Déréplication et réseaux moléculaires (Mzmine 2.5 + Metgem) .....	142
IV.1.4. Etudes statistiques (Désirabilité) .....	145
IV.2. <i>Cannabis sativa</i> L. ....	147
IV.2.1. Extractions et rendements massiques.....	147
IV.2.2. Analyses et caractérisations.....	148
IV.2.2.1. Dosages colorimétriques .....	148

IV.2.2.2. Quantification HRLC-MS/MS .....	152
IV.2.2.3. Réseau moléculaire (Mzmine 3, GNPS, Cytoscape et Sirius) .....	156
IV.2.2.4. Analyses HS-SPME-GC-MS .....	169
IV.2.3. Séparations et Purifications.....	173
IV.2.3.1. Révélateurs et phases d'éluions .....	173
IV.2.3.2. Schéma de purification .....	174
IV.2.3.3. Déterminations structurales par RMN .....	178
IV.2.4. Décarboxylations et réactions d'aromatisation oxydative.....	189
IV.2.4.1. Cinétique de décarboxylation.....	189
IV.2.4.2. Réactions de décarboxylation oxydative (du THCA en CBN) .....	192
IV.2.5. Optimisation et études statistiques .....	198
IV.2.5.1. Désirabilité.....	198
IV.2.5.2. Méthode TOPSIS.....	199
IV.2.5.3. Plan d'expérience (DSD) et effets principaux.....	203
IV.2.6. Essais de formulations galéniques .....	207
IV.2.6.1. Excipient seul (PROSOLV® EASYtab) .....	207
IV.2.6.2. Amélioration de la désagrégation, de la saveur et ajout de terpènes .....	211
IV.2.6.3. Récapitulatif de l'ensemble des essais de mise au point des comprimés sublinguaux .....	214
Conclusion .....	219
Perspectives.....	223
Références bibliographiques .....	227
Annexes .....	245



## Abréviations

---

2-AG = 2-arachidonylglycérol

AcOEt = Acétate d'éthyle

ANS = Anisaldéhyde sulfurique

ANSM = Agence national de sécurité du médicament et des produits de santé

ASE = Extracteur assistée par solvant sous pression (appareil)

BLD = variétés de cannabis à feuilles larges pour un usage de drogue

BLH = variétés de cannabis à feuilles larges pour un usage de fibres

C/A = Solvant de phase mobile Cyclohexane/Acétate d'éthyle

Ca = Chlorophylle a

Cb = Chlorophylle b

CBC = Cannabichromène

CBCA = Acide cannabichroménique

CBD = Cannabidiol

CBDA = Acide cannabidiolique

CBG = Cannabigérol

CBGA = Acide cannabigérolique

CBN = Cannabinol

CCM = Chromatographie sur couche mince

CoHu = Cohumulone

CoLp = Colupulone

Cps = Comprimés

$\Delta$ 8-THC ou d8-THC = delta 8-tétrahydrocannabinol

$\Delta$ 9-THC ou d9-THC = delta 9-tétrahydrocannabinol

daN = Déca Newton

DM = MS = Masse sèche

DPPH = 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle

DSD = plan d'expérience du type « Definitive Screening Design »

EI = Ecart limite

éq = équivalent

EUDA = European Union Drugs Agency

EtOH = Ethanol

FBBS = Sels « Fast Blue B » (o-Dianisidine bis(diazotized) zinc double salt)

GaE = Equivalent d'acide gallique

ha = hectare

HPLC = Chromatographie liquide haute performance

HS-SPME-GC-MS = Headspace solid-phase microextraction en chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse

HtCoLp = Hydroxytricyclocolupone

HtLp = Hydroxytricyclocolupone

Hu = Humulone

IX = Isoxanthohumol

kP = Kilo Pascal

LC = Chromatographie liquide

LC-MS/MS = Chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem

LP = Lupulone

MAE = Extraction assistée par micro-ondes

MeOH = Méthanol

MPLC = Chromatographie liquide à moyenne pression

NBS = N-Bromosuccinimide

NLD = variétés de cannabis à feuilles fines pour un usage de drogue

NLH = variétés de cannabis à feuilles fines pour un usage de fibres

OEDT = Observatoire Européen des Drogues et des Toxicomanies

PA = Principe actif

PG = Prostaglandine

PLE = Extraction liquide sous pression

Primellose = Croscarmellose Sodium

PROSOLV® = Mélange commercial d'excipients de : Cellulose microcristalline ; Dioxyde de silicium colloïdal ; Glycolate d'amidon sodique ; Fumarate de stéaryle sodique

p-TSA = l'acide p-toluènesulfonique

QuE = Equivalent de quercétine

Rf = Rapport front de migration

RMN = Résonance Magnétique Nucléaire

SD = Syndrome de Dravet

SE = Macération sous agitation par solvant

SLG = Syndrome de Lennox-Gastaut

t = tonne

TCC = Teneur en chlorophylles totales (Ca et Cb)

TCCa = Teneur en caroténoïdes totaux

TE = Equivalent de trolox

TFC = Teneur en flavonoïdes totaux

TMSOTf = Trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle

TPC = Teneur en polyphénols totaux

Trolox = Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique

UAE = Extraction assistée par ultrasons

UAE-B +SE = Extraction par bain à ultrasons couplée à une macération

UAE-P +SE = Extraction par sonde à ultrasons couplée à une macération

US = Ultrasons

XN = Xanthohumol

Afin de faciliter la lecture du manuscrit, l'ensemble des valeurs est présenté sous un format numérique anglais au sein des tableaux, graphiques et explications. Autrement dit, le séparateur utilisé est un point, remplaçant la virgule.



## Table des illustrations

---

Figure 1 : Illustration des cônes et feuilles de <i>Humulus lupulus</i> L. par le botaniste Hippolyte Coste (à gauche) et photographies d'un cône coupé et des glandes à lupuline (à droite) ....	37
Figure 2 : Graphique sur la récolte et la production du houblon provenant du rapport 2022 de la commission européenne.....	39
Figure 3 : Structures de quelques monoterpènes et sesquiterpènes majoritaires du houblon .....	41
Figure 4 : Structures de quelques composés oxygénés (alcool et époxydes) du houblon.....	42
Figure 5 : Structures des chalcones prénylés du houblon.....	43
Figure 6 : Structures des flavanones du houblon.....	43
Figure 7 : Structures de flavonols et flavan-3-ols du houblon.....	44
Figure 8 : Structures des $\alpha$ -acides et $\beta$ -acides et leurs dérivés.....	45
Figure 9 : Structures des acides phénoliques et leurs dérivés du houblon.....	45
Figure 10 : Molécule de chlorophylle avec R= CH <sub>3</sub> pour la chlorophylle a et R=CHO pour la chlorophylle b .....	46
Figure 11 : Structures de carotènes et xanthophylles présents dans le houblon.....	47
Figure 12 : Isomérisation de l'humulone et de l'isohumulone dans la bière selon Van Cleemput et al., 2009 .....	48
Figure 13 : Photographies de plants de <i>Cannabis sativa</i> L. et agrandissements sur les inflorescences femelles et les trichomes.....	53
Figure 14 : Morphologie végétale des espèces de <i>Cannabis</i> .....	54
Figure 15 : Illustration du chanvre dans le Pen-ts'ao Ching avec son texte expliquant ses utilisations .....	55
Figure 16 : Recherche actuelle publications scientifiques (source : Open Alex avec le terme <i>Cannabis Sativa</i> L.) .....	58
Figure 17 : Répartition géographique des sous-espèces de cannabis selon Clarke et al. 2016 ( <i>Cannabis sativa</i> ssp. <i>sativa</i> (NLH), <i>Cannabis indica</i> ssp. <i>chinensis</i> (BLH), <i>Cannabis indica</i> ssp. <i>indica</i> (NLD) et <i>Cannabis indica</i> ssp. <i>afghanica</i> (BLD)).....	58
Figure 18 : Surfaces exploitées dans l'Union Européenne pour la culture du chanvre destinés à la production de fibres ou d'huiles (Source : Eurostat).....	59
Figure 19 : Graphiques des données l'OEDT de présentant les différentes enquêtes de proportion de la population française consommant du cannabis entre 2000 et 2021 (A) ; la répartition des différentes substances utilisées en 2021 (B) et la nationalité des consommateurs de 2021 (C) .....	60
Figure 20 : Types de matériaux obtenus sur du chanvre industriel .....	61
Figure 21 : Schéma récapitulatif de différentes applications industrielles de la plante de <i>Cannabis sativa</i> L. (Kaur and Kander, 2023) .....	62
Figure 22 : Biosynthèse des cannabinoïdes majoritaires à partir du CBGA .....	64



Figure 23 : Structures des 10 différents types de cannabinoïdes au sein de <i>Cannabis sativa</i> L.....	65
Figure 24 : Flavonoïdes isolés de <i>Cannabis sativa</i> L.....	66
Figure 25 : Stilbénoloïdes isolés de <i>Cannabis sativa</i> L.....	66
Figure 26 : Alcaloïdes isolés de <i>Cannabis sativa</i> L.....	67
Figure 27 : Terpènes isolés de <i>Cannabis sativa</i> .....	67
Figure 28 : Première synthèse du d8-THC et d9-THC adaptée selon Mechoulam et al., 1967 .....	69
Figure 29 : Première réaction de synthèse one-pot du mélange racémique de d9-THC adaptée d'après Mechoulam, 1970.....	69
Figure 30 : Amélioration de la synthèse one-pot du d9-THC adaptée de Razdan et al., 1974 .....	70
Figure 31 : Schéma de rétrosynthèse du d8-THC et d9-THC proposé par Chen et al., 2012	70
Figure 32 : Synthèse énantiosélective de d8-THC et d9-THC réalisée par Chen et al., 2012 .....	71
Figure 33 : Synthèse en continue de de d8-THC et d9-THC à partir par CBD selon Bassetti et al., 2023 .....	71
Figure 34 : Première synthèse one-pot du CBD adaptée Petrzilka et al., 1967.....	72
Figure 35 : Synthèse one-pot améliorée du CBD adaptée selon Razdan et al., 1974.....	72
Figure 36 : Synthèse alternative en trois étapes du CBD d'après Vaillancourt et Albizati, 1992 .....	73
Figure 37 : Réaction de synthèse en continue (avec 1a=olivetol et 3b= acetyl isoperitenol) .	73
Figure 38 : Synthèse totale du CBN (R= n-pentyl) selon Adams et al., 1940 .....	74
Figure 39 : Réaction de synthèse améliorée du CBN adaptée d'après Adams et al., 1940...	75
Figure 40 : Réaction d'hémisynthèse du CBN à partir de d9-THC adaptée selon Mechoulam et al., 1968 .....	75
Figure 41 : Réaction d'hémisynthèse du CBNA à partir de d9-THCA adaptée de Bastola et al., 2007 .....	75
Figure 42 : Réactions d'hémisynthèse avec halogène du CBN à partir de d9-THC d'après Pollastro et al., 2018.....	76
Figure 43 : Structures des endocannabinoïdes .....	77
Figure 44 : Epidyolex, traitement par voie orale de CBD .....	79
Figure 45 : Sativex, traitement par voie buccale de d9-THC et CBD.....	79
Figure 46 : Molécule de FBBS (Fast Blue B Salt) .....	89
Figure 47 : Réaction du DPPH avec un phénol.....	98
Figure 48 : Schéma du principe de la LC-MS/MS.....	101

Figure 49 : Courbes explicatives des formules de maximisation ou minimisation de désirabilité di .....	112
Figure 50 : Schéma méthode TOPSIS .....	116
Figure 51 : Matrices de plan d'expérience à 3 niveaux de 4 à 8 facteurs .....	119
Figure 52 : Fonction de répartition du rendement massique en fonction de la probabilité des 9 traitements (T01 à T09) du DSD sur les extraits de cannabis .....	120
Figure 53 : Fonction de répartition du rendement massique en fonction de la probabilité des 9 traitements (T01 à T09) du DSD avec les moyennes des trois niveaux de température sur les extraits de cannabis .....	121
Figure 54 : Mélangeur Turbula avec le flacon contenant la formulation de CBD+ PROSOLV® .....	122
Figure 55 : Machine de compression FROGERAIS .....	122
Figure 56 : Duromètre Schleuniger-2E .....	124
Figure 57 : Appareil de friabilité APPARATEBAU Erweka .....	124
Figure 58 : Appareil de désagrégation Erweka ZT3 .....	125
Figure 59 : Graphique de la moyenne des masses extraites en fonction du temps de macération à l'éthanol .....	129
Figure 60 : Graphique de la moyenne des masses extraites en fonction du temps d'ultrasons à l'éthanol .....	130
Figure 61 : Graphique de la moyenne des masses extraites en fonction du temps d'ultrasons par bain ou sonde à l'éthanol .....	130
Figure 62 : Graphique de la moyenne des masses extraites en fonction du temps comparant les techniques d'ultrasons seuls à un couplage UAE+SE .....	131
Figure 63 : Graphique de la moyenne des masses extraites en fonction du solvant d'extraction successif .....	131
Figure 64 : Graphique de la moyenne des masses extraites en fonction de la température d'extraction par PLE à l'éthanol (100% en vert, 70% en bleu clair et 30% en bleu foncé) ...	132
Figure 65 : Graphique de la moyenne des masses extraites en fonction de la température d'extraction par micro-ondes à l'éthanol 5 min (bleu), 15 min (rouge) .....	133
Figure 66 : Graphique des rendements massiques obtenus pour les 11 extractions définies et réalisées sur les cônes de houblons .....	134
Figure 67 : Graphique de la teneur en polyphénols (rouge) et flavonoïdes totaux (jaune) pour les 11 extractions réalisées sur les cônes de houblons .....	136
Figure 68 : Graphique de la teneur en chlorophylles totales (vert) et caroténoïdes totaux (orange) pour les 11 extractions réalisées sur les cônes de houblons .....	137
Figure 69 : Chromatogramme HPLC-UV obtenu avec une injection de 10µL de 1mg/mL sur trois extraits différents à 265nm. La phase d'élution était H2O/ACN +0.1% AF pour une durée de 25 minutes. Les chromatogrammes suivants correspondent au SE (rose), au SE triphasique (orange) et PLE 25 (bleu) .....	138

Figure 70 : Spectres de masse MS1 et MS2 de l'humulone à 29.64 min .....	139
Figure 71 : Spectres de masse MS1 et MS2 du xanthohumol à 26.54 min .....	139
Figure 72 : Spectres de masse MS1 et MS2 de la lupulone à 37.12 min .....	139
Figure 73 : Comparaison graphique générale des six teneurs en métabolites dont les $\alpha$ -acides avec l'humulone (vert) et la cohumulone (rouge) ; les $\beta$ -acides avec la lupulone (bleu) et la colupulone (jaune) et les prénylflavonoïdes avec le xanthohumol (violet) et l'isoxanthohumol (noir) obtenus selon les extraits.....	140
Figure 74 : Réseaux moléculaires sur Metgem obtenues à partir de SE (vert), SE triphasique (jaune) ou PLE25 (violet).....	142
Figure 75 : agrandissements des clusters (A, B, C, D) des réseaux moléculaire de Metgem et quelques molécules annotées, selon les bases de données à partir de SE (vert), SE triphasique (jaune) ou PLE25°C (rose).....	143
Figure 76 : Comparaison de désirabilité globale des expériences réalisées en fonction de leurs probabilités. ....	145
Figure 77 : Graphique récapitulatif des rendements d'extractions en fonction des différentes méthodes d'extractions utilisées pour le cannabis .....	147
Figure 78 : Graphique de la teneur en polyphénols (rouge) et flavonoïdes totaux (jaune) pour les 24 extractions réalisées sur les fleurs de cannabis .....	148
Figure 79 : Graphique de la teneur en chlorophylles totales (verte) et caroténoïdes totaux (orange) pour les 24 extractions réalisées sur les fleurs de cannabis .....	150
Figure 80 : Graphique du pouvoir antioxydant par test DPPH pour les 24 extractions réalisées sur les fleurs de cannabis.....	151
Figure 81 : Chromatogramme du mix de standards de cannabinoïdes en LC-MS .....	152
Figure 82 : Heatmap de quantification des cannabinoïdes obtenus pour chaque extrait.....	153
Figure 83 : Histogramme de la concentration en THCA dans les différents extraits.....	153
Figure 84 : Histogramme de la concentration en D9-THC dans les différents extraits .....	154
Figure 85 : Histogramme de la concentration en CBN dans les différents extraits .....	155
Figure 86 : Chromatogrammes LC-UV de l'analyses des standards et des cinq extraits issus des fleurs de cannabis : le mix de standards (bleu foncé), PLE50 (violet), MAE50(5) (rouge), SE 50 EtOH (jaune), Trisphasic SE (vert) et USS+SE (bleu clair) .....	156
Figure 87 : Arbre de fragmentation du d9-THC obtenu avec SIRIUS.....	158
Figure 88 : Explications des fragmentations de la structure et sous-structures (a, b, c, d et e) du d9-THC avec CSI:FingerID.....	159
Figure 89 : Arbre de fragmentation du CBN obtenu avec SIRIUS.....	159
Figure 90 : Explications des fragmentations de la structure et sous-structures (a, b, c, d, e et f) du CBN avec CSI:FingerID.....	160
Figure 91 : Représentations de la PGA2 et des sous-structures valides (vert) et invalides (rouge) par CSI:FingerID .....	163

Figure 92 : Spectre MS2 de l'ion à $m/z$ 333.2403 (vert) comparé à celui de la molécule proposée de CBD (noir).....	163
Figure 93 : Représentation de la structure du CBD et des sous-structures valides (vert) et invalides (rouge) par CSI:FingerID (à gauche) avec la molécule du 6,7 Epoxy-CBG (à droite) .....	164
Figure 94 : Réseaux moléculaires des classes de molécules constituant les extraits de cannabis analysées.....	165
Figure 95 : Affiliations des structures de l'ensemble des molécules annotées par GNPS et SIRIUS (partie 1).....	166
Figure 96 : Affiliations des structures de l'ensemble des molécules annotées par GNPS et SIRIUS (partie 2).....	167
Figure 97 : Réseaux moléculaires obtenus après GNPS et SIRIUS .....	168
Figure 98 : Chromatogramme GC de l'analyse de fleurs THC dominant.....	169
Figure 99 : Chromatogramme GC de l'analyse de fleurs CBD dominant .....	171
Figure 100 : Comparaisons des molécules principales détectées dans les échantillons de fleurs THC (bleu) et CBD (rouge) en GC-MS.....	172
Figure 101 : Plaques CCM de tests de révélateurs FBBS (à gauche) et de phase mobile de C/A 95/5 à 50/50 (à droite) .....	173
Figure 102 : Plaques CCM de comparaison de révélateur FBBS (à gauche) et ANS (à droite) de phase mobile de C/A 90/10 .....	173
Figure 103 : Schéma récapitulatifs de l'ensemble des cinq étapes de séparation sur l'extrait SE0°C EtOH.....	174
Figure 104 : Plaque CCM des fractions de VP1 éluées avec C/A 90/10 .....	175
Figure 105 : Plaque CCM des fractions de VP2 éluées avec C/A 70/30 .....	175
Figure 106 : Plaque CCM des fractions de VP3 éluées avec C/A 90/10 .....	176
Figure 107 : Plaque CCM des fractions de VP4 éluées avec C/A 70/30 .....	176
Figure 108 : Photographie du tube VP4-4 contenant le THCA.....	177
Figure 109 : Plaque CCM des fractions de VP5 éluées avec C/A 70/30 .....	177
Figure 110 : Structure numérotée de la molécule de THCA.....	178
Figure 111 : Structure numérotée de la molécule de d9-THC .....	180
Figure 112 : Structure numérotée de la molécule de d8-THC .....	182
Figure 113 : Agrandissement du spectre RMN HSQC du d8-THC.....	184
Figure 114 : Agrandissement du spectre RMN HMBC du d8-THC.....	184
Figure 115 : Structure numérotée de la molécule de CBN.....	185
Figure 116 : Agrandissement du spectre RMN HSQC du CBN.....	186
Figure 117 : Superposition des spectres RMN 1H des molécules de THCA, d9-THC, d8-THC et CBN identifiées.....	187

Figure 118 : Réaction de formation du CBN à partir du THCA.....	189
Figure 119 : Suivi par CCM de réactions de décarboxylation et formations de CBN et THC à 100°C (à gauche) et 150°C (à droite) éluées dans C/A 70/30.....	189
Figure 120 : Observation de résines avant (gauche) et après (droite) passage à l'étuve à 150°C.....	190
Figure 121 : Graphiques des suivis de décarboxylation des résines exprimant la concentration en métabolites en fonction du temps sur les différentes températures appliquées de 100 °C (rouge), 120 °C (vert), 140 °C (violet), 150 °C (bleu) et 160 °C (noir). .....	190
Figure 122 : Graphique de l'évolution de la constante de cinétique de la concentration en CBN au cours de la décarboxylation en exprimant $-\ln(C_0/C_t)$ en fonction du temps .....	191
Figure 123 : Schéma récapitulatif général des étapes de décarboxylations et séparations à partir d'un extrait de cannabis.....	192
Figure 124 : CCM Suivi de la décarboxylation à 160 °C dans C/A 70/30 .....	193
Figure 125 : CCM récapitulative dans C/A 70/30 après obtention des fractions D3-1 à D3-3' par chromatographie flash.....	193
Figure 126 : CCM des fractions issues de la séparation de D3-1 sur plaque préparative et éluées dans C/A 70/30 (gauche) et photographies des fractions en solution (droite).....	194
Figure 127 : CCM des fractions issues de la séparation de D3-1-D sur plaque préparative et éluées dans 70/30 C/A (gauche) et photographies des fractions D3-1-D-c et D3-1-D-e en solution.....	194
Figure 128 : Réaction d'hémisynthèse du CBN à partir du THCA .....	195
Figure 129 : CCM du suivi de la réaction de décarboxylation oxydative avec I2 dans C/A 70/30 .....	195
Figure 130 : CCM des fractions issues de la séparation de DIF par chromatographie flash et élué dans C/A 70/30.....	196
Figure 131 : Plaque préparative de DIF-12 après double élution 95/5 C/A et révélations sous UV à 254nm (gauche) et à l'ANS (droite).....	196
Figure 132 : CCM des fractions issues de la séparation de DIF-12 sur plaque préparative et éluées dans C/A 70/30 (gauche) et photographies des fractions en solution (droite).....	197
Figure 133 : Comparaison des traitements expérimentaux d'après leurs désirabilités globales obtenus pour les extraits de fleurs de THC.....	198
Figure 134 : Tableau et graphique des scores pour les données de traitements T01 à T09 pondérées issus d'extractions de cannabis en bioréacteur.....	201
Figure 135 : Tableau et graphique des scores pour les données de traitements T01 à T09 non pondérées issus d'extractions de cannabis en bioréacteur .....	201
Figure 136 : Tracés des effets principaux du plan d'expérience exprimant les rendements massiques en fonction des différents facteurs et niveaux.....	203
Figure 137 : Tracés des effets principaux du plan d'expérience exprimant TPC (à gauche) et TFC (à droite) en fonction des différents facteurs et niveaux.....	203

Figure 138 : Tracés des effets principaux du plan d'expérience exprimant la TCC en fonction des différents facteurs .....	204
Figure 139 : Tracés des effets principaux du plan d'expérience exprimant le teneur antioxydant en fonction des différents facteurs .....	204
Figure 140 : Tracés des effets principaux du plan d'expérience exprimant les concentrations en THCA (en haut), en THC (en bas à gauche) et en CBN (en bas à droite) en fonction des différents facteurs et niveaux.....	205
Figure 141 : Comprimés obtenus lors des essais de compression 1 à 7 pour le PROSOLV® seul .....	208
Figure 142 : Etat de désagrégation des comprimés PROSOLV® après 2 min.....	209
Figure 143 : Observation de la fracture diamétrale sur un des comprimés PROSOLV® dans le duromètre .....	210
Figure 144 : Etat du mélange de terpènes + Aérosil 300 (silice colloïdale) après adsorption .....	211
Figure 145 : Aspect des comprimés de PROSOLV®+ primellose + aspartame+ terpènes après sortie de machine de compression .....	212
Figure 146 : Observation de la fracture diamétrale sur un des comprimés PROSOLV®+ Primellose + Aspartame+ Terpènes dans le duromètre .....	213



## Table des tableaux

---

Tableau 1 : Composition chimique moyenne des cônes séchés de <i>Humulus lupulus</i> L. ....	40
Tableau 2 : Récapitulatif de la composition chimique des feuilles, tiges, racines et graines selon les études précédentes .....	63
Tableau 3 : Listes non exhaustives d'extractions et de leurs conditions expérimentales réalisées sur des inflorescences de cannabis.....	68
Tableau 4 : Rendements massiques obtenus après les 11 extractions réalisées sur les cônes de houblons broyés .....	88
Tableau 5 : Rendements massiques obtenus après les 24 extractions réalisées sur les fleurs de cannabis (lot « THC dominant » ) .....	88
Tableau 6 : Récapitulatif des Rf des standards d9-THC, d8-THC et CBN.....	89
Tableau 7 : Masse (en mg) des fractions obtenues lors de la séparation VP1 .....	90
Tableau 8 : Masse (en mg) des fractions obtenues lors de la séparation VP2 .....	91
Tableau 9 : Masse (en mg) des fractions obtenues lors de la séparation VP3.....	91
Tableau 10 : Masse (en mg) des fractions obtenues lors de la séparation VP4 .....	91
Tableau 11 : Masse (en mg) des fractions obtenues lors de la séparation VP5 .....	91
Tableau 12 : Gradient utilisé pour la séparation des résines décarboxylée en MPLC.....	92
Tableau 13 : Masse (en mg) des fractions obtenues à la suite de la séparation DIF .....	92
Tableau 14 : Masse (en mg) des fractions obtenues à la suite de la séparation DIF-I12 .....	93
Tableau 15 : Masse (en mg) des fractions obtenues à la suite de la séparation D3.....	93
Tableau 16 : Masse (en mg) des fractions obtenues lors de la séparation de D3-1 .....	93
Tableau 17 : Masse (en mg) des fractions obtenues lors la séparation de D3-1-D .....	93
Tableau 18 : Résultats de teneurs en cannabinoïdes des résines après décarboxylation et en fonction des différentes températures appliquées.....	95
Tableau 19 : Récapitulatif des teneurs en TPC, TFC, TCC et TCCa pour <i>Humulus lupulus</i> L. ....	99
Tableau 20 : Récapitulatif des dosages colorimétriques sur les extraits de cannabis en triplicat (TCPC/TFC/TCC/TCCa/DPPH).....	99
Tableau 21 : Paramètres MS/MS des précurseurs spécifiques du houblon pour la quantification .....	102
Tableau 22 : Quantification des composés caractéristiques du houblon dans les différents extraits obtenus : isoxanthohumol (IX), xanthohumol (XN), cohumulone (CoHu), humulone (Hu), colupulone (CoLp), lupulone (Lp), Hydroxytricyclocolupone (HtCoLp) et Hydroxytricyclolupone (HcLp).....	102
Tableau 23 : Paramètres MS/MS des précurseurs spécifiques du cannabis pour la quantification .....	103



Tableau 24 : Quantification des composés caractéristiques du cannabis dans les différents extraits obtenus.....	103
Tableau 25 : Banques de données utilisées pour l'annotation par GNPS .....	109
Tableau 26 : Résumé des conditions imposées lors de l'approche statistique et de l'expression de leurs valeurs de désirabilité pondérées (dnWn) pour les traitements du houblon .....	113
Tableau 27 : Désirabilité globale (dg) de chaque extraction du houblon et leur classement, ainsi que les probabilités associées à ces classements.....	113
Tableau 28 : Résumé des conditions imposées lors de l'approche statistique et de l'expression de leurs valeurs de désirabilité pondérées (dnWn) pour les traitements cannabis .....	114
Tableau 29 : Désirabilité globale (dg) de chaque extraction du cannabis et leur classement, ainsi que les probabilités associées à ces classements.....	115
Tableau 30 : Paramètres et résultats du l'analyse des traitements par la méthode TOPSIS pour les extraits de cannabis .....	118
Tableau 31 : Facteurs et niveaux définis pour le plan d'expérience .....	119
Tableau 32 : Matrice de 4 facteurs à 3 niveaux traduit avec nos paramètres à étudier .....	120
Tableau 33 : Masse des formes pharmaceutique selon la monographie 2.9.5.....	123
Tableau 34 : Résultats des annotations de molécules après analyses par SIRIUS, ZODIAC et CSI:FingerID.....	161
Tableau 35 : Résultats des classes proposées pour les formules annotées par CANOPUS .....	162
Tableau 36 : Molécules identifiées par spectrométrie de masse couplée à la GC pour la fleur THC dominant.....	170
Tableau 37 : Molécules identifiées par spectrométrie de masse couplée à la GC pour la fleur CBD dominant.....	171
Tableau 38 : Déplacements chimiques permettant la détermination structurale du THCA ..	179
Tableau 39 : Déplacements chimiques permettant la détermination structurale du d9-THC .....	181
Tableau 40 : Déplacements chimiques permettant la détermination structurale du d8-THC .....	183
Tableau 41 : Déplacements chimiques permettant la détermination structurale du d8-THC .....	185
Tableau 42 : Matrice de 4 facteurs à 3 niveaux traduit avec nos paramètres à étudier .....	199
Tableau 43 : Résultats des neuf traitements expérimentaux réalisés en bioréacteur pour chacun des réponses étudiées .....	200
Tableau 44 : Récapitulatif des objectifs, importances et des meilleurs et mauvais traitements pour chacun des réponses du DSD sur l'extraction en bioréacteur (ND = Non déterminé) .	202

Tableau 45 : Synthèse des objectifs et traitements optimaux pour une réponse donnée d'après les tracés d'effets principaux .....	206
Tableau 46 : Récapitulatif des essais de compression réalisés manuellement pour le réglage de la machine .....	207
Tableau 47 : Relevé des masses des 20 comprimés PROSOLV® .....	208
Tableau 48 : Valeurs de résistance obtenues .....	210
Tableau 49 : Relevé des masses des 20 comprimés PROSOLV®+ Primellose + Aspartame+ Terpènes .....	212
Tableau 50 : Valeurs de résistance obtenues pour .....	213
Tableau 51 : Comparaison de l'ensemble des comprimés sublinguaux réalisés .....	214



# Introduction





## Introduction

---

*Cannabis sativa* L. (ou cannabis) est une plante annuelle herbacée appartenant à la famille des Cannabacées. Cette plante possède de nombreuses propriétés parmi les suivantes : analgésiques, anesthésiques et sédatives (narcotiques). Son utilisation est illicite puisque cette plante est classée dans l'annexe I des stupéfiants (Arrêté du 22 février 1990). Ces propriétés proviennent de la présence de métabolites secondaires comme les cannabinoïdes, essentiellement concentrés dans les inflorescences et plus précisément dans des trichomes glandulaires à leurs surfaces (Pacher et al., 2006). Les propriétés psychoactives sont induites par le  $\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol, communément appelé THC. De nombreux autres cannabinoïdes sont également présents tels que le cannabidiol (CBD), le cannabigérol (CBG), ou encore le cannabinal (CBN). Ils peuvent être sous leurs formes acides ou neutres (décarboxylées). Les formes acides sont produites par la plante et subissent ensuite les réactions amenant aux formes décarboxylées actives. Ces transformations provoquent une instabilité de préparation à base de cannabis, d'où les problèmes de conservation et de reproductibilité dans les traitements. La volonté de formuler des préparations à base de ces molécules nécessite donc une compréhension et un contrôle de ces réactions. Il est important de relever également que la biodisponibilité des cannabinoïdes au sein de l'organisme est un enjeu actuel (Perucca and Bialer, 2020). Cela permettrait d'augmenter l'efficacité des traitements possibles et d'en réduire les coûts financiers. De plus, un effet d'entourage augmentant la biodisponibilité par la présence des terpènes produits de la plante a été démontré dans la littérature (Russo, 2011). Il est donc également important d'étudier les autres types de métabolites secondaires extraits en plus des cannabinoïdes d'intérêts.

Dans le contexte actuel de légalisation mondiale progressive de l'usage récréatif et/ou thérapeutique, l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) a démarré une expérimentation autour du cannabis à usage thérapeutique en France depuis mars 2021. Les utilisations thérapeutiques du cannabis s'effectuent sous conditions strictes et imposées pour certaines pathologies, et les formes pharmaceutiques produites doivent avoir des ratios THC/CBD spécifiques.

Le premier objectif de la thèse a été de développer et d'améliorer des techniques d'extraction adaptées pouvant être classiques ou alternatives telles que SE / ASE / MAE / UAE (Sanz et al., 2022; Tiago et al., 2022) dans le but de transférer celles-ci à l'échelle pilote puis industrielle. Il s'est ainsi avéré nécessaire de privilégier les méthodes d'éco-extraction. Le second objectif a été d'identifier et de quantifier les molécules d'intérêt de la plante par techniques analytiques impliquant des couplages avec des techniques chromatographiques tout en envisageant une approche déréplicative impliquant la construction des réseaux moléculaires (Citti et al., 2019). Le troisième objectif a été d'étudier et de contrôler la stabilité des molécules extraites en fonction des techniques extractives utilisées via les résultats des méthodes analytiques. Ce qui concerne en particulier l'étude des réactions de décarboxylation primordiales au sein des cannabinoïdes. Enfin, la finalité des travaux a été de proposer et de développer des formes galéniques augmentant la biodisponibilité des molécules telles que le THC ou le CBD au sein de l'organisme.

Une problématique d'accès aux fleurs de *Cannabis Sativa* L. a orienté le développement des protocoles sur une autre plante. Le choix du houblon (*Humulus lupulus* L.) est apparu légitime comme plante modèle par rapport au Cannabis puisque c'est une plante dicotylédone grimpante appartenant également à la famille des Cannabacées.

Les propriétés de conservation et d'amertume notamment utilisées pour la fabrication de la bière (Almaguer et al., 2014) sont directement liées à des molécules spécifiques du houblon comme les acides  $\alpha$  (ex : humulone) et  $\beta$  (ex : lupulone) ou encore de flavonoïdes prénylés tels que le xanthohumol (Stevens et al., 1999). Ces molécules sont régies tout comme celles du Cannabis à des réactions d'isomérisation, de réarrangement ou de dégradation en fonction du temps, de la température ou de la présence d'oxygène. Le houblon est également une plante facile d'accès en qualité pharmaceutique (cônes séchées) et à un coût financier raisonnable (quelques dizaines d'euros par kilo).

De plus, il a été envisagé de se diriger vers des solvants « verts », directement liés aux principes de l'éco-extraction. En effet, il est recherché en premier lieu d'utiliser des solvants dits alternatifs aux solvants indésirables, facilement utilisables et réutilisables, sans impact néfaste pour l'environnement ni toxicité pour l'homme. Les agro solvants tels que l'éthanol ou l'eau seront privilégiés pour la réalisation de produits pharmaceutiques. Des essais ont été réalisés avec des solvants organiques tels que le cyclohexane afin d'avoir des comparaisons par rapport à l'éthanol.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse sont présentés en deux parties dans ce manuscrit. La première partie est axée sur la mise au point des méthodes extractives à partir des cônes de houblons. Elle s'est focalisée sur une comparaison des rendements d'extractions, des teneurs totales en métabolites et leurs quantifications en fonction des techniques utilisées, ce qui a conduit à la construction des réseaux moléculaires. Une optimisation des méthodes extractives a été réalisée à l'aide une analyse statistique descriptive.

La seconde partie concerne les travaux effectués sur les fleurs de Cannabis. L'étude réalisée pour ce projet de thèse s'est portée sur des cultivars de plants de Cannabis à teneur élevée en THC (de l'ordre de 15%) et faible en CBD destinés à l'usage en recherche et développement pharmaceutique.

Une application de l'ensemble des techniques mises au point sur le houblon a été transférée sur le cannabis. Afin d'accéder aux cannabinoïdes d'intérêt, des étapes de séparations et purifications ont été entreprises à partir des extraits obtenus précédemment. Des élucidations structurales ont été effectuées par des analyses en RMN 1D et 2D et par HR-ESI-MS sur les différents extraits et fractions. Le profil des composés volatiles des fleurs de cannabis a été déterminé par HS-GC-MS/MS. Pour son intérêt croissant en applications thérapeutiques, l'accès au CBN (un produit de dégradation du THC) a pu être accentué par décarboxylation oxydative ou par hémisynthèse. L'optimisation des méthodes extractives a été étudiée par analyse statistique (méthode TOPSIS) et plan d'expérience (DSD). Enfin, une étape de faisabilité de formulation galénique a été réalisée avec le Prosolv comme excipient.

Partie I  
*Humulus lupulus* L.







## Partie I. *Humulus lupulus* L.

### I.1. Structure et morphologie végétale

*Humulus lupulus* L., communément appelé houblon, est une espèce de plante à fleurs appartenant à la famille des Cannabacées et de l'ordre des Rosales.

Son nom provient du latin *Humus* traduit par terre douce et fraîche pour signifier ses terrains de préférences. Et *lupulus* fait référence directement au loup, car selon des écrits de Pline l'ancien dans *Historia Naturalis*, le houblon de l'époque avait tendance à étouffer les autres plants autour de lui lors de son développement (Stannard, 1982). Il se développe dans des haies et lieux frais dans toute la France. Il est réparti sur tous les continents avec des milieux tempérés. Sa floraison se produit entre juin et septembre.

C'est une plante vivace à tige herbacées, rameuses et sarmenteuse-volubiles (tiges ou rameaux ligneux nécessitant un appui). Elle peut atteindre des tailles allant de 2 à 5 mètres de hauteur. Les feuilles sont pétiolées, opposées et palmatilobées en cœur. Elles sont décomposées en 3 à 5 lobes ovales et dentées et les feuilles supérieures sont souvent simples (feuilles non composées ou ramifiées) par rapport aux autres. Les fleurs de la plante sont d'une couleur vert-jaunâtre et dioïque. Les fleurs mâles à étamines et les fleurs femelles à pistil sont sur deux pieds différents. Les fleurs mâles sont en grappes rameuses. Le périanthe mâle (enveloppe florale) est divisé en 5 parties égales et contenant 5 étamines à filets courts. Les femelles possèdent un ovaire à deux carpelles et deux styles filiformes. Ces fleurs sont en formes de cônes pendants et ovales, opposés et en pédoncules. Elles sont positionnées à l'aisselle et entourées par des bractées (écailles foliacées) et bractéoles, ce qui forme les cônes (Coste, 1937).

Des poils glandulaires épidermiques, appelés trichomes, sécrètent et stockent les métabolites secondaires de la plante (Stevens and Page, 2004). Ces parties sont généralement jaunâtres communément appelées glandes à lupuline (Almaguer et al., 2014). Les fruits sont des akènes de formes ovoïde-comprimés et couverts de glandes jaunes aromatiques.



Figure 1 : Illustration des cônes et feuilles de *Humulus lupulus* L. par le botaniste Hippolyte Coste (à gauche) et photographies d'un cône coupé et des glandes à lupuline (à droite) .

## I.2. Histoire et cultures

### I.2.1. Les origines du houblon

*Humulus lupulus*, ou houblon, serait à l'origine chinoise (Murakami et al., 2006). Selon l'étude phylogénétique, la souche originelle remonterait à plusieurs millions d'années (traces de pollens et fossiles) et serait issues du nord ou du centre de la Chine. Le houblon aurait ensuite été exporté dans le Caucase et en Europe et parallèlement dans le sud de la Chine et au Japon, tout ceci avant d'arriver aux Etats-Unis.

Concernant son utilisation dans la bière, son origine exacte reste plutôt floue. Néanmoins, l'histoire de la bière peut permettre de comprendre à partir de quelle époque ont été incorporés le houblon et ses métabolites aux propriétés spécifiques. Le procédé de brassage nécessite l'usage de levures (plus précisément de *Saccharomyces*) tout comme la fabrication du pain. Autrement dit, des hypothèses avancent que les deux seraient liés et donc leurs origines communes ou proches. Des traces de brassage de la bière ont été retrouvées en Egypte et en Mésopotamie aux environ de -5000 ans avant J-C. Et l'Egypte était reconnu comme un exportateur au sein des régions autour de la méditerranée aux environ de -1000 avant J-C. (Hornsey, 2003). A cette époque, il se posait des problèmes de conservation de la bière puisque le houblon n'était pas encore incorporé dans sa recette.

Ce n'est qu'à l'ère romaine, entre -30 av J-C et 480 après J-C., que le houblon a été utilisé dans la bière (Wilson, 1975). Des années plus tard, en l'an 736, il fut mentionné pour la première fois de son usage dans le procédé de brassage. Sa référence provient d'un document de monastère de la région de Hallertau en Allemagne. Des demandes de cueillettes ont également été rapportées par des abbés de Grande-Bretagne en 820. La culture du houblon s'était popularisée depuis les années 850 en Allemagne. Hildegarde de Bingen, abbesse et naturaliste d'origine allemande, a réalisé en 1150 des écrits (« *Liber simplicis medicinae* ») sur le brassage de la bière. Elle est la première à faire mention de l'utilisation de ce dernier pour ses propriétés antibiotiques et donc de conservation primordiale. (DeLyser and Kasper, 1994). Même si les propriétés ont pu être décrites, il est important de relever qu'aucune mention n'a été faite sur le type de houblon utilisé (sauvage ou cultivé).

Au XVII<sup>ème</sup> siècle, la culture du houblon a été importée par les colons anglais en Amérique du Nord aux cours de leurs différents voyages. La première production de houblon cultivé a vu le jour pour subvenir aux besoins de brasseries au milieu de ce siècle, en Massachusetts. (Edwardson, 1952).

En dehors de son utilisation dans la bière, des propriétés thérapeutiques ancestrales sont admises au houblon (antimicrobiennes, anticancéreuses etc.) dont ses effets sédatifs. Les traitements à base d'huile, d'infusion et d'inhalation des houblons sont proposés pour traiter des troubles du sommeil ou de l'anxiété. Les cônes sont les parties essentiellement utilisées (Zanoli and Zavatti, 2008).

Des valorisations de la fibre de houblon ont également été rapportées pour la fabrication de textiles ou de cordes. En effet, le houblon appartient à la même famille des Cannabacées que le chanvre industriel destiné aux mêmes usages. L'utilisation des fibres a donc largement été étudié et des propriétés légèrement inférieures ou équivalentes à celle du chanvre ont été trouvées (Limousin et al., 2023).

## I.2.2. La production mondiale

L'ensemble des données présentées ont été obtenues sur le site de la commission européenne ("Houblon - Commission européenne", 2022).

La production du houblon s'élève à 50 000 t/an et avec celle d' $\alpha$ -acides de 5000 t/ an. La production de houblons décline au fur et à mesure des années puisque les consommateurs contrôlent le marché et se dirigent vers des bières moins amères, nécessitant donc moins d' $\alpha$ -acides. De nos jours, la concentration d' $\alpha$ -acides est de 4,1 g par hectolitre de bière contre 6,3 g en 1995.

Il existe plus de 2600 exploitations agricoles cultivant du houblon en Europe. La superficie de culture s'étend sur plus de 28 000 hectares, au sein de 14 pays de l'UE et elle représente 60% de la culture mondiale de houblon. L'Allemagne est le pays le premier producteur au niveau européen : plus de 20 000 hectares, ainsi qu'une représentation de 33% de la superficie mondiale.

De plus la majorité du houblon européen est destiné à l'exportation, fournissant principalement les Etats-Unis, la Russie et le Japon.

En France, neuf régions se partagent sa culture : le Grand-Est, les Hauts-de-France, la Nouvelle-Aquitaine, la Bretagne, les Pays de la Loire, la Normandie, l'Île-de-France, l'Auvergne-Rhône-Alpes et la Bourgogne-Franche-Comté. Le pays est classé en cinquième position derrière l'Allemagne, la république Tchèque, la Pologne et l'Espagne avec 92 fermes, 548 hectares et 711 t/ an de production.

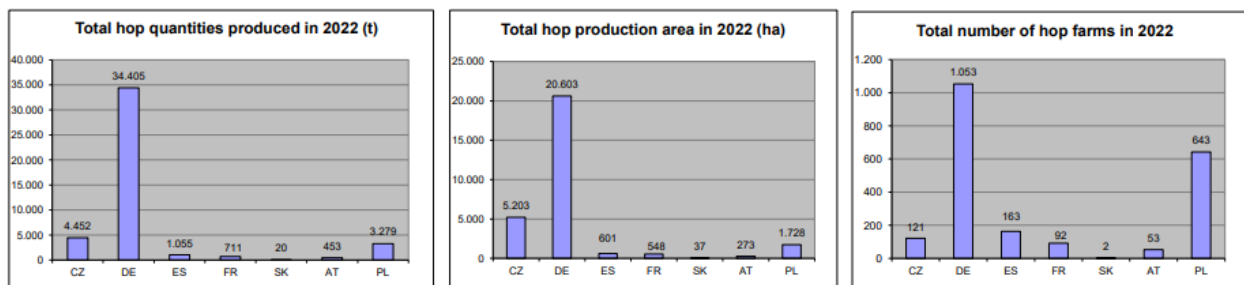


Figure 2 : Graphique sur la récolte et la production du houblon provenant du rapport 2022 de la commission européenne

### I.3. Métabolites d'intérêts

#### I.3.1. Composition chimique

Les cônes de houblons séchés ont été étudiés en terme de composition chimique (Benitez et al., 1997). La proportion totale de métabolites d'intérêts dans les résines est d'environ 15 à 30%.

Tableau 1 : Composition chimique moyenne des cônes séchés de *Humulus lupulus* L.

	Pourcentage (m/m)
$\alpha$ -acides	2 à 17
$\beta$ -acides	2 à 10
Acides aminés	0.1
Cendres	40 à 50
Monosaccharides	2
Lipides	1 à 5
Pectines	2
Polyphénols (tannins)	3 à 6
Protéines	15
Huile essentielle	0.5 à 3 (v/m)
Humidité	8 à 12

Le houblon est une plante étudiée depuis de nombreuses années et des centaines de métabolites primaires et secondaires ont pu être identifiés et isolés. Parmi les voies métaboliques de synthèse de ces derniers, l'étude synthétique de Bocquet et al. s'avère être la plus récente et complète. Les voies avec l'ensemble de leurs composants tels que les lignanes, stilbènes, flavonoïdes, phloroglucinols et terpènes y sont entièrement développés en annexe 1 (Bocquet et al., 2018).

#### I.3.2. Terpènes

Les terpènes constituent un vaste groupe d'hydrocarbures synthétisés à partir d'unités isoprènes. Ils sont classés en fonction du nombre d'unités d'isoprène et sont généralement présents dans les huiles essentielles. Les terpénoïdes sont des formes modifiées de terpènes qui ont été altérées chimiquement par oxydation ou réarrangement de leur structure moléculaire. Ces modifications peuvent entraîner la formation de groupes fonctionnels, tels que des alcools, des aldéhydes et des cétones, qui contribuent à l'arôme et à la saveur de la plante.

Les terpènes présents dans les extraits et huiles essentielles du houblon sont essentiellement constitués de monoterpènes, sesquiterpènes et de composés terpéniques oxygénés. Des triterpénoïdes ont également été identifiés. En 1981, Sharpe et Laws proposent une classification des différents terpènes étudiés dans les huiles essentielles. Elle est divisée en trois parties : les hydrocarbures (monoterpènes, sesquiterpènes et hydrocarbures aliphatiques), les composés oxygénés (monoterpènes et sesquiterpènes oxygénés et autres.) et composés soufrés (thioesters, sulfures et autres composés soufrés). (Sharpe and Laws, 1981). Les hydrocarbures (monoterpènes et sesquiterpènes) représentent environ 60 % des

terpènes totaux et leurs composés oxygénés spécifiques jusqu'à 30% (Rutnik et al., 2022). Les classes des composés terpéniques les plus étudiés sont présentées ci-dessous.

Parmi les composés non oxygénés, le myrcène, l' $\alpha$  et  $\beta$ -pinène, le limonène et l' $\alpha$  et  $\beta$ -phéllandrène sont admis dans les monoterpènes. Alors que le  $\beta$ -caryophyllène, l' $\alpha$ -humulène, l' $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$ -sélinène, l' $\alpha$  et  $\beta$ -farnésène, le  $\gamma$ -élémente et le  $\gamma$ -gurjunène sont dans les sesquiterpènes.

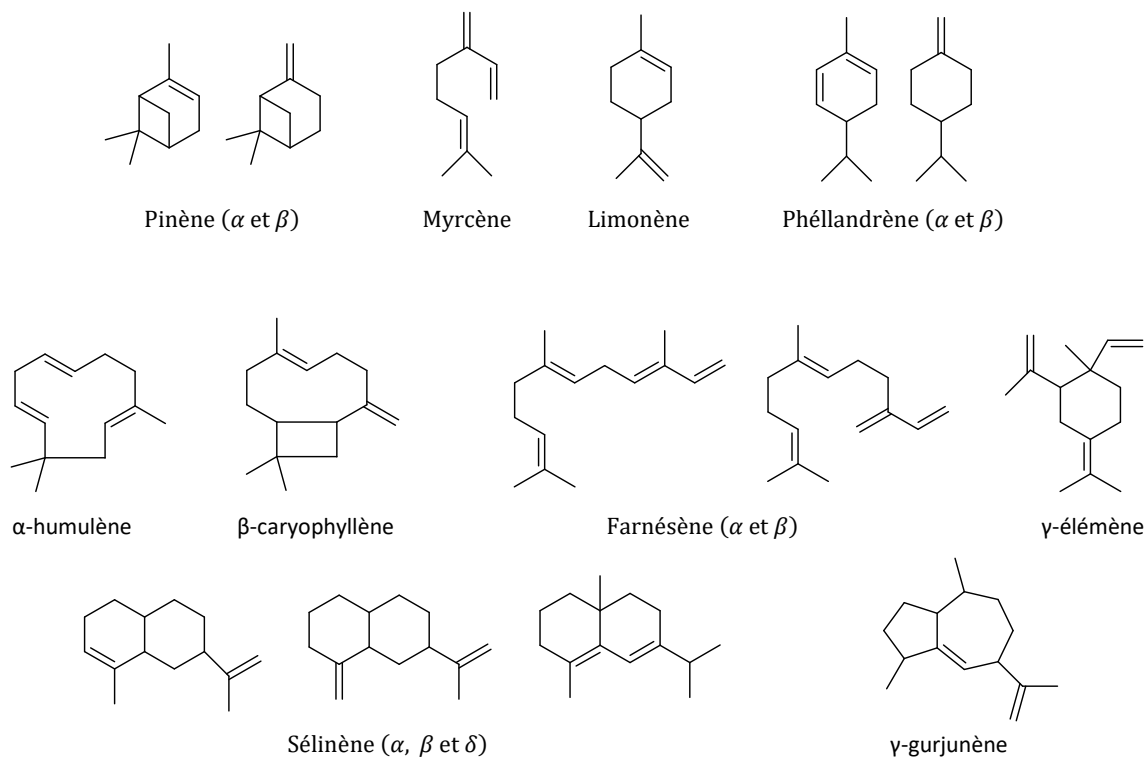


Figure 3 : Structures de quelques monoterpènes et sesquiterpènes majoritaires du houblon

Parmi les composés oxygénés, le géraniol, le myrcénol et le linalol représentent les monoterpénoïdes. Les sesquiterpénoïdes sont quant à eux essentiellement composés d'alcools et d'époxydes. Le bisabol ( $\alpha$  et  $\beta$ ), le cadinol ( $\alpha$  et  $\tau$ ), le caryophyllène d'alcool, l'eudesmol ( $\gamma$  et  $\beta$ ) et le spathuléol composent les alcools. Les époxydes sont l'oxyde de caryophyllène, de limonène ou d'humulène (I et II).

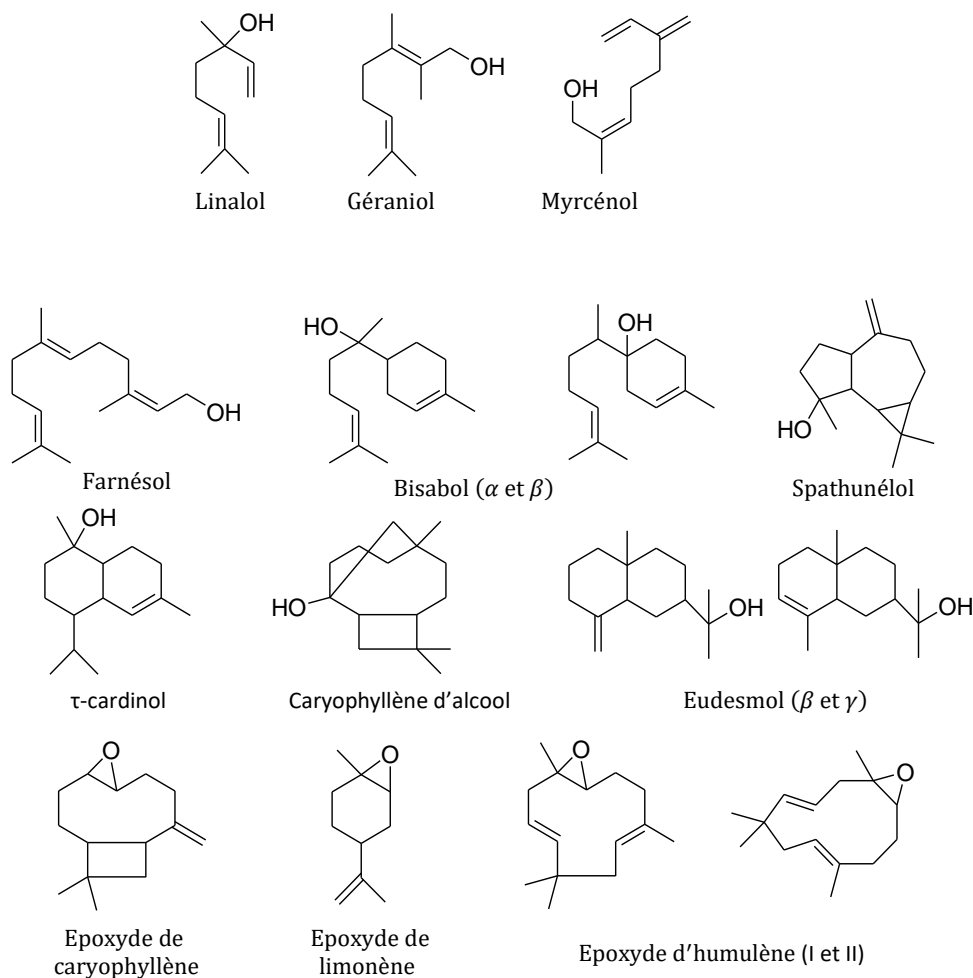


Figure 4 : Structures de quelques composés oxygénés (alcool et époxydes) du houblon

### I.3.3. Polyphénols

Les polyphénols sont une classe de molécules naturelles que l'on retrouve couramment dans les plantes. Leurs structures chimiques reposent sur des phénols : un ou plusieurs cycles aromatiques portant des fonction hydroxyles (-OH). Ces cycles peuvent être reliés entre eux et porter d'autres fonctions. Ils sont ainsi reconnus pour leurs propriétés anti-oxydantes. Cette classe est divisée en différentes familles : les flavonoïdes, les stilbènes, les lignanes et les acides phénoliques.

Les flavonoïdes, appartenant aux polyphénols, sont le groupe le plus étudié que l'on retrouve aussi bien dans les plantes que dans les préparations à base de ces dernières (thé, café, vin etc.). Ils constituent une grande famille de composés naturels largement répandus

dans le règne végétal. Ils jouent des rôles importants, notamment dans la pigmentation, la défense contre le stress environnemental et l'interaction avec les pollinisateurs. Ce groupe est lui-même divisé en sous-classes : notamment les chalcones, les anthocyanines, les flavanones, les flavones, les flavonols et les isoflavones.

Les chalcones sont les premiers métabolites de la voie des flavonoïdes à être biosynthétisés et permettant la biosynthèse du reste des composés. Le xanthohumol et le desmethyl xanthohumol sont les deux chalcones prénylés essentiellement retrouvés dans le houblon.

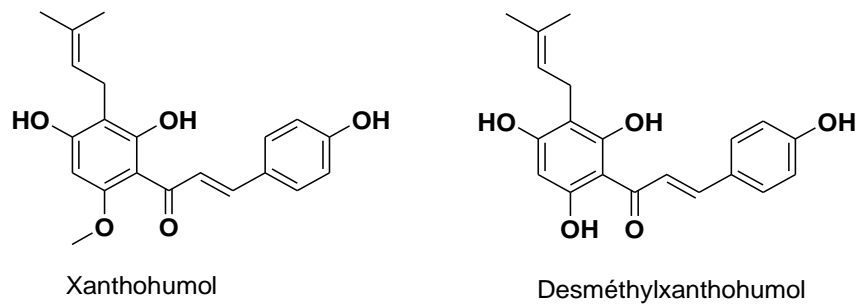


Figure 5 : Structures des chalcones prénylés du houblon

Les flavanones sont quant à elles issues de l'isomérisation des chalcones et d'une cyclisation. L'isoxanthohumol, la 6 et 8 prénylnaringénine en sont les principaux constituants qui sont aussi prénylés.

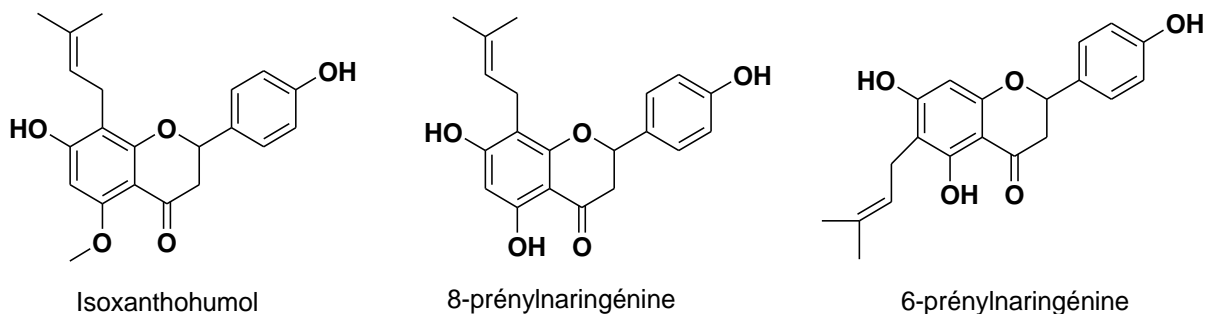


Figure 6 : Structures des flavanones du houblon

Parmi les flavonols et les flavan-3-ols seront retrouvés respectivement pour le premier : la quercétine, le kaempferol, l'astragaline, la quercitrine et l'isoquercitrine ; et pour le second : la catéchine (et son isomère l'épicatéchine), la gallocatéchine et les procyanidines.



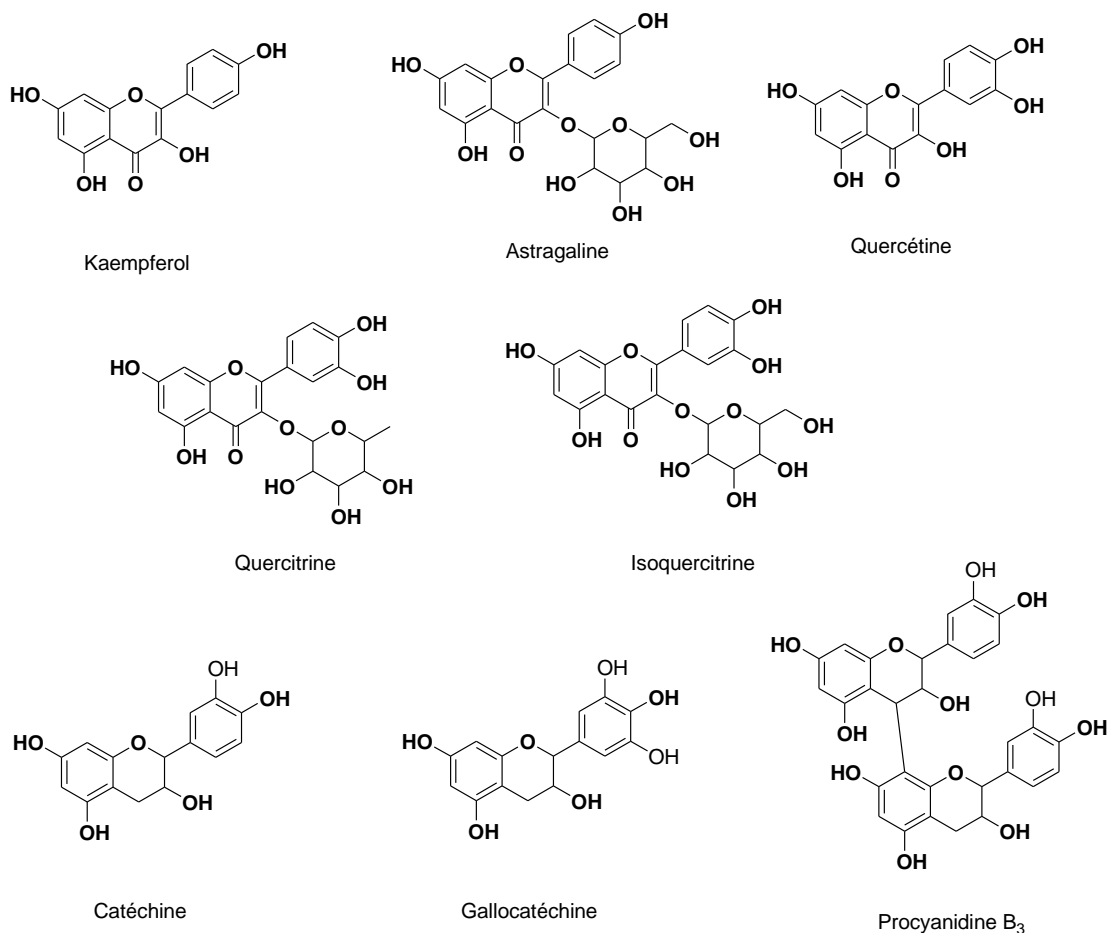


Figure 7 : Structures de flavonols et flavan-3-ols du houblon

Les flavonoïdes prénylés sont uniques au houblon (Xanthohumol et isoxanthohumol). Il a été démontré qu'ils contribuent à l'arôme et à la saveur de la bière. (Stevens and Page, 2004). Ils sont également importants pour la stabilité du produit final, car ils protègent contre l'oxydation et d'autres formes de dégradation. Des études ont suggéré que ces composés avec les autres flavonoïdes pouvaient avoir des effets anti-inflammatoires, antioxydants et antiprolifératifs (Venturelli et al., 2016).

Une autre famille des composés est également présente, il s'agit du phloroglucinol et ses dérivés (prénylés et glycosylés). Le phloroglucinol est le précurseur des acétylphloroglucinols.

Les dérivés prénylés des phloroglucinols sont les  $\alpha$ -acides et  $\beta$ -acides. Ce sont des molécules spécifiques du houblon et dont les propriétés sont essentiellement utilisées à travers la fabrication de la bière ou des huiles essentielles. L'humulone appartient aux  $\alpha$ -acides et la lupulone aux  $\beta$ -acides. Chacun de ces acides possèdent une chaîne alkyl (notée R) qui détermine les préfixes et le nom de la molécule. Par exemple, R = CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> pour l'humulone et R = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> pour le cohumulone.

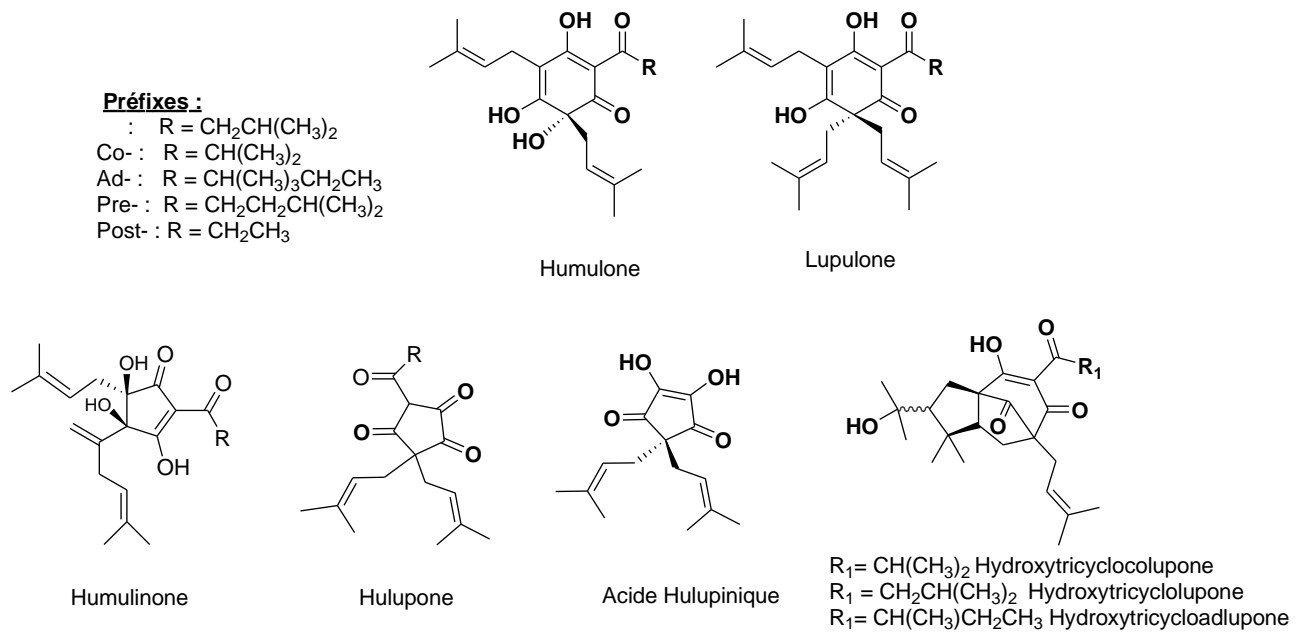


Figure 8 : Structures des α-acides et β-acides et leurs dérivés

Les acides phénoliques sont présents dans le houblon avec des molécules tels que l'acide cinnamique et ses dérivés (acide caféique, coumarique et férulique) ou bien l'acide benzoïque et ses dérivés (acide gallique, vanillique et hydroxybenzoïque). Des dérivés sous forme d'hétérosides ont également été observés.

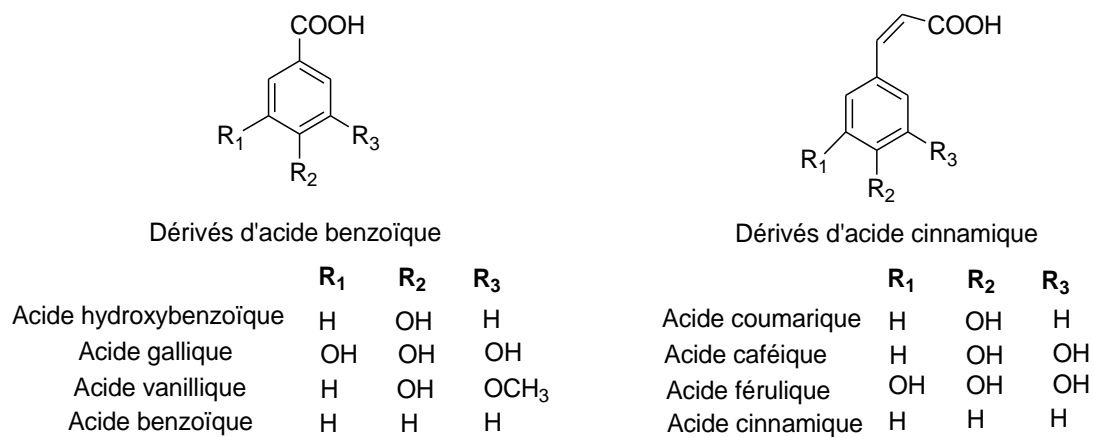


Figure 9 : Structures des acides phénoliques et leurs dérivés du houblon

### I.3.4. Pigments photosynthétiques

Les pigments photosynthétiques sont, dans le règne du végétal, des molécules qui permettent d'absorber la lumière et de convertir une énergie lumineuse en énergie chimique par le biais de la photosynthèse. Les principaux pigments que l'on retrouve sont la chlorophylle a, la chlorophylle b et les caroténoïdes (Telichowska and Kobus-Cisowska, 2020).

La chlorophylle a absorbe plus efficacement la lumière dans les parties du spectre de la lumière correspondant aux longueurs d'onde à 430 et 660 nm. La chlorophylle b quant à elle absorbe la lumière aux longueurs d'onde de 445 et 645 nm. Ces deux chlorophylles sont toutes deux synthétisées par la plante et se situent dans les chloroplastes. Elles possèdent toutes deux une structure similaire mais une composition de légère différence qui se traduit par la différence d'absorption des longueurs d'onde de la lumière entre a et b (Pai and Nair, 2015). La chlorophylle est dotée des propriétés suivantes : antioxydantes permettant de protéger l'organisme face à des radicaux libres, anti-inflammatoires et cicatrisantes pour les plaies. (Pokorný et al., 2013).

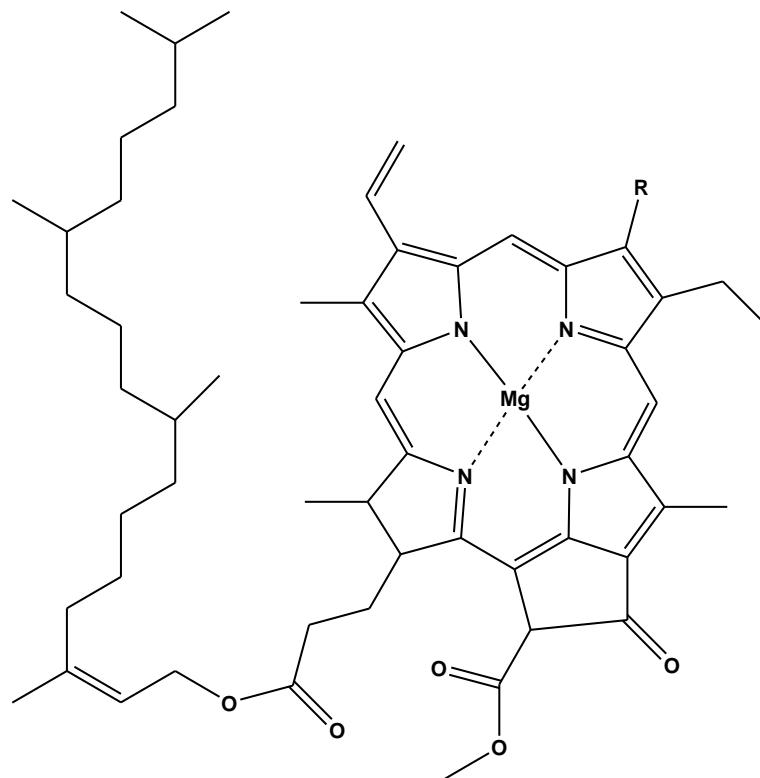


Figure 10 : Molécule de chlorophylle avec R= CH<sub>3</sub> pour la chlorophylle a et R=CHO pour la chlorophylle b

Enfin, les caroténoïdes sont les pigments à l'origine des couleurs jaune, orange et rouges de nombreux fruits et fleurs. En plus de capter de l'énergie lumineuse au cours de la photosynthèse et d'interagir avec les chlorophylles a et b, ils agissent comme antioxydants au sein du végétal afin de le protéger des rayons UV et radicaux libres (Havaux and Niyogi, 1999). Les caroténoïdes peuvent également améliorer l'hydratation de la peau, favoriser la cicatrisation des plaies et stimuler la production de collagène et d'élastine en activant les fibroblastes (Wisniewska et al., 2006).

Il existe plusieurs caroténoïdes dont les carotènes (par exemple l'alpha et bêta-carotène) et les xanthophylles (lutéine ou zéaxanthine). Néanmoins leurs structures chimiques sont très proches et les xanthophylles sont oxygénés. Ils sont constitués d'une chaîne d'hydrocarbures avec de nombreuses liaisons conjuguées qui leurs attribuent leurs capacités d'absorption de la lumière. (Carquet, 2015).

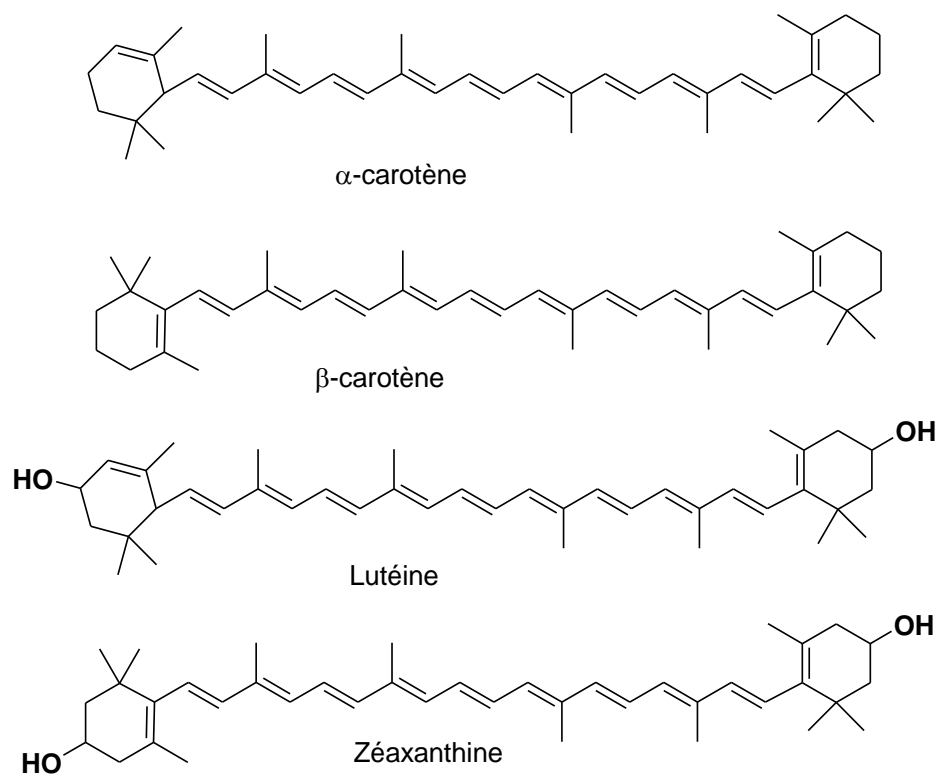


Figure 11 : Structures de carotènes et xanthophylles présents dans le houblon

## I.4. Utilisations alimentaires et pharmaceutiques

Les prénylphloroglucinols vont interagir dans le processus de la bière. Les  $\alpha$ -acides, tels que l'humulone et la cohumulone, sont responsables de l'amertume de la bière. Au cours du processus de brassage, ces acides sont extraits du houblon et sont isomérisés (convertis en leurs formes isomères plus solubles) par ébullition, ce qui libère le goût amer. L'amertume de la bière peut être ajustée en variant la quantité et le type d'acides alpha utilisés.

Les acides bêta, tels que la lupulone et la colupulone, sont moins solubles et ne sont pas aussi facilement extraits lors du brassage. Cependant, ils contribuent à la saveur et à l'arôme de la bière et sont importants pour la stabilité du produit final. Ils sont moins amers que les acides alpha, et leurs caractéristiques de goût et d'arôme sont décrites comme boisées, épicées ou résineuses (Dušek et al., 2014).

Les flavonoïdes prénylés du houblon jouent des rôles importants, notamment dans la pigmentation, la protection contre le stress environnemental et l'interaction avec les pollinisateurs. La prénylchalcone xanthohumol est le principal flavonoïde des résines de houblon, avec son isomère flavanone correspondant, l'isoxanthohumol (Ivancic, 1997). Il a été démontré que ces deux flavonoïdes contribuent principalement à l'arôme et à la saveur de la bière. Ils sont également importants pour la stabilité du produit final, car ils ont un effet protecteur contre l'oxydation et d'autres formes de dégradation (Stevens et al., 1998).

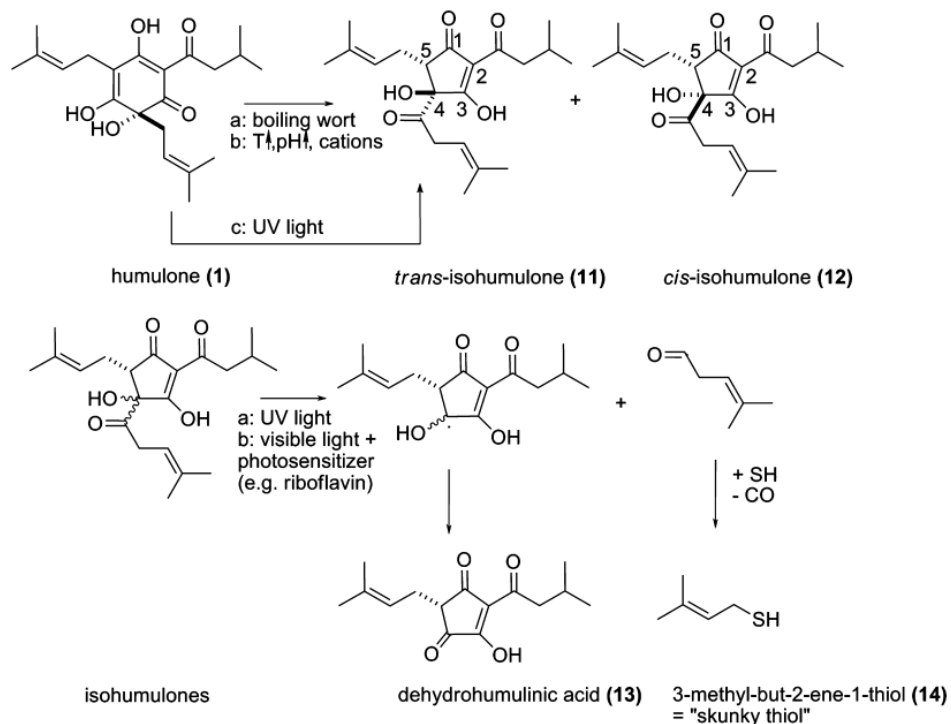


Figure 12 : Isomérisation de l'humulone et de l'isohumulone dans la bière selon Van Cleemput et al., 2009

Au cours de ce processus de préparation de la bière, deux types de houblons sont utilisés par les industriels : les « Aroma hops » et les « bitter hops » (Van Cleemput et al., 2009). Le houblon amer (ou « bitter ») est enrichi en acides alpha qui sont la principale source d'amertume dans la bière. Il nécessite des temps élevés d'ébullition pour provoquer les isomérisations et donc créer l'amertume.

Ils sont ainsi utilisés dans les premières étapes du processus de fabrication et le niveau d'amertume est mesurée en IBU ((International Bitterness Units). Le houblon aromatique (ou « aroma ») est généralement pauvre en acides alpha (<10%). Il apporte un arôme et une saveur plus désirables à la bière. L'apport de l'arôme doit être réalisé en fin de procédé de fabrication (Van Cleemput et al., 2009; Verhagen, 1994)

Les premières analyses de l'huile essentielle de houblon ont été effectuées par Chapman au début du XX<sup>ème</sup> siècle (Chapman, 1929). De plus, la composition et la teneur en métabolites de cette huile essentielle sont affectées par de nombreux paramètres tels que la variété, les conditions de culture, de séchage et de stockage (Howard and Slater, 1957). Le houblon séché contient environ de 0,5 à 3,0 % d'huile essentielle un mélange complexe de plus de 400 composés caractérisés par GC-MS (Howard, 1957; Velde and Verzele, 1986).

Dans les huiles essentielles, la partie hydrocarbonée représente de 80 à 90% de monoterpènes et sesquiterpènes, avec en le myrcène en composés majoritaires (30 à 60%) suivi par l'alpha-humulène et bêta-caryophyllène. Concernant l'extraction des huiles essentielles, les techniques les plus récentes sont concentrées sur l'extraction en fluide supercritique au CO<sub>2</sub> (Capuzzo et al., 2013).

L'équipe de Van Opstaele a isolé trois types de fractions principales dans l'huile essentielle totale extraite à partir de *Humulus lupulus* L. Quel que soit les fractions obtenues, l'extrait total s'est avéré très riche en monoterpènes et sesquiterpènes (myrcène, caryophyllène et humulène). La première fraction est constituée de monoterpénoïdes et composés oxygénés tel que le linalol, la 2-undécanone le 4-décénoate de méthyle. La deuxième fraction est quant à elle représentée par des sesquiterpènes hydrocarbonés tels que le copaène, le caryophyllène, l'humulène, et le sélinène. La dernière fraction est enrichie en sesquiterpénoïdes comme l'oxyde de caryophyllène, l'époxyde d'humulène (I et II) et l'humulénol II. (Van Opstaele et al., 2012).

Outre leur rôle direct dans le processus de la bière, les flavonoïdes prénylés ont également démontrés des potentialités thérapeutiques telles que les effets anti-inflammatoires, antioxydants et antiprolifératifs (Jiang et al., 2018; Liu et al., 2015; Tronina et al., 2020).

Ils sont utilisées en phytothérapie pour leurs propriétés sédatives et analgésiques (Park et al., 2012). L'isoxanthohumol est considéré comme un phyto-œstrogène (Bolca et al., 2007; Chadwick et al., 2006) et la 8-prénylnaringénine qui inhibe l'angiogenèse, pourrait être efficace contre les bouffées de chaleur (Bowe et al., 2006; Pepper et al., 2004).



Partie II  
*Cannabis sativa* L.







## Partie II. *Cannabis sativa* L.

### II.1. Structure et morphologie végétale

*Cannabis sativa* L., est communément appelé chanvre lorsque son utilisation est destinée à l'industrie alimentaire ou textile. Le terme de Cannabis est utilisé lorsque la plante est destinée à des fins thérapeutiques.

Tout comme le houblon, il appartient à la famille des Cannabacées et à l'ordre des Rosales. Son nom provient du latin *canna et avis* traduit par canne et oiseau pour faire allusion à la forme particulière allongée de la tige avec la production des graines très appréciées par les oiseaux. *Sativa* est la forme féminine de *Sativus* pour signifier cultivés.

Il est réparti sur tous les continents de milieux tempérés et chaud dans des zones ensoleillées. C'est une plante annuelle mesurant en moyenne de 1 à 2 m (jusqu'à 5 m), garni de multiples poils fins et rugueux (plante pubescente) et sa floraison se produit entre juin et septembre. Les racines sont pivotantes et ramifiées de manière latérale pouvant mesurer plus de 2 m. Les tiges sont raides, simples et dressées avec leurs centres ligneux. Les feuilles sont pétiolées, opposées, palmées (palmatiséquées) en 5 à 7 segments lancéolés et dentées se terminant par un acumen (pointe allongée, effilée). Les feuilles supérieures sont plus souvent alternes et avec uniquement 1 à 3 segments. La fleur est de couleur verte en panicule rameuse (axe secondaire en décroissance de la base au sommet). Elle est dioïque, les fleurs à étamines et les fleurs à pistil sont sur deux pieds distincts. La fleur mâle possède un périanthe divisé en 5 parties égales avec 5 étamines pendantes à filet courts et anthères terminales. La fleur femelle possède un périanthe monosépale enroulant l'ovaire, et avec deux longs stigmates filiformes (Coste, 1937). Des trichomes, excroissance glandulaires, stockant les métabolites sont présents sur les fleurs et feuilles de la plante (Bonini et al., 2018).

La structure du chanvre et de ses tiges peut varier d'un cultivar à un autre en fonction de ses utilisations. Par exemple, les plants destinés à la production de fibres sont généralement hauts et peu ramifiés. Leurs tiges sont donc peu ligneuses afin de maximiser la production de fibre. Les cultivars destinés à un usage thérapeutique (drogue) sont quant à eux très ramifiés afin de maximiser la productions d'inflorescences femelles (Small et al., 2003).

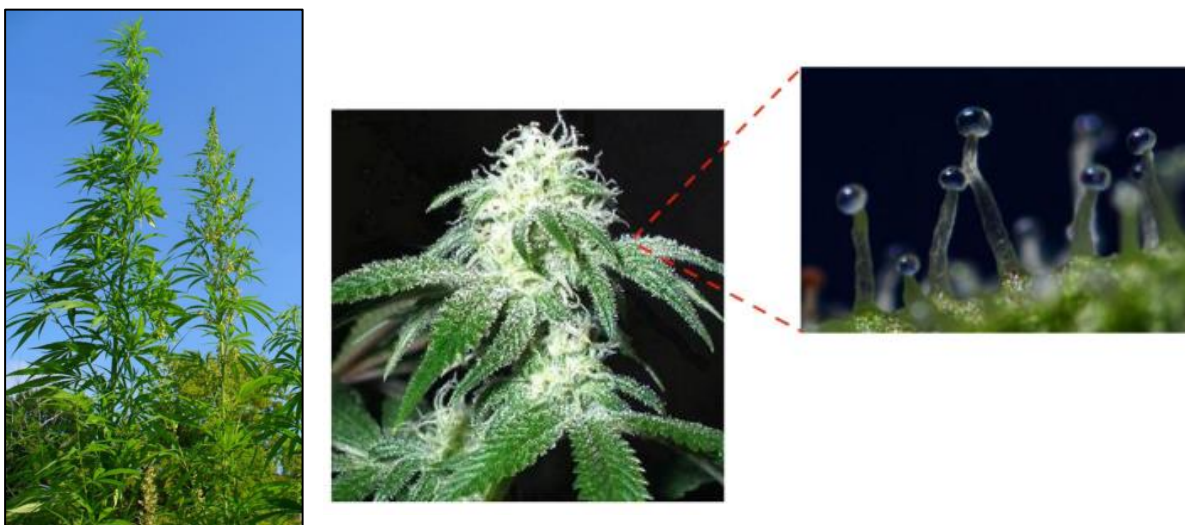


Figure 13 : Photographies de plants de *Cannabis sativa* L. et agrandissements sur les inflorescences femelles et les trichomes

Le genre *Cannabis* est divisée en trois espèces identifiées *C. sativa*, *C. indica* et *C. ruderalis*, et leurs caractéristiques ont été décrites (Adhikary et al., 2021; Hartsel et al., 2016).

*C. sativa* est la plus grande des trois (3 à 4 m) avec de longues feuilles fines de couleur vertes ou vert-claires. Les branches sont plutôt espacées. Sa production de fleur est moins importante que les deux autres espèces mais elles possèdent en général des concentrations en THC plus importante que de CBD. La maturité est atteinte en moyenne entre 4 à 6 mois.

*C. indica* est de taille moyenne (1 à 2 m) avec une structure ramifiée en buisson très dense et des feuilles plus larges que *sativa*. La coloration tend sur du vert-olive ou vert foncé. Elle est destinée à la production d'inflorescences, avec généralement plus de CBD que de THC. Elle atteint sa maturité en 2 à 3 mois.

*C. ruderalis* est la plus petite de toute, préférant un climat plus doux et nordique que les deux autres. Elle peut être retrouvée à l'état de cultivars sauvages. Elle possède les plus petites feuilles, tiges et fleurs. Sa coloration est plutôt verte-foncé. Elle est utilisée uniquement afin de réaliser des croisements et sélections des deux autres espèces (*sativa* et *ruderalis*) en raison de sa capacité d'autofloraison et de temps de maturité de 1.5 à 2 mois.

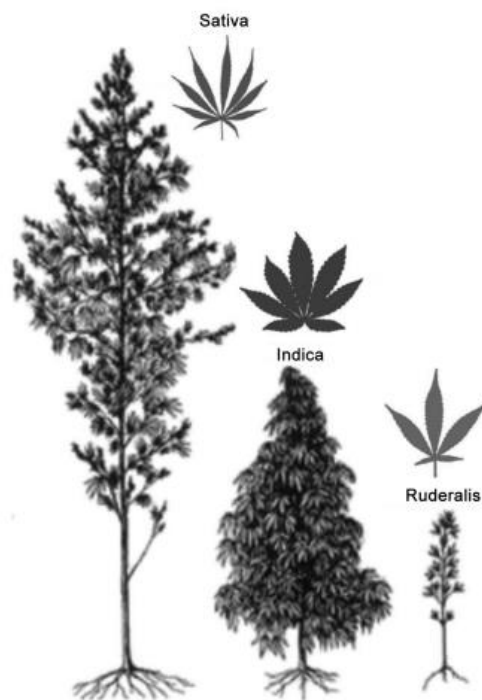


Figure 14 : Morphologie végétale des espèces de Cannabis

## II.2. Histoire et production mondiale

Afin de mieux comprendre l'histoire du cannabis, il est important de faire un point sur ses dénominations différentes selon ses utilisations.

Pour une même plante, le *Cannabis sativa* L., le nom commun peut être le chanvre (« Hemp » en terme anglophone) ou bien cannabis (ou « marijuana »). Le chanvre désigne la plante pour un usage industriel textile et alimentaire (papier, cordes, tissus, nourriture) alors que le terme cannabis est propre à l'utilisation de la drogue végétale à des fins thérapeutiques (santé ou le bien-être).

La législation française impose une classification de la plante de cannabis en tant que stupéfiant si son pourcentage de THC (molécule psychoactive) est supérieur à 0.3% (arrêté du 31 décembre 2021 et articles L. 5132-86 et R.5132-86 II du code de la santé publique). Le chanvre industriel produit doit donc admettre des valeurs inférieures à cette concentration.

### II.2.1. Une culture ancestrale jusqu'à une dépénalisation progressive

*Cannabis sativa* L. est une plante cultivée depuis l'antiquité pour ses utilisations majoritaires encore d'actualités : ses fibres, ses graines et les phytocannabinoïdes. L'origine exacte est indéterminée en raison de sa culture mondiale.

Cependant, les preuves les plus anciennes de l'utilisation de la plante ont été trouvées en Chine, où des découvertes archéologiques indiquent que cette plante était cultivée pour ses fibres depuis 4 000 ans avant J-C. Elle est retrouvée ensuite dans une zone entre Europe ou Asie de 1000 à 2000 avant J-C (McPartland et al., 2018).

Les cultures européennes étaient plutôt dirigées vers du chanvre textile uniquement alors que les cultures asiatiques étaient à des fins textiles mais aussi médicinales (Small, 2017). Des traces d'utilisation de graines sont retrouvées entre de 200 av. et 200 après J-C (dynastie Han) ; des textiles et papiers fabriqués à partir du chanvre ont été retrouvés dans le tombeau de l'empereur Wu (104-87 av. J-C) (Li, 1973).

L'utilisation du cannabis comme médicament a été rapportée dans la plus ancienne pharmacopée chinoise, le « pen-ts'ao ching », rédigé au 1<sup>er</sup> siècle. Il était indiqué dans le traitement des douleurs rhumatismales, la constipation intestinale, la malaria, les douleurs d'accouchements et de règles (Touw, 1981).



Figure 15 : Illustration du chanvre dans le Pen-ts'ao Ching avec son texte expliquant ses utilisations

Du début de l'ère chrétienne et jusqu'au 18<sup>e</sup> siècle, l'utilisation médicale du cannabis est restée très intense en Inde et s'est ensuite étendue au Moyen-Orient et à l'Afrique. En Arabie, des médecins (Avicenna) ont mentionné le cannabis dans leurs compendiums médicaux X<sup>ème</sup> siècle. Les textes musulmans mentionnent l'utilisation du cannabis comme diurétique, digestif, et pour calmer les douleurs (Rubin, 1975).

En Europe, pendant cette période, le cannabis était cultivé exclusivement pour ses fibres. Des traces écrites sont retrouvées au I<sup>er</sup> siècle après J-C avec la description du cannabis par Pline l'ancien en Italie. Ces usages proviennent de la transmission de connaissances par les musulmans sur la fabrication de papier à partir du cannabis. Sa culture s'est développée essentiellement en Espagne et en Italie. (Grotenhermen and Russo, 2002).

Le cannabis est connu en Afrique depuis le X<sup>e</sup> siècle. Son utilisation a pu être introduite par des commerçants arabes, qui à leur tour étaient reliés à l'Inde (où la plante était admise comme sacré et utilisée pour ses effets psychoactifs). Cette hypothèse provient du fait de la similitude des préparations médicinales à base de cannabis entre l'Inde et l'Afrique. Elle était utilisée principalement pour des effets antidouleurs contre les morsures de serpent, la fièvre, l'asthme et pour les accouchements. Il s'en est suivi l'exportation des graines par bateaux depuis l'Afrique jusqu'en Amérique du Sud au XVI<sup>ème</sup> siècle (Du Toit, 1980).

Au XIX<sup>ème</sup> siècle, le cannabis a été introduit dans la médecine occidentale à la suite des travaux d'un médecin irlandais, William B. O'Shaughnessy et d'un psychiatre français, Jacques-Joseph Moreau. Le premier est revenu en Europe après ses services militaires en Inde où il a pu étudier la plante, ses usages et ses essais contre plusieurs pathologies sur animaux et patients. Il a publié l'ouvrage intitulé « On the preparations of the Indian hemp, or gunjah » pour y présenter ses recherches (traitements pour rhumatismes, convulsions, tétanos et rage) et étendre son utilisation à l'Europe (O'Shaughnessy, 1843).

L'objectif du psychiatre était tout autre. Au cours de ses voyages en Orient, il s'est rendu compte de l'utilisation très répandue de la résine de cannabis (« Haschisch ») par les arabes. De retour en France vers 1840, il réalise de nombreuses expériences avec la plante sur sa propre personne, puis ses élèves et ses patients, avant de publier 5 ans plus tard son livre sur les effets du cannabis intitulé : « Du Hachisch et de l'Aliénation Mentale : Etudes Psychologiques ». Les études ont été concentrées sur les effets psychoactifs et ses potentiels en utilisation thérapeutique (Moreau, 1845).

Apparaissant comme des pionniers du développement de médecine à base de cannabis en Occident, Moreau et O'Shaughnessy ont proposés ainsi les rares options de traitements contre les maladies de l'époque telles que le tétanos, la rage ou bien le choléra. En 1866, son inscription dans Pharmacopée française (3<sup>ème</sup> édition) a permis son utilisation à des fins thérapeutiques par des pharmaciens et médecins.

L'usage du cannabis médicinal s'est donc répandu au fur et à mesure dans toute l'Europe avant d'être exporté par bateaux en Amérique du Nord. Sa première référence est apparue en 1850 dans la pharmacopée américaine, avant d'être évoqué dans la première conférence clinique de Ohio State Medical Society sur le cannabis en 1860 pour son utilisation dans les traitements de douleurs, rhumatismes et asthme. (Ohio State Medical Association, 1960).

La période de fin XIX<sup>ème</sup> et début XX<sup>ème</sup> siècle représente donc l'âge d'or de l'utilisation du cannabis thérapeutique. Les prescriptions d'utilisations étaient résumées dans l'Analytic Cyclopedia of Practical Medicine (Sajous, 1918). Cette encyclopédie regroupe l'ensemble des

pathologies repertoriées de l'époque, la description de leurs symptômes et les traitements associés. Le cannabis y est défini comme traitement en tant que sédatif ou hypnotique, analgésique et pour amélioration de l'appétit.

Concernant l'Amérique du Sud, au Brésil, il était essentiellement utilisé par les populations défavorisées en tant que « drogue de pauvres » pour face à la montée de l'opium. Ces usages se sont transmis ensuite le long de la mer et des fleuves jusqu'au Mexique, avant de s'étendre au sud actuel des Etats-Unis par le biais des migrants mexicains (début XXème siècle). C'est ainsi que jusqu'en 1950, sa consommation était faite par les migrants africains et hispaniques avant de se reprendre au sein de toutes les populations et essentiellement les jeunes adultes (Rubin, 1975).

Les gouvernements des différents Etats ont commencé à freiner puis interdire au fur et à mesure sa consommation récréative. Le début de l'interdiction mondiale est marqué par la Californie qui est le premier Etat à l'interdire en 1915, avant sa généralisation à toute l'Amérique avec une loi instaurée en 1937, nommée « The Marihuana Tax Act », interdisait toute consommation récréative ou être en sa possession (Musto, 1937). Toute personne utilisant la plante devait être référencée et payer une taxe d'un dollar par once si c'était à des fins médicales, et de 100 dollars par once pour des usages récréatifs. Le non-paiement de l'une de ces deux taxes entraînait une amende (2 000 dollars) et une peine d'emprisonnement de 5 ans. A la suite de ces interdictions, le cannabis a été retiré de la pharmacopée américaine en 1941 et ses usages en ont été fortement impactés. Il s'en est suivi son retrait de la pharmacopée française en 1953 et sa classification (cannabis et dérivés) comme stupéfiant par l'ONU (1960), au même titre que la coca, l'opium et leurs dérivés. Le cannabis est attribué aux drogues les plus dangereuses : celles à fort potentiel d'abus et très faible valeur potentielle thérapeutique. Le 31 décembre 1970, une loi française d'interdiction de toute consommation de stupéfiants, et donc de cannabis, est mise en place.

Une relancée progressive mondiale pour ses effets thérapeutiques s'est enclenchée depuis 1996, même si de manière non officielle il était plus ou moins autorisé de depuis 1972 aux Pays-Bas. La Californie est le premier Etat américain à autoriser à nouveaux son usage médical. Le Canada poursuit en 2001 organisant tout un système autour de sa réglementation. Des dépénalisations sont actées dans plusieurs autres pays : en Belgique en 2003, au Chili en 2005, au Brésil et en Israël en 2006, en République tchèque en 2010, en Suisse en 2011, en Italie en 2013, en Allemagne en 2017 et royaume Uni en 2018 (de Souza et al., 2022; Ruheel et al., 2021; Schlag et al., 2022).

Les études et recherches scientifiques sont réalisées malgré tout en parallèle d'une législation interdisant la consommation récréative et freinant fortement la recherche à des fins thérapeutiques. Parmi les travaux les plus marquants de l'histoire du cannabis, ceux de Mechoulam peuvent être cités. En 1964, l'équipe de Gaoni et Mechoulam (en Israël) effectue l'extraction et l'isolement du THC à partir de la plante ainsi que sa synthèse chimique (Gaoni and Mechoulam, 1964). En 1988, il présente la découverte du système endocannabinoïde et des récepteur CB1/CB2 avant d'expliquer tout le fonctionnement du système avec les phytocannabinoïdes (Martin et al., 1999).

Le nombre de publications sur le cannabis n'a cessé d'augmenter depuis 1960, attestant du grand intérêt pour la recherche pour cette plante. La figure ci-dessous montre l'évolution du nombre de publications sur le cannabis au cours des 60 dernières années. L'autorisation de son usage médical et une dépénalisation progressive mondiale en sont les principaux facteurs de développement.

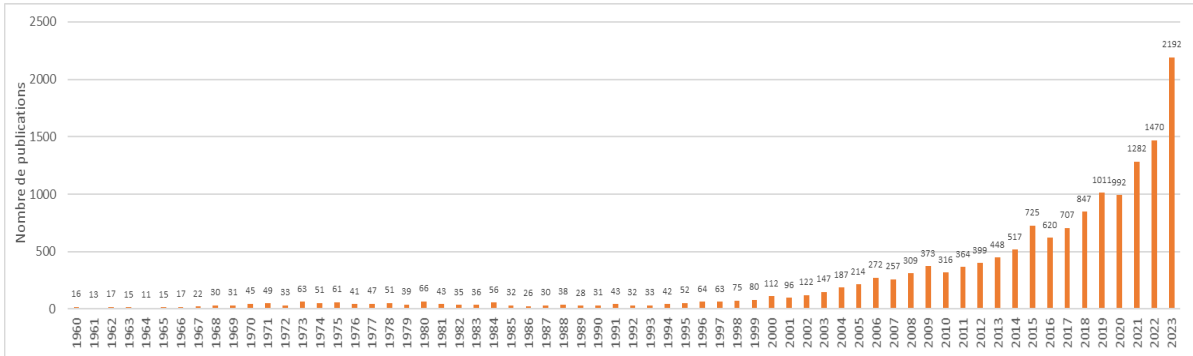


Figure 16 : Recherche actuelle publications scientifiques (source : Open Alex avec le terme *Cannabis Sativa L.*)

## II.2.2. Production européenne

Les espèces de cannabis sont donc réparties de manières hétérogènes sur l'ensemble des continents. Cette répartition est due à son utilisation au fil des siècles et des importations exportations de cultivars. Quatre types de sous-espèces de cannabis sont essentiellement réparties au sein des différentes cultures mondiales : *Cannabis sativa ssp. sativa*, *Cannabis indica ssp. chinensis*, *Cannabis indica ssp. indica* et *Cannabis indica ssp. afghanica*. Ces sous-espèces sont soit destinées à la production de fibre, nommées « hemp » avec les variétés à feuilles fines (Narrow-Leaflet Hemp = NLH) et à feuilles larges (Broad-leaflet Hemp = BLH) ou soit à la production de drogue avec des variétés à feuilles fines (Narrow-Leaflet drug= NLD) et larges (Broad-leaflet Drug =BLD)(Clarke, 2016).

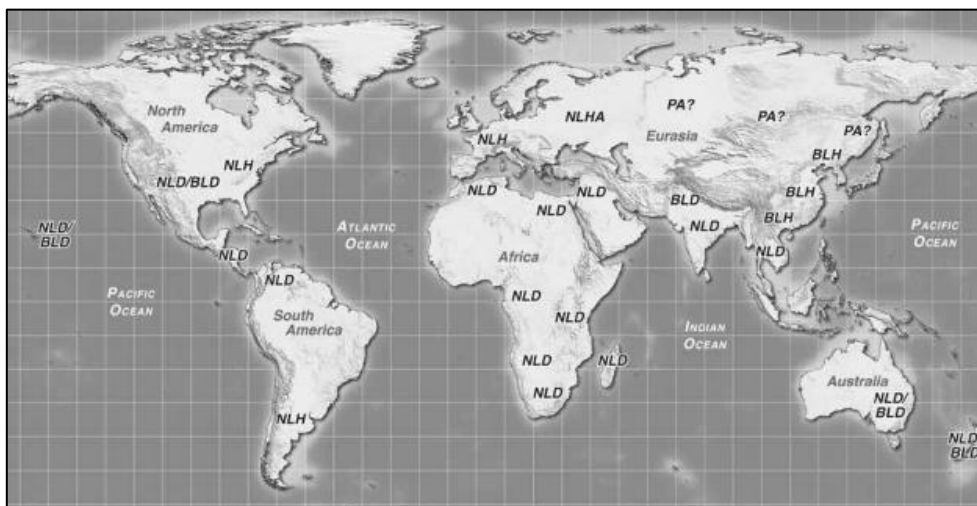


Figure 17 : Répartition géographique des sous-espèces de cannabis selon Clarke et al. 2016 (*Cannabis sativa ssp. sativa* (NLH), *Cannabis indica ssp. chinensis* (BLH), *Cannabis indica ssp. indica* (NLD) et *Cannabis indica ssp. afghanica* (BLD)).

*Cannabis sativa* ssp. *sativa* (NLH) utilisée pour ses fibres et ses graines avec un taux de THC inférieur à 0.3% est essentiellement originaire d'Europe et exportées aux Etats-Unis. *Cannabis indica* ssp. *chinensis* (BLH) est également utilisée pour ses fibres et graines avec un taux de THC légèrement supérieur (<0.5%) à *sativa*. Elle est cultivée dans l'Asie de l'Est et a été exportée au Etats-Unis et en Europe.

Les espèces *Cannabis indica* ssp. *indica* (NLD) et *Cannabis indica* ssp. *afghanica* (BLD) sont quant à elle cultivées pour la production destinée à des applications médicales ou récréatives. Elles possèdent des taux moyens respectifs de THC inférieurs à 20 et 10%. Elles sont cultivées en Asie de l'Ouest et du Sud, ainsi qu'en Afrique. Elles ont été exportées en Amérique du Nord et du Sud et en Australie.

Ainsi, la production européenne de chanvre pour sa fibre et ses huiles (« Hemp ») est suivie par la commission européenne. Cette commission affiche plusieurs chiffres intéressants et ils sont présentés dans la section Agriculture et Productions végétales (« Chanvre - Commission européenne,» 2022).

Le chanvre est retrouvé dans tous les pays européens. L'évolution de la superficie qui y est consacrée peut-être observée sur le graphique ci-dessous.

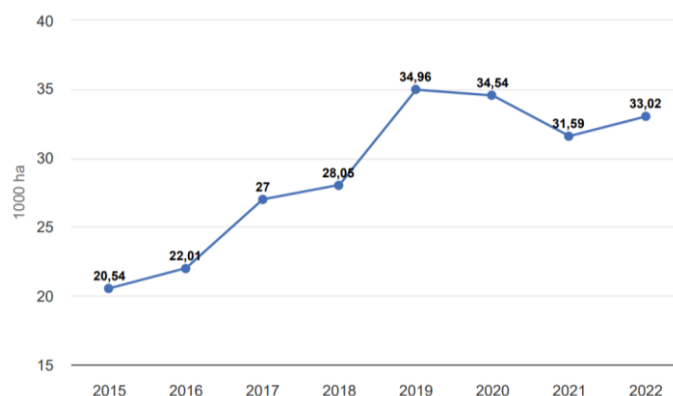


Figure 18 : Surfaces exploitées dans l'Union Européenne pour la culture du chanvre destinées à la production de fibres ou d'huiles (Source : Eurostat)

La superficie dédiée à la plante a évolué de 20 540 hectares (ha) en 2015 à 33 020 ha en 2022, signifiant une augmentation d'environ 60 %. Ainsi pendant ce même laps de temps, sa production s'est accrue, passant de 97 130 tonnes à 179 020 tonnes, et donc une augmentation de 84,3 %. Concernant la position de la France, elle est le plus grand producteur et exportateur européen. A elle seule, elle produit plus de 60 % du chanvre de l'Union Européenne (environ 107 000 t), suivie de l'Allemagne avec 17 % (30 400 t) et des Pays-Bas avec 5 % (8 900 t).

En plus de la production de chanvre, celle destinée à un usage de drogues est également contrôlée de très près en Union Européenne. Le suivi des usages et trafic de drogues est réalisé au sein de rapports annuels par l'European Union Drugs Agency (EUDA). Les données présentées sont issues du rapport de 2024 par rapport à l'année 2023 (European Unions Drugs Agency, 2024).



Au sein de l'Europe, le cannabis reste la drogue illicite la plus consommée parmi la cocaïne, l'Ecstasy, le LSD et les amphétamines.

Les enquêtes des différents pays sur la consommation annuelle de 2023 de cannabis estiment un nombre de consommateurs à 8% des adultes européens, soit 22.8 millions de personnes entre 15 à 64 ans. Parmi ce nombre, la tranche d'âge des 15-34 ans représente plus de 15%, soit 15.1 millions de consommateurs. Le nombre d'utilisateur quotidiens ou quasi-quotidiens (à minima 20 jours dans un mois) est estimé à 1.3% de la population, soit 3.7 millions d'adultes entre 15 à 64 ans. Il s'est également avéré qu'environ 75% des consommateurs de cannabis sont des hommes contre 25% de femmes. Un fait d'utilisation de plusieurs formes de cannabis différente a été explicitement démontré. Dans le rapport de de 2021 (European Drug Report 2021), les consommateurs ont été interrogés sur les formes utilisées. Sur les 100%, 95% ont consommé de l'herbe, 32% des résines et 25% des comestibles (huiles, gummies, liquide e-cigarette).

Les tendances de consommation de cannabis sont hétérogènes suivant les pays. Les données présentées ci-dessous sont issus de l'EUDA et de l'Observatoire Européen des Drogues et des Toxicomanies (OEDT) (European Unions Drugs Agency, 2024).

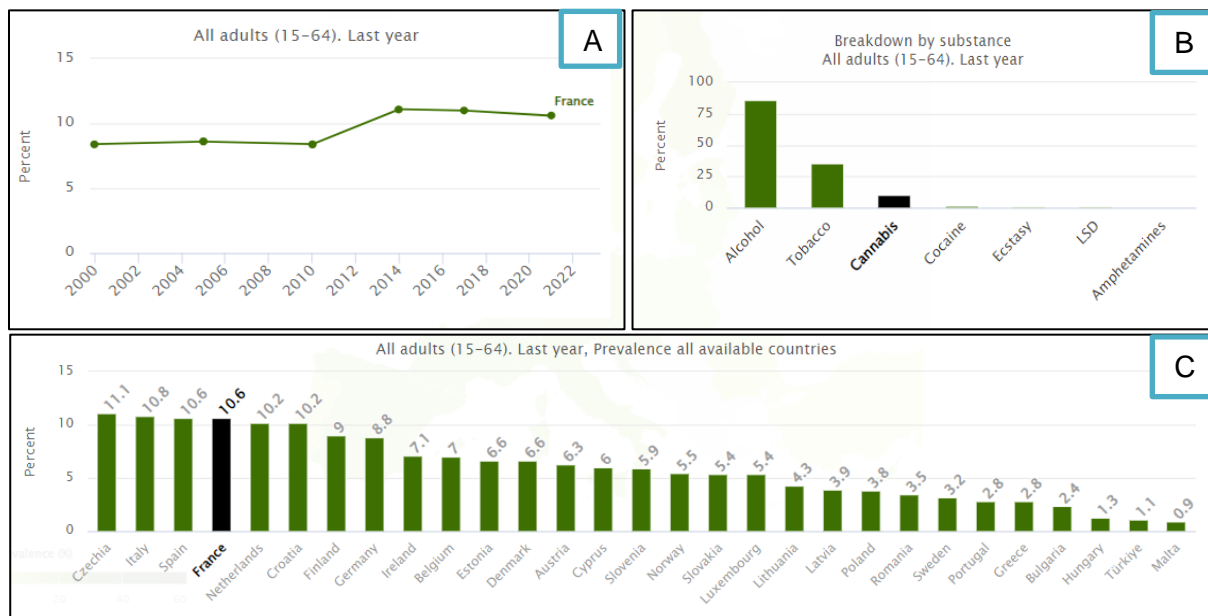


Figure 19 : Graphiques des données l'OEDT de présentant les différentes enquêtes de proportion de la population française consommant du cannabis entre 2000 et 2021 (A) ; la répartition des différentes substances utilisées en 2021 (B) et la nationalité des consommateurs de 2021 (C)

En regardant le graphique A, il montre que 10.6% des 15-64 ans de la population française a consommé du cannabis en 2021 (soit plus de 5.4 millions) contre 8% en 2010. Le cannabis est également classé en troisième position des substances consommées par les français, derrière l'alcool et le tabac (graphique B). Les français se classent en troisième position ex-aequo avec l'Espagne dans le classement des pays consommateurs de l'union européenne (graphique C).

Le rapport de l'EUDA fait également un état des lieux des saisies réalisées par les forces policières et douanes. En 2022, plus de 243 000 saisies de résines de cannabis (468 t) et 234 000 saisies d'herbes, d'inflorescences (265 t) ont été déclarées à l'UE. De plus, environ

610 000 infractions liées à la consommation ou détention de cannabis ont été déclarés cette même année. Des analyses de concentrations moyennes entre la résine et l'herbe cannabis ont montrés que la première possédait 24.8% de THC et la seconde 10.1%.

### II.2.3. Utilisations et consommations actuelles

Chacune des parties de la plante (graines, tiges, fleurs et feuilles) est utilisée et valorisée (Johnson, 2019).

La tige et le pédoncule du chanvre industriel sont utilisés afin produire la fibre de chanvre. La culture de la plante est optimisée afin de réduire et d'éviter un développement trop avancé de la fleur et la production de fleurs. Une hauteur optimale de 3 à 5 m est définie pour la récolte. La couche externe d'une tige de chanvre est composée de faisceaux de fibres libériennes (15% biomasse), qui ont plus de valeur que la couche interne (Kaur and Kander, 2023)

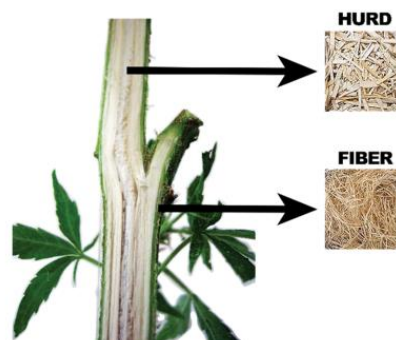


Figure 20 : Types de matériaux obtenus sur du chanvre industriel

Les fibres centrales sont séparées des périphériques. Elles sont ensuite nettoyées, traitées et séchées avant de subir les processus comme le rouissage, teillage, peignage, filature et tissage pour former du textile.

La plante de chanvre sert également à réaliser des cordages ou du papier (Naeem et al., 2023). La production de fibres de chanvre est plus durable et utilise moins d'eau que la culture conventionnelle du coton (Yano and Fu, 2023). Les fibres de chanvre plus résistantes sont également utilisées comme alternative aux matières synthétiques.

Enfin la paille de chanvre est utilisée en agriculture comme aliments pour le bétail en raison de sa haute valeur nutritionnelle (Wang et al., 2023). Des essais de substitutions de la fibre de verre ont également été réalisés avec un mélange époxy et fibre de chanvre traitée (Murugu Nachippan et al., 2021).

Les graines ou « Hemp seeds » sont issues de cultures similaires de chanvre industriel que celles destinées au textile. Les graines peuvent être récoltées lorsque la plante atteint des hauteurs de 2 à 3 m. A ce stade, les graines possèdent une taille inférieure à 1 cm et elles sont en général séparées de leurs enveloppes avant de subir d'autres traitements. Elles peuvent être écrasées pour produire de la farine ou être pressées par un procédé d'extraction à froid afin d'obtenir les huiles utilisées en alimentation (riches en oméga-3) (Montero et al., 2022).

La cosmétique est également un secteur intéressé par les huiles de chanvre car elles sont classées comme une "huile sèche" en raison d'une absorption rapide sans graisses résiduelles. Des propriétés anti-inflammatoires, cicatrisantes et anti-âges sont avancées

comme arguments supplémentaires en raison de la présence de terpènes, flavonoïdes et pigments photosynthétiques. Elles sont donc retrouvées dans de nombreux produits tels que des lotions, des huiles, des savons et shampoings (Sarkar and Sadhukhan, 2023).

Les fleurs sont collectées de nos jours pour l'obtention d'huiles essentielles ou bien des composés actifs tels que le CBD voire le THC selon les pays légalisant ou non le cannabis. Les cultures destinées à la production de fleurs sont généralement plus espacées que celles destinées à la culture de fibres afin qu'elle puisse s'étendre et se développer au maximum. Les fleurs sont récoltées lorsque la plante atteint des hauteurs de 1 à 2.5 m.

Les procédés d'extractions utilisées sont par pression, infusion ou encore extraction par fluide supercritique au CO<sub>2</sub> (Johnson, 2019). Ces huiles essentielles obtenues à partir de chanvre riches en CBD sont utilisées à des fins pharmaceutiques ou cosmétiques puisqu'elles sont dotées des propriétés sédatives et relaxantes (Malabadi et al., 2023).

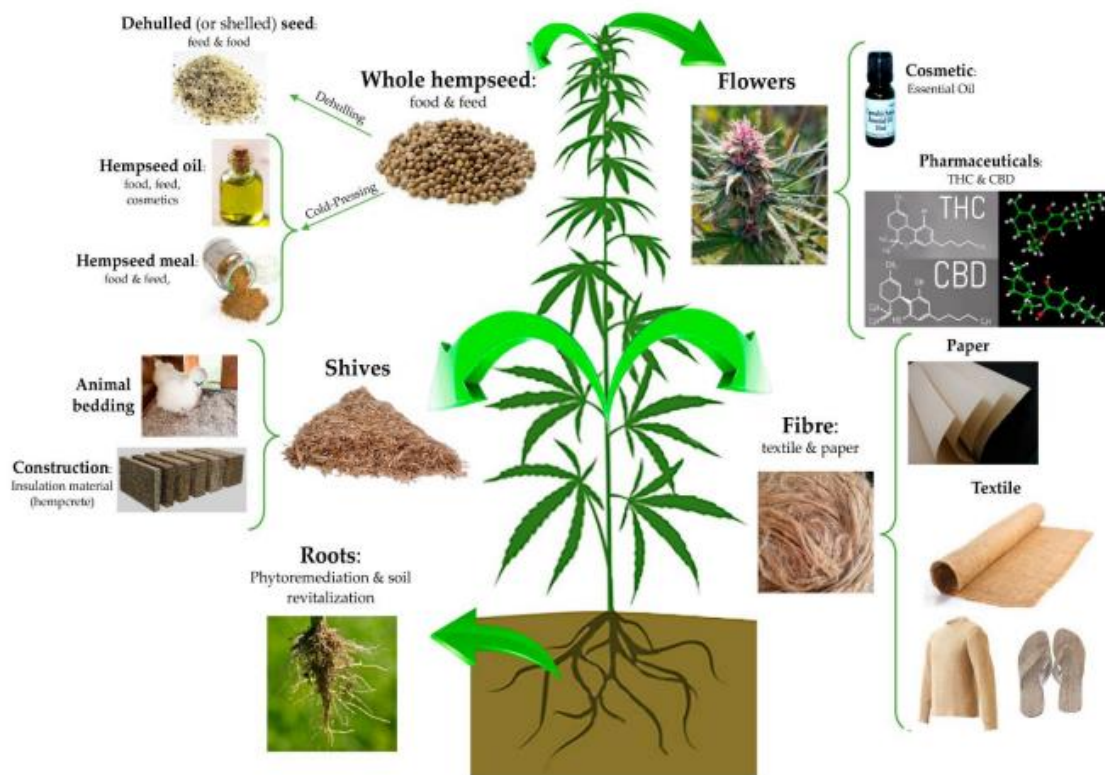


Figure 21 : Schéma récapitulatif de différentes applications industrielles de la plante de *Cannabis sativa* L. (Kaur and Kander, 2023)

## II.3. Métabolites d'intérêts

### II.3.1. Composition chimique

Les compositions chimiques des parties de la plante de *cannabis sativa* L. ont pu être étudiées au cours des dernières décennies par plusieurs groupes (Audu et al., 2014; House et al., 2010; Kornpointner et al., 2021).

Tableau 2 : Récapitulatif de la composition chimique des feuilles, tiges, racines et graines selon les études précédentes

	<b>Feuilles</b>	<b>Tiges</b>	<b>Racines</b>	<b>Graines</b>
Protéines	23.5%	17.2%	N.D.	22.5%
Lipides	20.0%	8.0%	N.D.	30.0%
Fibres	19.0%	23.1%	N.D.	25.0%
Cendres	11.2%	6.8%	N.D.	7.0%
Humidité	6.9%	5.2%	N.D.	6.0%
Cannabinoïdes	2.100%	0.008%	0.004%	0.003%

Ces études prouvent de plus que la concentration en cannabinoïdes est très faible dans toutes les parties analysées. Seules les inflorescences possèdent le pourcentage le plus élevé même si un faible pourcentage est stocké dans les feuilles.

Les travaux se sont focalisés sur les inflorescences et les feuilles pour définir les concentrations en cannabinoïdes (Bernstein et al., 2019). Celles de THC, CBN, CBG et CBD ont été déterminées dans les différentes hauteurs de cueillettes, à savoir des parties basses, médianes et hautes de la plante. Les parties supérieures sont plus riches en THC (12% contre 7 à 8%) que les parties médianes et inférieures. Ensuite les fleurs étaient évidemment plus riches en cannabinoïdes que les feuilles d'inflorescences quelle que soit la partie (par exemple : +5% de THC entre les deux). Ce résultat était prédictible puisque les trichomes sont présents majoritairement dans les parties aériennes de la plante et sont concentrés sur les fleurs femelles non fertilisées.

Plus de 500 constituants ont été répertoriés au sein de la plante de *cannabis sativa* L., dont plus d'une centaine appartiennent aux cannabinoïdes. En dehors de ces derniers, les autres composés sont répertoriés dans diverses classes chimiques, notamment les alcaloïdes, les flavonoïdes, les phénols et les terpènes. Le schéma en annexe 2 présente la voie de biosynthèse des métabolites primaires et secondaires de la plante (Flores-Sanchez and Verpoorte, 2008).

### II.3.2. Phytocannabinoïdes

Le précurseur initial de cette voie des principaux phytocannabinoïdes en C5 s'avère être l'acide cannabigérolique (CBGA), lui-même synthétisé à partir du géranyl diphosphate et de l'acide olivétolique. Il est le premier de tous types les cannabinoïdes à avoir été identifié en 1964 (Gaoni and Mechoulam, 1964). Le CBGA induit la synthèse d'acide tétrahydrocannabinolique ( $\Delta^9$ -THCA) d'acide cannabidiolique (CBDA) et d'acide cannabibichroménique (CBCA) par le biais de leurs enzymes respectives :  $\Delta^9$ -THCA Synthase, CBDA Synthase et CBCA Synthase. (Pavlovic et al., 2019).

De plus chaque forme acide conduit à la forme neutre par une étape de décarboxylation liée à la température ou à la lumière. Il est ainsi nécessaire de contrôler les températures lors des manipulations d'extractions et d'analyses suivant si l'on veut conserver ou non les formes acides originelles.

La décarboxylation entraîne la formation du  $\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol (THC) à partir du THCA, du cannabidiol (CBD) à partir du CBDA, celle du cannabigerol (CBG) à partir du CBGA et celle du cannabichromène (CBC) à partir du CBCA.

Le THC est donc la principale molécule psychoactive du cannabis. Sous forme acide (THCA), il est cependant non-psychoactif. Le CBD et CBDA sont essentiellement retrouvés dans le chanvre industriel destiné à la production de fibres. Le CBC est quant à lui présent majoritairement aux premières étapes de croissance de la plante (de Meijer et al., 2003).

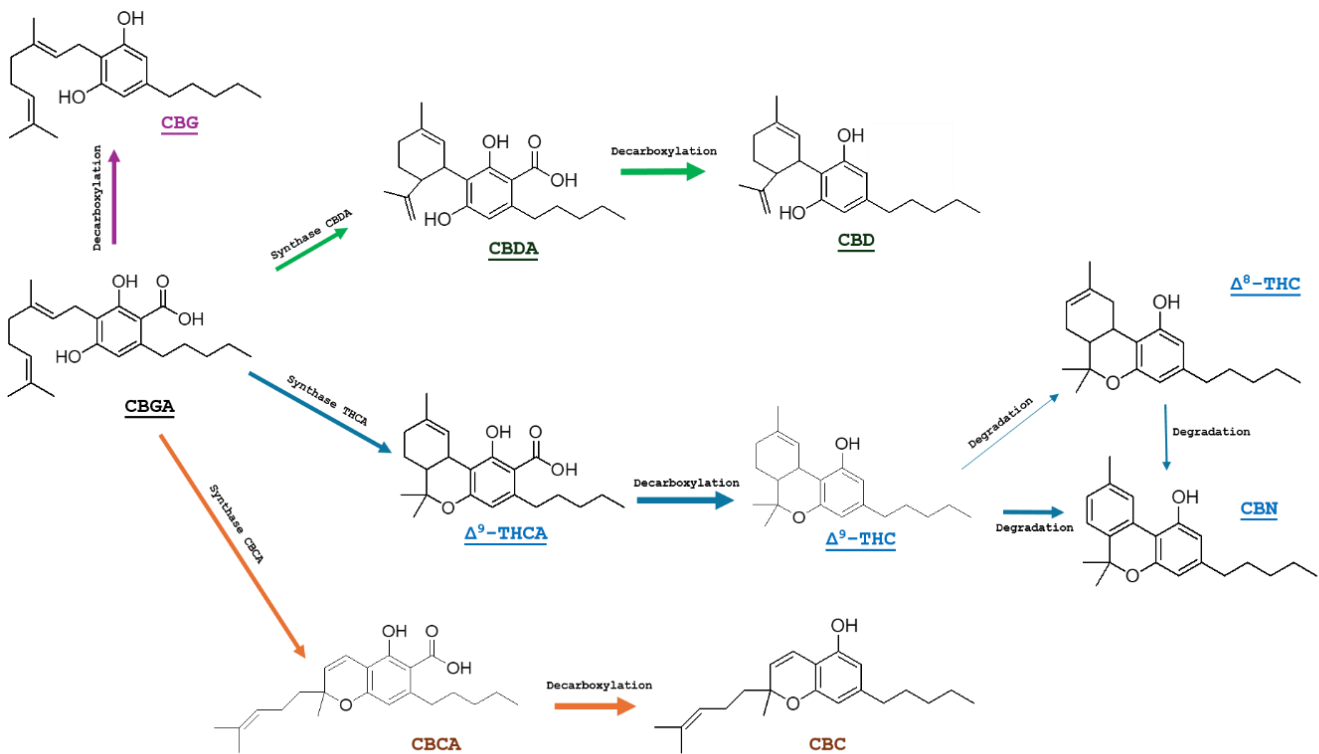


Figure 22 : Biosynthèse des cannabinoïdes majoritaires à partir du CBGA

Des réactions d'oxydations non-enzymatiques se produisent également au sein de cette voie métabolique, issues généralement du THCA ou du CBDA. Le cannabinoïde (CBN) et l'acide cannabinoïque (CBNA) proviennent de l'oxydation du THCA. Quant aux cannabiodiol (CBND), cannabielsoin (CBE) et l'acide cannabielsoinique (CBEA) sont produits par l'oxydation du CBDA.

Le CBL (cannabicyclo) est caractérisé par un pont et un cycle à 5 atomes à la place du cycle A classiquement observé sur les cannabinoïdes. Cet agencement particulier est créé sur le CBC ayant subi de hautes températures. (Brenneisen, 2007).

Seuls quelques-uns des phytocannabinoïdes produits par la plante sont représentés Figure 23. Cette famille de composés est généralement divisée en sous familles, plus ou moins au nombre de 10. Elles sont regroupées dans la figure ci-dessous faisant apparaître les diverses fonctions possibles sur les différents types.

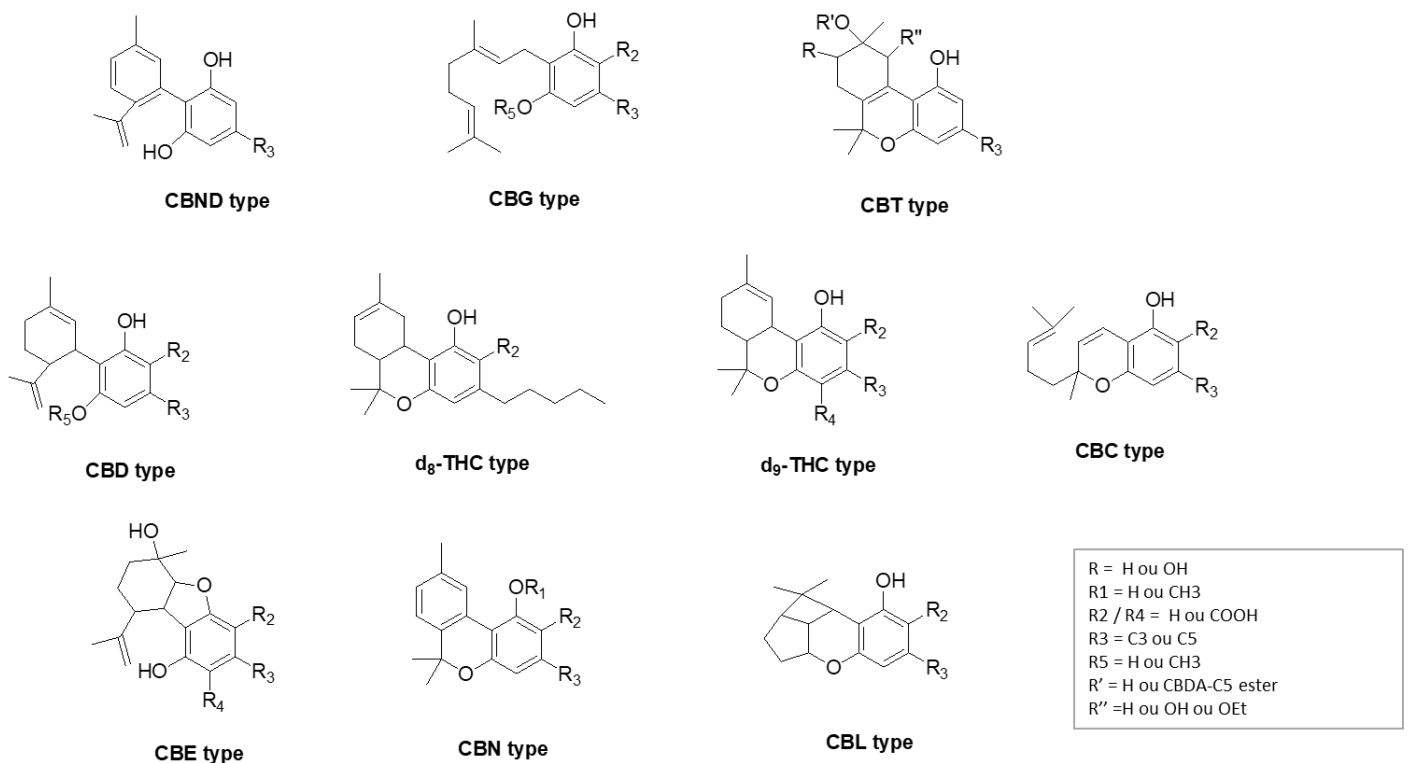


Figure 23 : Structures des 10 différents types de cannabinoïdes au sein de *Cannabis sativa* L.

Les cannabinoïdes, que l'on trouve principalement dans les trichomes glandulaires de *Cannabis sativa* L., ont suscité un grand intérêt scientifique en raison de leurs multiples et diverses propriétés pharmacologiques (Pacher et al., 2006). Celles-ci comprennent des effets analgésiques, anti-inflammatoires et psychoactifs (Russo, 2011). L'accès à ces composés dépend des méthodes d'extraction utilisées, dont le rendement et le profil métabolique peuvent varier pour une même plante.

### II.3.3. Polyphénols et alcaloïdes

Une grande partie des polyphénols est constituée des flavonoïdes et des stilbénoides. (Elsohly and Slade, 2005). Parmi les flavonoïdes les molécules suivantes ont pu être retrouvés : des flavanones tel que la naringénine ; des flavonols comme la myricétine, la quercétine ; et des flavones tels que l'apigénine, la lutéoline, le chrysoeriol et des cannflavines A et B. Les deux dernières sont exclusives au cannabis (Barron and Ibrahim, 1996).

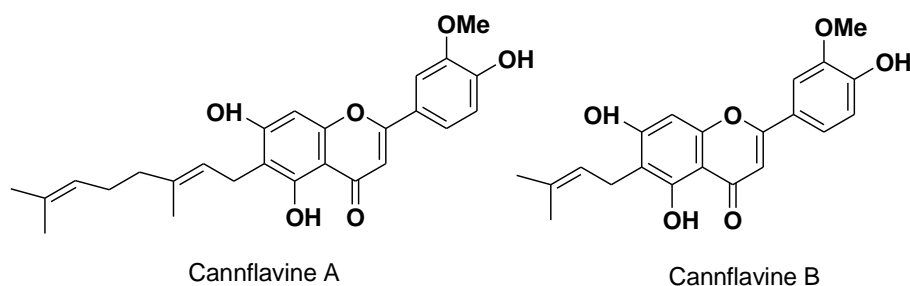


Figure 24 : Flavonoïdes isolés de *Cannabis sativa* L.

Les stilbénoides sont sous-divisée en trois groupes avec leurs molécules propres : les phénanthrènes avec les cannithrènes 1 et 2 ; les dihydrostilbènes comportant le canniprène et les cannastilbènes I et II ; et les spiroindanes tels que les cannabispirone et cannabispirone et cannabispirone (El-Feraly et al., 1986; Ross and ElSohly, 1996).

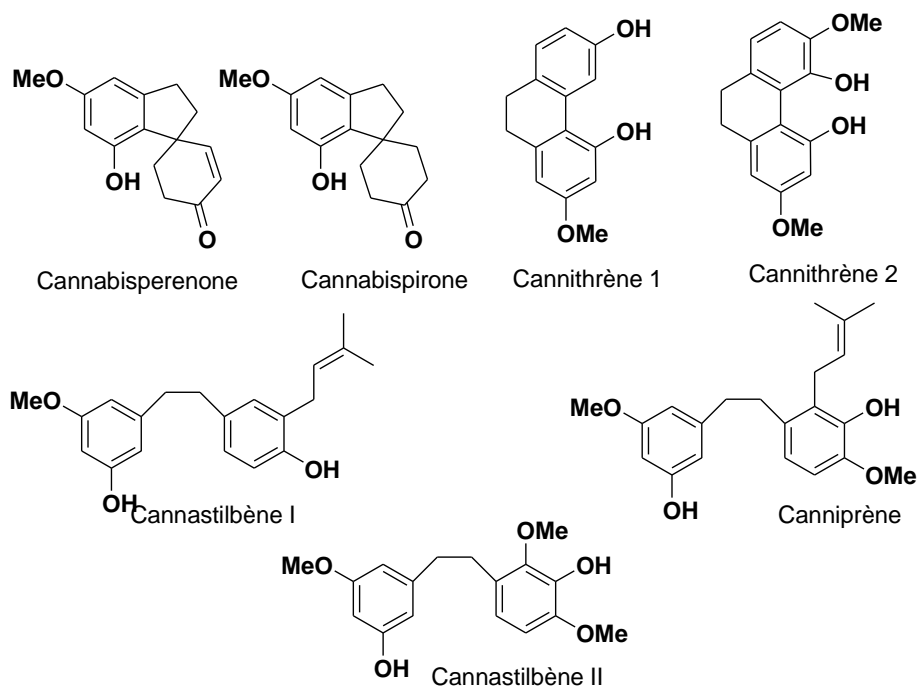


Figure 25 : Stilbénoides isolés de *Cannabis sativa* L.

Enfin, les alcaloïdes ont été référencés dans *Cannabis sativa* L. tels que des protoalcaloïdes avec la choline et la neurine ; des phénéthylamines comme l'hordenine ; des pyridines avec la trigonelline ; et de la piperidine et pyrrolidine (Pelletier, 1996; Turner et al., 1980).

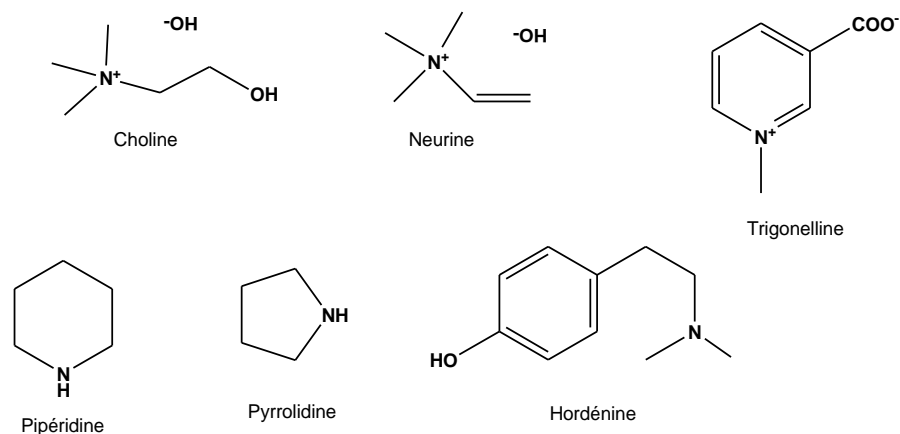


Figure 26 : Alcaloïdes isolés de *Cannabis sativa* L.

### II.3.4. Terpènes

Plus de 200 terpènes ont été identifiés dans le cannabis. Parmi eux, les monoterpènes et sesquiterpènes sont majoritaires, les diterpènes et triterpènes sont en faible proportion. Ce mélange spécifique au cannabis lui confère son odeur particulière. Il est important de relever que chaque paramètre de culture admet un impact sur la production de terpènes comme le type et le lieu de culture (lumière, stress, environnement etc.) ainsi que les procédés de traitements (extractions) et de conditionnement des parties de la plante (Brenneisen, 2007).

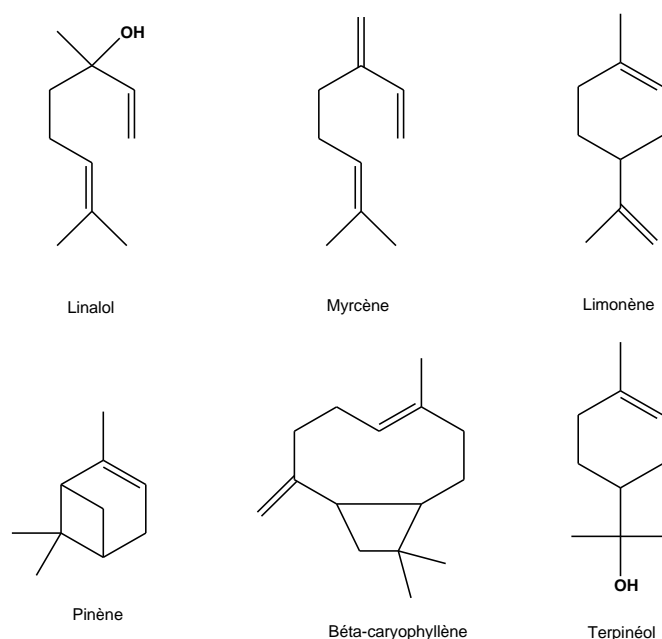


Figure 27 : Terpènes isolés de *Cannabis sativa*

Parmi tous les terpènes et terpénoïdes présentés ci-dessus, le bêta-caryophyllène est le plus abondant dans les huiles ou extraits obtenus à partir de la plante (Guy and Stott, 2005; Mediavilla, 1997).

Sa concentration est d'autant plus importante car la proportion de monoterpènes (par exemple de myrcène et limonène) est fortement réduite lors d'étapes de concentrations des résines (Hood et al., 1973).



## II.4. Méthodes d'extraction des phytocannabinoïdes

Comme les cannabinoïdes sont stockés dans les trichomes à la surface de la plante leurs obtentions ne nécessitent donc pas d'étape de broyage avec les différentes méthodes d'extractions à notre disposition.

Tableau 3 : Listes non exhaustives d'extractions et de leurs conditions expérimentales réalisées sur des inflorescences de cannabis

Techniques extractives	Matrice végétale	Solvants	Paramètres	Références
Macération sous agitation (SE)	Poudre de fleurs sèches	EtOH 96%	24 à 48 h ; 25 °C	(Baranauskaite et al., 2022)
	Fleurs broyés séchées	CHCl <sub>3</sub>	1h ; 25 °C	(Hillig and Mahlberg, 2004)
Ultrasons (UAE)	Fleurs broyés séchées	EtOH	10 à 60 min ; 20 à 40 °C	(Baranauskaite et al., 2022; Brighenti et al., 2017)
	Mélange de fleurs, feuilles, tiges séchées	MeOH / Eau (80/20)	15 min ; 25 °C	(Agarwal et al., 2018)
	Fleurs séchées	MeOH/CHCl <sub>3</sub> (90/10)	15 min ; 40 °C.	(Ribeiro Grijó et al., 2019)
Soxhlet	Poudre de fleurs sèches	AcOEt	3 h ; à ébullition	(Pandohee et al., 2015)
	Fleurs broyés séchées	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> ou MeOH	1 à 3 h ; à ébullition	(Wianowska, 2014)
Extraction assistée par micro-ondes (MAE)	Poudre de fleurs sèches	EtOH	5 min ; 60 °C	(Venturelli et al., 2019)
Extraction liquide sous pressions (PLE) - Subcritique	Poudre de fleurs sèches	MeOH	2 cycles de 5min (90% rinçage) ; 60°C	(Pavlovic et al., 2019)
	Fleurs broyés séchées	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> ou MeOH	1 à 3 cycles de 5 à 20 min (60% rinçage) ; 25 à 150°C	(Wianowska, 2014)
Extraction liquide sous pressions (PLE) - Supercritique	Poudre de fleurs sèches	CO <sub>2</sub> pur	2.5mL CO <sub>2</sub> /min ; 120 à 240 Bars ; 50 à 70°C ; 30 à 300min	(Ribeiro Grijó et al., 2019)
	Fleurs broyés séchées	CO <sub>2</sub> /EtOH (80/20)	2.5L CO <sub>2</sub> /min; 100 Bars ; 35°C ; 20min	(Tacchini et al., 2017)

La technique d'extraction par fluide supercritique est indéniablement reconnue comme la méthode la plus efficace. Cependant son installation et utilisation relèvent d'un coût financier non négligeable. Cette technique n'était donc pas forcément accessible au premier abord par des laboratoires. C'est dans cette optique que ce travail de thèse s'est intéressé aux autres méthodes d'extractions plus classiques et moins coûteuses tels que des macérations, l'utilisation d'ultrasons, de la pression ou encore des micro-ondes.

## II.5. Synthèses chimiques métabolites d'intérêts

Une des demandes de Centre Lab est d'une part de séparer et purifier les composés mais également de tenter d'obtenir du CBN à partir des molécules présentes dans notre variété de cannabis, c'est-à-dire à partir de THCA et THC.

De nombreuses réactions chimiques ont pu être proposées et développer pour obtenir ces composés dont la synthèse totale et l'hémisynthèse.

### II.5.1.1. Synthèses totales des cannabinoïdes

#### - THC :

La toute première synthèse de cannabinoïdes a été réalisée par Mechoulam et Gaoni juste après la détermination de la molécule après extraction de la plante (Mechoulam et al., 1967). Elle concernait l'obtention du d9-THC qui était nommé le d1-THC en raison des anciennes numérotations (où le C1 était le carbone relié au méthyle du cycle C).

La réaction du verbénol avec de l'olivétol dans le chlorure de méthylène en présence de l'acide p-toluènesulfonique (p-TSA) conduit à un mélange de trois composés qui ont été séparés par chromatographie sur Flurosil. Le 4-trans-(2-olivetyl) pinène a été obtenu avec 45% de rendement. Il a ensuite été traité au diéthylétherate de trifluorure de bore ( $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ ) dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et fournit le d8-THC (nommée en 1967 le d1(6)-THC) avec un rendement de 85%. Le d8-THC a également été directement obtenu avec la réaction du verbénol et olivétol dans  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$  (sans p-TSA). Une étape avec HCl suivie par de NaH permet d'obtenir du d9-THC avec un rendement de 55%.

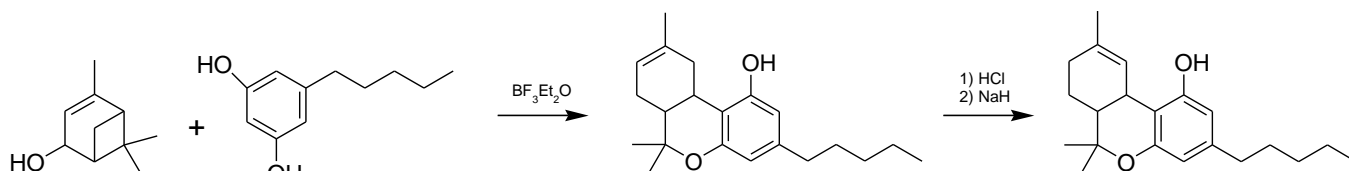


Figure 28 : Première synthèse du d8-THC et d9-THC adaptée selon Mechoulam et al., 1967

Une réaction de synthèse en une étape a été produite avec de l'olivétol et du citral avec  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ . Le problème de cette réaction est la formation simultanée de stéréo-isomères du d9-THC (Cis et trans) avec un faible rendement et difficile à séparer (Mechoulam, 1970).

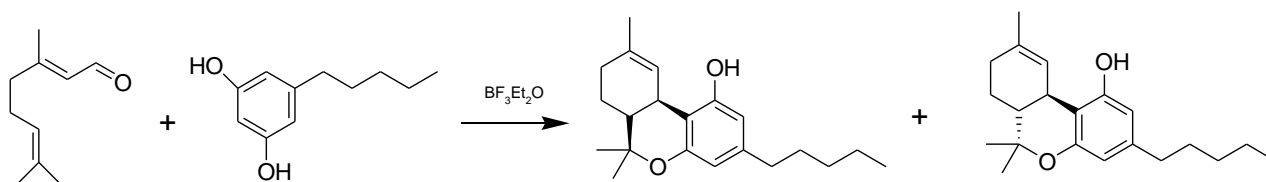


Figure 29 : Première réaction de synthèse one-pot du mélange racémique de d9-THC adaptée d'après Mechoulam, 1970

Cette réaction a été améliorée en 1974 par Razdan en changeant le citral par du (+)-p-mentha-2,8- dien-1-ol et en ajoutant  $\text{MgSO}_4$  à  $0^\circ\text{C}$  en plus du  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$  pour obtenir le d9-THC avec un rendement de 31 % (Razdan et al., 1974a).

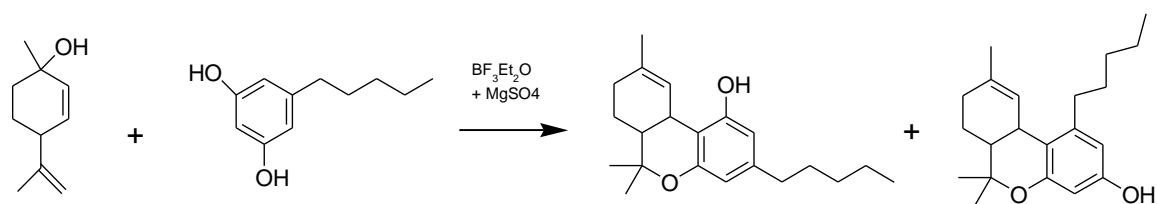


Figure 30 : Amélioration de la synthèse one-pot du d9-THC adaptée de Razdan et al., 1974

En 2012, Cheng et Xie propose des synthèses totales énantiosélectives en une dizaine d'étapes successives permettant d'obtenir soit le d8-THC (35% en 13 étapes) soit le d9-THC (30% en 14 étapes). Les premières étapes départ seraient donc un couplage croisé de Suzuki entre une R-iodoénone cyclique (4) et l'acide arylboronique (5). Il s'en suit des étapes d'hydrogénation asymétrique catalysée par le ruthénium, d'un dédoublement cinétique dynamique (DKR) et d'une cyclisation S<sub>N</sub>Ar intramoléculaire (Chen et al., 2012).

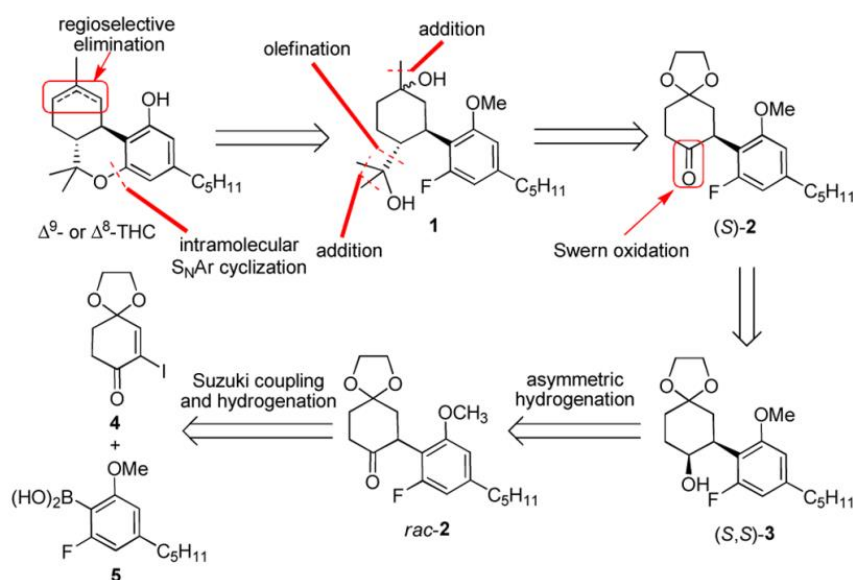


Figure 31 : Schéma de rétrosynthèse du d8-THC et d9-THC proposé par Chen et al., 2012

Le d8-THC est obtenu à partir de la réaction du composé 12 et d'acide p-toluènesulfonique monohydraté chauffé dans du benzène pendant 4h à reflux.

Pour le d9-THC, le composé 12 est disposé dans l'acide chlorhydrique et du chlorure de zinc pendant 3 h. La phase organique est récupérée après un lavage eau/éther. Après concentration, le résidu a été redissous dans le benzène et ajouté à une solution t-pentoxyde de potassium pendant 15 min à 65°C.

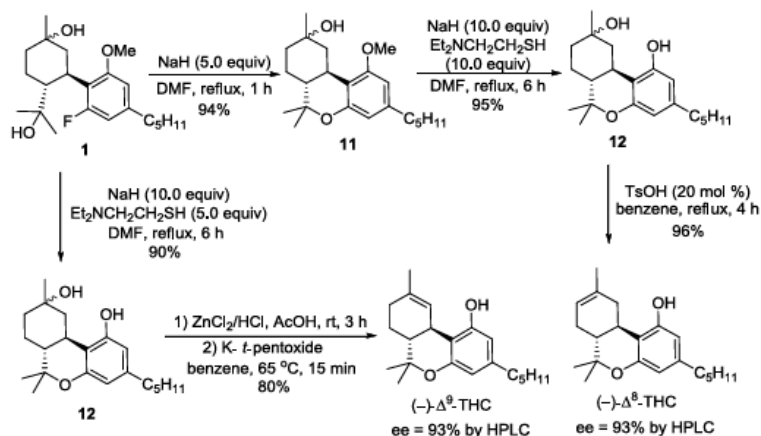


Figure 32 : Synthèse énantiosélective de d8-THC et d9-THC réalisée par Chen et al., 2012

L'utilisation de technologies de flux pour la synthèse d'analogues du THC a suscité un intérêt récent en raison des avantages offerts en termes de contrôle, d'efficacité et d'évolutivité. Bassetti et ses collaborateurs proposent une synthèse spécifique à chaque isomère du d8-THC et d9-THC en continu. La réaction est une cyclisation intramoléculaire du CBD catalysée en milieu acide. Ils ont optimisé l'obtention du d9-THC à 97% avec  $\text{AlCl}_3$  dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  pendant 18 min à 37°C. Le d8-THC a quant à lui été obtenues avec un rendement de 98% en utilisant du Trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (TMSOTf) dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  pendant 2 min à 25°C (Bassetti et al., 2023).

Normalement cette réaction entraîne la formation d'un mélange de produits à purifier. Le contrôle exact du nombre de mole des réactifs en continu avec les séparations adaptées permettent donc d'augmenter les rendements. Les influences de différents acides de Lewis et de Brønsted ont été étudiées sur la vitesse de réaction et la sélectivité. Chacun admet sa propre cinétique de réaction de conversion du CBD avec une production ou non de produits indésirables.

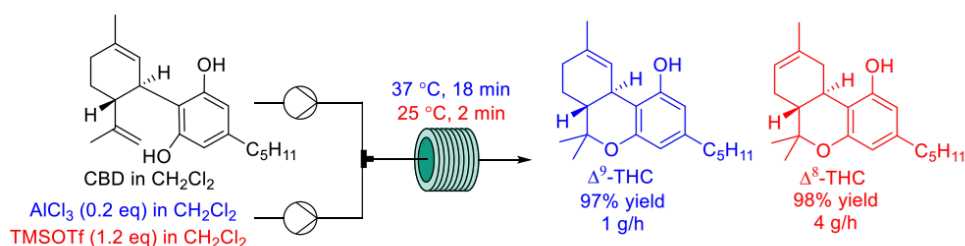


Figure 33 : Synthèse en continu de de d8-THC et d9-THC à partir par CBD selon Bassetti et al., 2023

Cette étude montre que le contrôle exact du temps de réaction est nécessaire afin de maintenir le contrôle d'une sélectivité orientée soit vers le d9-THC soit vers le d8-THC.

De nombreuses méthodes ont été développées pour la synthèse totale des tétrahydrocannabinols (d8-THC/d9THC) et encore plus pour ses analogues. Cependant, la synthèse du THC reste néanmoins très contraignante (contrôle de la racémisation) et couteuse par rapport à son extraction directe de la plante.

- CBD :

La synthèse de CBD a très souvent été concomitante aux synthèses du THC. La première synthèse est apporté par Petrzilka en 1967 Le N,N-Diméthylformamide-dinéopentylacétal permet la formation directe du (-)-cannabidiol à partir du (+)-trans- ou du (+)-cis-menthadiène et de l'olivétol dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pendant une durée de 63h à température ambiante. Un mélange racémique est obtenu contenant 25% de CBD, 29% de son isomère noté cis-CBD et 35% d'olivétol n'ayant pas réagi (Petrzilka et al., 1967).

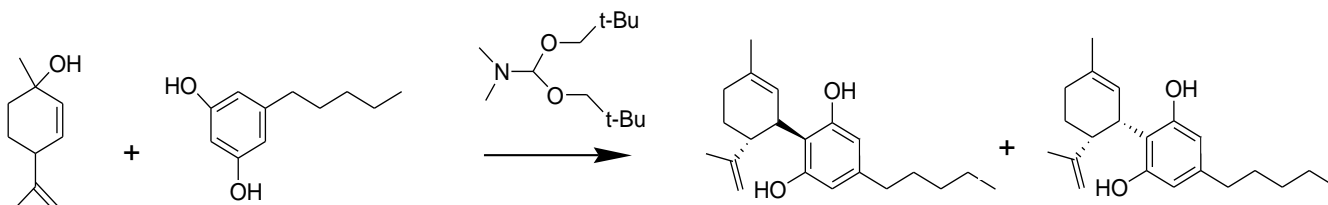


Figure 34 : Première synthèse one-pot du CBD adaptée Petrzilka et al., 1967

En 1974, Razdan synthétise du CBD alors que son objectif était d'obtenir du THC. Il a utilisé des conditions d'acides plus « douces » que pour la réaction de formation de THC au BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O ou p-TSA. Ainsi 0.3% de BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O ont été utilisé avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pour former du CBD (17 à 28% de rendements) (Razdan et al., 1974b).

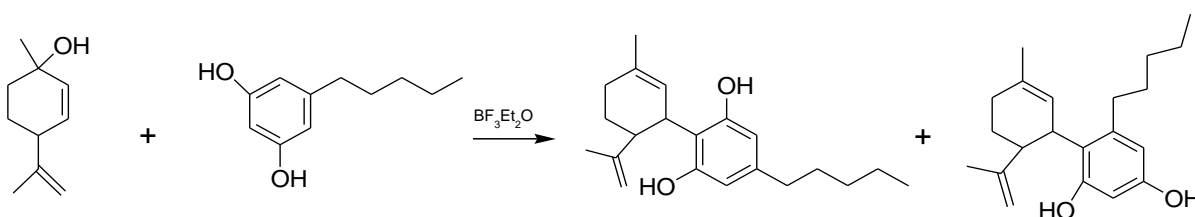


Figure 35 : Synthèse one-pot améliorée du CBD adaptée selon Razdan et al., 1974

En 1985, Baek et Mechoulam proposent une modification de la réaction de Petrzilka et de Razdan afin d'augmenter les rendements. Un catalyseur, de l'oxyde d'aluminium (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) est ajouté au BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Ce mélange est porté à ébullition avant d'ajouter le Mentha-2,8-dien-1-ol et l'olivétol (Baek et al., 1985).

Une méthode de synthèse alternative avec le 3,9-dibromocamphre et d'un organocuprate lithié a été réalisée. Le CBD est obtenu avec un rendement de 35% (Vaillancourt and Albizati, 1992).

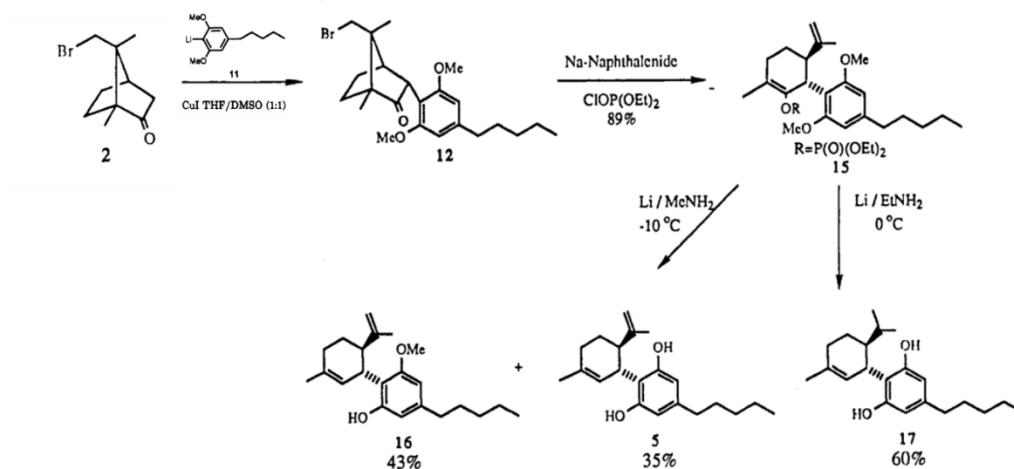


Figure 36 : Synthèse alternative en trois étapes du CBD d'après Vaillancourt et Albizati, 1992

Les synthèses de CBD sont effectuées par l'approche Diels-Alder, des additions anioniques ou cuprates de l'olivétol aux terpènes et de la condensation catalysée par un acide de l'olivétol et d'un terpène, qui est normalement suivie d'une cyclisation *in situ*. Cependant ces réactions entraînent soit la formation de mélanges racémiques ou bien induisent la cyclisation en dérivés du THC.

La synthèse en continue dans des meilleures conditions avec l'olivétol dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ou avec le  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$  dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a permis d'obtenir du CBD pur à un rendement de 55% (Chiurchiù et al., 2021).

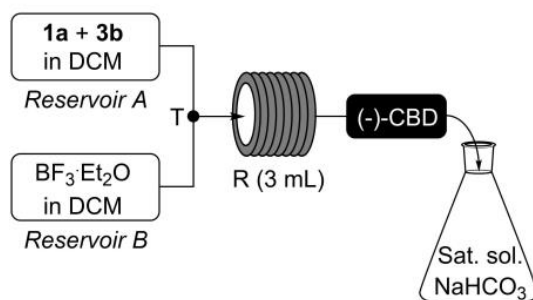


Figure 37 : Réaction de synthèse en continue (avec 1a=olivétol et 3b= acetyl isoperitenol) par Chiurchiù et al., 2021

- CBN :

Nous nous sommes intéressés à l'accès à ce composé car l'un des objectifs de ce projet de thèse était d'obtenir du CBN à partir du matériel végétal en notre possession.

Des réactions de synthèses totales du CBN ont également été proposées comme la synthèse celle à partir d'un intermédiaire de lactone avec l'utilisation du soufre qu'ils utiliseront des années plus tard pour l'hémi synthèse (Adams et al., 1940).

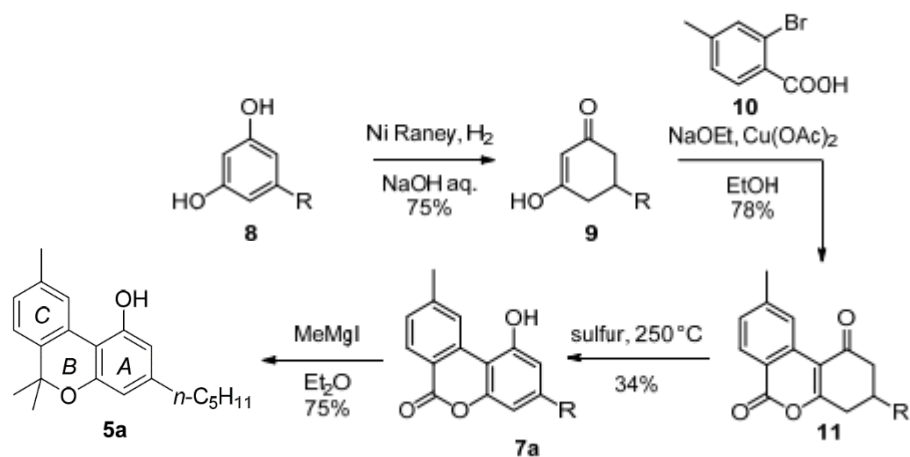


Figure 38 : Synthèse totale du CBN (R= n-pentyl) selon Adams et al., 1940

Néanmoins, cet exemple est l'un parmi tant d'autres et il existe de nombreuses réactions de synthèse.

### II.5.1.2. Réactions d'hémisynthèse du CBN

De nombreuses réactions pour former cette molécule sont étudiées et proposées au fil des années. Ces réactions se sont inspirées des améliorations de la première réaction de synthèse du CBN (Adams et al., 1940). Celle-ci a été réalisée en deux étapes, la première en milieu alcalin avec du sulfate de cuivre, la deuxième avec l'utilisation de soufre à haute température (250°C).

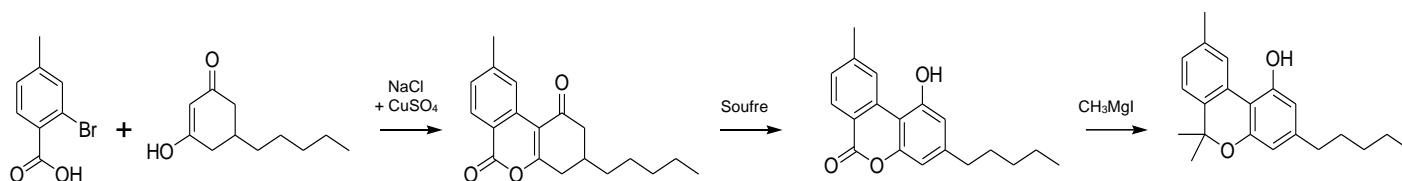


Figure 39 : Réaction de synthèse améliorée du CBN adaptée d'après Adams et al., 1940

En 1968, une déshydrogénation sélective du d9-THC a été effectuée par utilisation du chloranil avec du benzène porté à ébullition et fournit le CBN. Aucune réaction n'a été produite avec le d8-THC (Mechoulam et al., 1968).

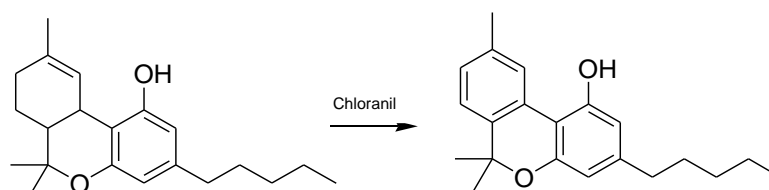


Figure 40 : Réaction d'hémisynthèse du CBN à partir de d9-THC adaptée selon Mechoulam et al., 1968

En 2007, la formation de l'acide cannabinoïque (CBNA) à partir du l'acide tétrahydrocannabinoïque (THCA) a été effectuée par l'utilisation de dioxyde de sélénium et de triméthylsilyl polyphosphate (PPSE) dans du chloroforme. Une décarboxylation permet d'obtenir le CBN à partir du CBNA (Bastola et al., 2007; Imamoto et al., 1981).

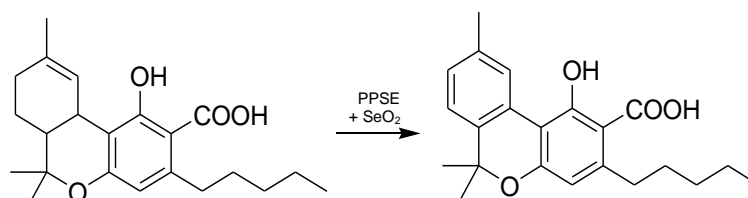


Figure 41 : Réaction d'hémisynthèse du CBNA à partir de d9-THCA adaptée de Bastola et al., 2007



Les réactions les plus récentes et simplifiées utilisent du CBD ou du d9-THC comme molécule de départ en présence d'un halogène. La réaction suivante est présentée avec de l'I<sub>2</sub> dans un solvant aromatique mais peut également se réaliser avec Br<sub>2</sub> ou Cl<sub>2</sub> (Pollastro et al., 2018).

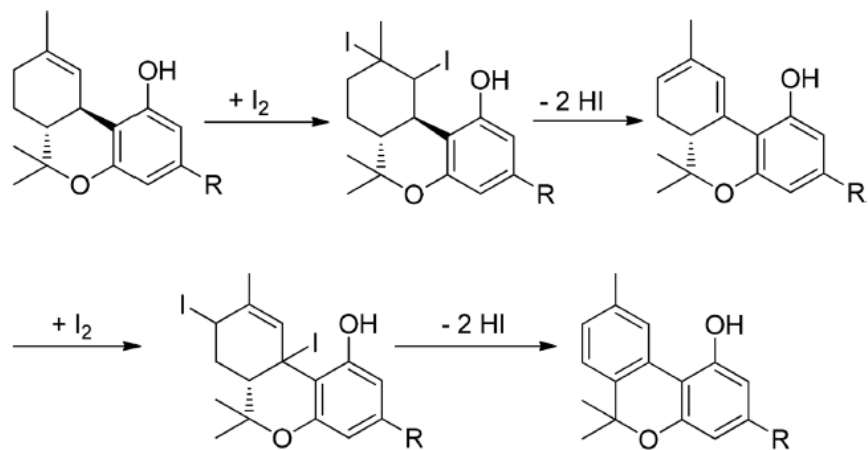


Figure 42 : Réactions d'hémisynthèse avec halogène du CBN à partir de d9-THC d'après Pollastro et al., 2018

Des études de décarboxylation du THCA en THC par simple chauffage à haute températures ont été réalisées à l'aide d'une étuve ou d'un four aux environ de 100 à 160°C. Les températures optimales sont 150 et 160°C avec une meilleure cinétique (Moreno et al., 2020). Néanmoins, même si ce n'est pas précisé clairement dans la littérature, nous pouvons nous attendre à la formation de multiples composés de dégradations (autres que le CBN) en cas de températures excessives.

## II.6. Système endocannabinoïde (Récepteur CB1/CB2)

### II.6.1. Fonctionnement du système

Ce système modulateur régule de nombreuses fonctions physiologiques présent dans le corps humain et chez tous les vertébrés. Il repose sur l'interaction entre plusieurs constituants : des récepteurs cannabinoïdes (nommés CB1 et CB2), des molécules spécifiques produis par le corps (endocannabinoïdes) et des enzymes (Lu and Mackie, 2016).

Les récepteur CB1 sont majoritairement présent au sein du système nerveux central et donc dans le cerveau (cortex, amygdale, hippocampe, ganglions de la base et cervelet). L'activation ou l'inhibition des récepteurs CB1 ont donc un impact sur la perception de la douleur, l'appétit, la cognition, la motivation, l'humeur, la mémoire et le fonctionnement neuromoteur. Les molécules agonistes de ces récepteurs seront celles entraînant donc les effets psychotropes.

Les récepteurs CB2 sont généralement situés sur les organes périphériques et régulent le système immunitaire. Ils sont retrouvés essentiellement au niveau du colon, de la moelle osseuse, des ganglions et de la rate. Leurs stimulations entraînent des effets anti-inflammatoires et analgésiques, ce qui en fait des cibles d'intérêts pour l'industrie pharmaceutique (Greco et al., 2014). Les agonistes de ces récepteurs sont les molécules non-psychoactives, à l'inverse de ceux du CB1.

Les effets d'activations de ces récepteurs sont multiples au sein des synapses. Ils entraînent des activations de protéines G, des inhibitions de messagers intracellulaire (Adénosine monophosphate cyclique = AMPc) et des inhibitions de neurotransmissions des neurones GABAergiques (excitateurs) glutamatergique (inhibiteurs), glycinergique, cholinergique, noradrénergique ou sérotoninergique (Powles et al., 2005; Szabo and Schlicker, 2005). Certaines études suggèrent également que l'activation des récepteurs CB1 pourrait induire à la formation de dimères, d'oligomères intra- et transcellulaires en fonction du tissu, expliquant les variations de résultats pharmacologique suivant les tissus étudiés (Wager-Miller et al., 2002).

### II.6.2. Endocannabinoïdes et cannabinoïdes

Il est important de distinguer les différents types de cannabinoïdes. En effet, trois sortes peuvent être évoquées : les phytocannabinoïdes, les cannabinoïdes de synthèse et les endocannabinoïdes.

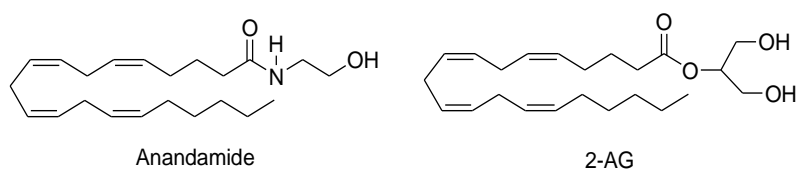


Figure 43 : Structures des endocannabinoïdes

Les endocannabinoïdes (ligands endogènes) sont produit au sein de notre organisme afin de réaliser leurs rôles de messagers du cerveau jusqu'au organes périphériques. Deux molécules majoritaires sont chargées de cette transmission de message : la N-arachidonylethanolamine (AEA) ou anandamide, découverte en en 1992 et le 2-arachidonoylglycerol (2-AG), découverte en 1995 (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995).

L'anandamide se lie sur les deux types de récepteurs mais préférentiellement à CB1 et présente une activité similaire à celle du THC (Bayewitch et al., 1995). La molécule est principalement dégradée par l'enzyme FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase), qui la convertit en éthanolamine et en acide arachidonique. Ainsi, les inhibiteurs de cette enzyme contrôlant l'activité de CB1 font l'objet de recherches pour une utilisation thérapeutique (Hwang et al., 2010).

Le 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) est un ester formé à partir de l'acide arachidonique et de glycérol. Il est présent à de fortes concentration au sein du système nerveux central induisant des effets neuromodulateurs (Sugiura et al., 1999). Le 2-AG est synthétisé à partir du diacylglycérol (DAG) contenant de l'acide arachidonique. Il peut être hydrolysé par la FAAH ou bien par des hydrolases. Des études *in vitro* récentes ont suggéré que le 2-AG est capable de stimuler une activation de la protéine G plus importante que l'anandamide (Savinainen et al., 2001).

Les structures moléculaires des phytocannabinoïdes et cannabinoïdes de synthèses admettent des affinités pour les récepteurs CB1 et CB2 et donc des effets potentiels sur notre organisme en interagissant sur le système endocannabinoïde (Felder et al., 1993).

### **II.6.3. Effets de la consommation de cannabis**

Par rapport à l'utilisation de THC, ses applications thérapeutiques et les études cliniques se multiplient depuis la connaissance et la compréhension du système endocannabinoïde et des effets neurologiques (Maroon and Bost, 2018).

Ce dernier apparait dans de multiples traitement potentiels contre des troubles gastro-intestinaux, de la douleur et des infections, des psychoses, de l'anxiété ou de la dépression, de l'anorexie, ainsi que dans le traitement de l'asthme (bronchiectasie), des tumeurs et de l'arthrite (Śmiarowska et al., 2022). Il possède également des propriétés antimicrobiennes et antiémétiques (de Meijer et al., 2003). Ces traitements sont appuyés par des études cliniques avec le d9-THC (Barrales-Cureño et al., 2020).

Concernant l'utilisation du CBD, de nombreuses options de traitements ont également été étudiées. Parmi ceux-ci les effets suivant ont été démontrés : un effet antiépileptique avec une réduction de moitié des convulsions (Devinsky et al., 2017), des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques (Hughes and Herron, 2019; Iuvone et al., 2004). Des effets protecteurs du CBD ont également été démontrés dans les études sur la maladie de Parkinson (Gomes et al., 2013) et en association avec d'autres psychoactifs pour la schizophrénie (Hallak et al., 2010). Enfin les principaux effets du CBD avec la fixation sur les récepteurs CB2 sont des utilisations en tant qu'anxiolytiques (Shannon et al., 2019) ou pour réduire les troubles comportementaux du sommeil (Chagas et al., 2014).

## II.7. Législations et expérimentation du cannabis médical

### II.7.1. Deux AMM : Epidiolex et sativex

Concernant l'utilisation de THC et CBD en tant que principes actifs au sein de l'Europe, le nombre de formes pharmaceutiques approuvées avec ces substances est très faible. Il existe beaucoup plusieurs formulations enregistrées en tant que compléments alimentaires. Ces formulations pharmaceutiques sont autorisées par la FDA (Food and Drug Agency) et l'EMA (European Medicine Agency). Les deux médicaments actuellement sur le marché sont l'épidyolex et le sativex.



Figure 44 : Epidiolex, traitement par voie orale de CBD

L'épidyolex est une solution buvable approuvée depuis 2018 ("EPIDYOLEX 100 mg/ml sol buv,"). Elle permet de fournir 100 mg de CBD par dose de 1mL. Ce médicament est indiqué dans le traitement adjuvant des crises d'épilepsies sous syndrome de Lennox-Gastaut (SLG), syndrome de Dravet (SD) ou associées à une sclérose tubéreuse de Bourneville (STB) chez les patients de 2 ans et plus. Pour les SLG et SD, l'épidyolex est prescrit en association avec du clobazam, un composé appartenant aux 1-5 benzodiazépines qui possède des propriétés semblables à celles des autres composés de sa classe (hypnotique, anticonvulsivante, myorelaxante, anxiolytique, sédative et amnésiante).



Figure 45 : Sativex, traitement par voie buccale de d9-THC et CBD

Le sativex, quant à lui, est un spray buccal qui possède une AMM depuis 2015 ("SATIVEX, solution pour pulvérisation buccale, Flacon 10 ml," 2014). Il fournit une dose de 27mg/mL de delta9-THC et 25mg/mL de CBD. Il est prescrit dans le traitement d'appoint utile pour le soulagement des symptômes de spasticité et pour le soulagement de la douleur neuropathique chez les adultes atteints de sclérose en plaques. Il est également utilisé pour un traitement analgésique d'appoint chez des adultes atteints de cancer avancé et présentant des douleurs modérées ou graves pendant le traitement opioïde.

## II.7.2. Expérimentation du cannabis thérapeutique en France

Une expérimentation est définie comme un test en conditions réelles de la mise en place d'une nouvelle politique publique. Cette étude possède deux objectifs précis : tester sur 3 ans la pertinence et la faisabilité de la mise à disposition du cannabis médical ; et acquérir des données scientifiques pour évaluer l'intérêt dans des situations cliniques très précises.

L'ensemble de l'expérimentation du cannabis médical est sous le contrôle de l'ANSM. Sa mise en place a été provoquée par des données prouvant l'intérêt thérapeutique du cannabis dans le traitement de symptômes de plusieurs pathologies, tout en sachant que son usage médical est admis dans de nombreux pays en Europe et dans le monde.

L'expérimentation de l'usage du cannabis médical a été autorisée par l'assemblée nationale en 2019 (article 43 de la loi n°2019-1446 du 24 décembre 2019 et article 57 de la loi n°2022-1616 du 23 décembre 2022). Officiellement, le premier patient a été inclus le 26 mars 2021. Le suivi est réalisé avec un comité scientifique temporaire créé en juin 2021. Il est composé de 16 membres dont des patients, professionnels de santé, médecins généralistes, spécialistes des indications thérapeutiques, pharmaciens et représentants des centres régionaux de pharmacovigilance. Ce comité a pour objectif de surveiller le déroulement du processus et de rendre des avis sur l'ensemble des données obtenues concernant l'utilisation par le patient et la gestion du transport et de stockages des médicaments entre les différentes structures.

Cinq indications thérapeutiques ont été retenues pour l'étude du cannabis thérapeutique sur 3000 patients jusqu'à la fin de l'expérimentation prévue pour décembre 2024 après une prolongation. Les indications sont les suivantes :

- Douleurs neuropathiques réfractaires aux thérapies accessibles ;
- Certaines formes d'épilepsie sévères et pharmaco-résistantes ;
- Certains symptômes rebelles en oncologie liés au cancer ou à ses traitements ;
- Situations palliatives ;
- Spasticité douloureuse de la sclérose en plaques ou des autres pathologies du système nerveux central.

La voie d'administration par fumée a été exclue en considérant les risques potentiels pour la santé des patients. Il a donc été fourni aux patients deux traitements : des huiles à administrer par voie orale ou des inflorescences à vaporiser pour des inhalations.

Chaque patient a une ordonnance sécurisée et un suivi mensuel. Il est référencé sur un registre électronique national de suivi (ReCann). Les médicaments contenant plus de 0,3 % de THC sont considérés comme stupéfiants. Les autres sont soumis au régime des médicaments de la liste I des substances vénéneuses (décret n°2023-202 du 25 mars 2023).

Enfin, les médicaments sont disponibles selon différents ratios (proportions) THC/CBD : THC dominant (des fleurs THC > 8 % ; des huiles THC > 5 mg/ml), ratio équilibré en THC et CBD (des fleurs THC/CBD > 5 % ; des huiles THC/CBD > 5 mg/ml) et CBD dominant (des fleurs THC < 5 % CBD > 5 % et des huiles THC < 1 mg/ml, CBD > 5 mg/ml). La dose maximale journalière prescrite par le médecin est de 120 mg de CBD et/ou 40 mg de THC.

Chaque fournisseur doit être en partenariat avec un laboratoire pharmaceutique. Dans le cadre de cette thèse, LITTLE GREEN PHARMA (LGP) était en association avec INTSELCHIMOS.

# Partie III

## Matériels et méthodes expérimentales





## Partie III. Matériels et méthodes expérimentales

---

### III.1. Matériel végétal

Les cônes de houblon séchés (*Humulus lupulus* L.) ont été achetés aux Laboratoires IPHYM (Jonage, France). Ils ont été conservés dans un endroit sombre et sec à température ambiante.

Deux lots mis sous vide de fleurs séchées de *cannabis sativa* L. ont été fournis par Little Green Pharma Ltd (LGP, West Perth, Australie). Le premier lot R&D F-2110-031 est dit THC dominant (14.6% THC) et le second lot F-2201-043 R&D est CBD dominant (<0.3% THC). L'ensemble des fleurs est stocké à l'obscurité au congélateur à -20 °C.

### III.2. Equipements

Les extractions (la fleur de cannabis ou les cônes de houblon) ont été réalisées avec les équipements suivants : plateau d'agitation Orbital Shaker SSL1 Stuart (Fisherscientific, Illkirch, France), bain à ultrasons Bioblock Scientific 88156 XUB 10 (Grant instruments, Cambridge, Great Britain), sonde à ultrasons Vibra-cell 75186 (Sonics and Materials, Newtown, CT, USA), micro-onde de réaction de synthèse Monowave 300 (Anton Paar, Les Ulis, France), extracteur assisté sous pression Dionex ASE 150 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

L'extraction à basse température (plan d'expérience) a nécessité un montage comprenant un bioréacteur double enveloppe 100mL (Grosseron, Couëron, France) et une pale d'agitation contrôlé par un agitateur à pales RW16 basic (IKA-Werke, Staufen, Allemagne). Le milieu a atteint des températures négatives grâce à un thermofluide siloil M60 115/200.05 d'un bain réfrigérant ministat 230 Pilot one (HUBER, Mommenheim, France).

Les extraits obtenus ont été concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif (Buchi R-100, Villebon-sur-yvette, France) et d'un speeddry RVC 2-33 CD Plus (Christ, Osterode, Germany).

Les absorbances des extraits ont été analysées par un spectrophotomètre UviLine 94000 (VWR, Fontenay-sous-Bois, France).

Le système de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse était composé d'une GC-2010Plus et d'un GCMS-QP2010SE (Shimadzu, Marne la vallée, France). Les molécules volatiles ont été adsorbées sur une fibre de carbone SPME Fiber assembly 75µm Car/PDMS (SUPELCO ; Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) avant d'être désorbées dans l'appareil et séparées dans la colonne GC Zebron ZB-5ms ; 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm (Phenomenex, Le Pecq, France).

La quantification et l'analyse par LC-MS/MS ont été effectuées à la plateforme Biscem de Limoges à l'aide d'une chaîne de chromatographie liquide Nexera X2 (Shimadzu Corporation, Noisiel, France) couplé à un spectromètre de masse en quadruple temps de vol (QTOF) TripleTOF@5600+ (Sciex, Concord, Canada). Les extraits de houblons ont été séparés sur une colonne Atlantis T3 ; 5µm, 2.1x150 mm (Waters, Guyancourt, France) et les extraits de cannabis par une colonne NUCLEODUR C18 Isis ; 5µm, 3x250 mm (Macherey Nagel, Hœrdt, France).

La préparation des comprimés sublinguaux a été réalisée à l'aide d'un mélangeur Turbula T2C (WAB S.À.R.L., Sausheim, France) et d'une machine de compression (FROGERAIS, Yvry-sur-Seine, France). Les analyses pharmacotechniques ont nécessité un duromètre



Schleuniger-2E (FROGERAIS, Yvry-sur-Seine, France), un appareil de désagrégation ZT3 et un appareil de friabilité Apparatebau (ERWEKA, Gif-sur-Yvette, France).

### III.3. Réactifs et solvants

Les solvants : acétone, acétonitrile, acétate d'éthyle, eau, éthanol absolu, cyclohexane, n-Hexane, toluène et méthanol utilisés pour les analyses ou les extractions étaient de qualité HPLC. L'eau est purifiée sur site par un distillateur Autostill Freshman4 (Jencons Scientific, Lutterworth, Royaume-Uni). Les autres solvants de grade HPLC ont été fournis par Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France) et VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France).

Les multiples réactifs de ce projet ont été stockés selon leurs recommandations à température ambiante, au réfrigérateur (4°C) ou congélateur (-20°C) en attendant d'être employés.

Les réactifs utilisés tels que de Folin-Ciocalteu, NaOH (5N), Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0.1N), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (solide,98%), NaNO<sub>2</sub> (solide,98%) et AlCl<sub>3</sub> (solide,99%) proviennent de Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France) et de Thermoscientific (Illkirch, France).

L'iode cristallisé a été fourni par la Coop. Pharmaceutique Française (Melun, France) et le NaCl (solide) de Cooper (Ponthierry, France).

Les excipients utilisés tel que PROSOLV® Easytab SP, primellose, aspartame et silice colloïdale ont été fournis JRS Pharma (Saint Germain en Laye, France) et Cooper (Ponthierry, France).

Les standards utilisés acide gallique, de quercétine, de DPPH et Trolox sous formes solides proviennent de Thermoscientific (Illkirch, France) et Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA).

La lupulone (solide) a été fournie par TRC Canada (North York, Canada), le xanthohumol et isoxanthohumol (solides) par TargetMol (Massachusetts, USA).

Les cannabinoïdes en solution à 1mg/mL dans du méthanol (CBGA, THCA, d8-THC, d9-THC, CBDA, CBD et CBN) proviennent de LGC-Dr Ehrenstorfer (Molsheim, France).

Les terpènes β-Myrcène, (S)-(-)-Limonène et β-Pinène (≥97%) ont été stabilisés sous forme liquide par Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Le CBD (solide, origine végétale, > 99.5%) a été fourni par Fagron (Thiais, France).

### **III.4. Méthodes d'extractions**

Toutes les manipulations ont été effectuées en triplicat avec un rapport solide/liquide de 1/10 dans EtOH 96% pour le houblon et de 1/15 dans EtOH absolu pour le cannabis. Préciser cas EtOH à 96% ou 100%.

Les cônes de houblon ont été broyés à l'aide d'un microtron MB550 (Kinematica AG, Luzern, Suisse) pour obtenir des particules d'une taille de 1 à 2 mm.

Les fleurs de cannabis n'ont subi aucun prétraitement de broyage avant extraction. Après filtration et concentration du solvant sous pression réduite (40 °C), les extraits obtenus ont été conservés à -20 °C jusqu'à utilisation ultérieure.

Pour les extractions hydrométhanolique ou aqueuse, le Speed Dry a été utilisé à 40 °C et 1500 rpm afin d'éliminer les traces d'eau.

Les extraits concentrés et stockés au congélateur peuvent être entreposés à cette température pendant un maximum de 5 ans. A température ambiante, les échantillons sous forme de résine ne peuvent être conservés pendant une courte période (<4 semaines) à température ambiante. Les températures positives entraînent une dégradation des cannabinoïdes et une augmentation de la concentration en CBN (Stolker et al., 2004).

#### **III.4.1. Méthodes d'extractions**

##### **III.4.1.1. Macération sous agitation (SE)**

Elle a servi de témoin pour comparer l'ensemble des rendements massiques obtenus avec les autres techniques.

Les protocoles de macération ont été inspirés des travaux précédents avec quelques modifications (Baranauskaite et al., 2022; Hillig and Mahlberg, 2004).

Des essais préliminaires ont été réalisés sur les cônes de houblons pour étudier une plage de temps d'extraction. Deux grammes de poudre ont été agités ( $v = 150$  rpm) dans 20 mL EtOH 96% pendant une durée de 30 min, 1 h, 2 h, 3 h ou 4 h. L'extrait obtenu a été filtré sur Büchner avant d'être concentré et stocké. Le protocole définitif s'avère être celui d'une durée de 2 h.

Pour la macération à froid en bioréacteur, la suspension de 15 g de fleurs dans 225 mL d'EtOH absolu a été agité pendant 2 h ( $v = 150$  rpm) à une température fixe comprise entre 30 à -30 °C avant d'être filtrée et concentrée.

##### **III.4.1.2. Extraction assistée par ultrasons (UAE) et couplage avec macération (UAE+SE)**

Le principe repose sur l'utilisation d'ondes ultrasons alternant entre hautes et basses fréquences à la surface de la matrice végétale en solution entraînant la formation de bulle de cavitation. Ces dernières vont fragiliser les parois et membranes cellulaire en implosant. Cette technique permet d'accélérer les extractions tout en augmentant les rendements. Un bain à ultrasons ainsi qu'une la sonde à ultrasons ont été utilisés. Il est à noter que dans les deux cas, une hausse de température du milieu est observée. Il y a donc possibilité de dégradation des molécules fragiles si la de température n'est pas contrôlée.

De multiples études sur les extractions à l'aide d'ultrasons ont permis d'inspirer les travaux réalisés (Venturelli et al., 2019).

Des essais préliminaires ont été réalisés sur le houblon afin de déterminer le temps d'extraction. Dans un erlenmeyer, 2 g de poudre dans 20mL d'éthanol 96% ont été disposés dans un bain à ultrasons pendant 10, 20, 30, 40, 50 ou 60 min à température ambiante.

Après avoir déterminé la zone d'intérêt entre 10 et 20 min, cette expérience a été reproduite en utilisant soit la sonde ou soit le bain à ultrasons pendant une durée de 5, 10 et 15 min. La sonde a été paramétrée comme suit : 12W, 100% amplitude, 0 seconde On/Off.

Pour la combinaison de techniques utilisant les ultrasons suivis d'une macération sous agitation (UAE+SE), les mélanges ont été maintenus 15 min à 25 °C soit dans le bain à ultrasons (UAE-B) ou en contact avec la sonde à ultrasons (UAE-P). Après ce traitement, le mélange a été agité pendant 2 h sur le plateau à 150 rpm.

### III.4.1.3. Macérations successives et triphasiques

Le but de la macération successive est de tenter d'épuiser entièrement la matrice végétale en composés extractibles par l'utilisation successive de solvant à polarité croissante (du moins polaire au plus polaire) afin d'obtenir le plus large éventail de molécules extraites possibles.

Quatre macérations successives d'une heure sous agitation ont été réalisées avec 2 g de matériel végétal dans l'hexane, puis à AcOEt, puis EtOH, puis H<sub>2</sub>O/EtOH 70/30. Le marc a été récupéré à chaque étape et réutilisé dans la macération avec le solvant suivant. Les quatre extraits ont été concentrés sous vide ensemble pour obtenir un extrait « full spectrum ».

La macération triphasique est une solution « one pot » à la macération successive. Elle entraîne l'épuisement du solide en composés extractibles plus rapidement en mélangeant plusieurs solvants d'extractions de différentes polarités et non miscibles entre eux. Cette non-miscibilité offre la possibilité ou non de séparer les phases d'intérêt par décantation. Le nombre de solvants ainsi que le ratio de chacun sont à déterminer suivant le pull de « molécules souhaitées » lors de l'extraction.

Le mélange de solvants suivant : C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/ AcOEt/ ACN / H<sub>2</sub>O (2/3/3/2) a été ajouté à 2 g de matériel végétal dans une proportion définie (1/10 ou 1/15). La suspension a été agitée pendant 2 h à 25 °C et filtré sur Büchner. Le filtrat a été placé dans une ampoule à décanter. Le marc résultant a été rincé avec C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> et H<sub>2</sub>O. Trois phases se sont formées : une phase organique supérieure (hexane), une phase intermédiaire (AcOEt et ACN) et une phase aqueuse inférieure (eau). Les trois phases ont été récupérées et concentrées sous vide ensemble pour obtenir un extrait « full spectrum ».

### III.4.2. Extraction par Soxhlet

Le principe est basé sur une extraction continue par percolation des vapeurs de solvant qui retombent sur la matrice végétale placée dans une cartouche en cellulose, elle-même insérée dans la chambre d'extraction d'un appareil Soxhlet. Un ballon avec un solvant organique est connecté en dessous de cette chambre.

Concernant les méthodes d'extraction par Soxhlet, les protocoles des travaux réalisés ont été modifiés par rapport aux études sur cette technique (Pandohee et al., 2015).

Le protocole d'extraction qui a été utilisé est le suivant : 15 g de fleurs de cannabis sont ajoutés dans la cartouche et 250 mL EtOH absolu dans le ballon. Le solvant est porté à ébullition sur une durée de 4 h après le premier cycle de vidange de l'extracteur.

### III.4.3. Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

Les méthodes conventionnelles de chauffage (par plaque ou étuve) transfèrent l'énergie thermique depuis une source de chaleur (résistance) jusqu'au mélange de solvant et matériel végétal. Le chauffage provient de l'extérieur et va vers l'intérieur de manière hétérogène. A l'inverse, le chauffage diélectrique crée par les ondes micro-ondes est un chauffage interne au cœur de la solution et de manière homogène (« in-core heating »). L'énergie électrique envoyée forme un champ micro-ondes qui est convertie en énergie cinétique grâce à la présence de molécules dipolaires et d'ions chargés. Et leurs oscillations permettent de générer l'énergie thermique utilisée pour l'extraction. Ainsi les propriétés diélectriques des solvants (notées  $\tan \delta$ ) utilisées sont un paramètre primordial et les solvants plutôt polaires tels que l'éthanol ou l'eau seront ainsi favorisés.

Le protocole réalisé a été inspiré des travaux de Venteurelli en 2019 avec quelques modifications de températures.

L'extraction a été réalisée dans un réacteur de synthèse à micro-ondes Monowave 300 en 5 ou 15 min. Une cellule en verre de 30 ml a été remplie avec 1 g de houblon broyé ou de cannabis dans EtOH. La puissance de l'appareil est réglée à 150 W, l'agitation à 600 rpm, à une température comprise de 50 à 150 °C et la valeur l'étape de refroidissement de 30 °C.

### III.4.4. Extraction liquide sous pression (PLE)

Elle repose sur le fait d'accélérer les procédés d'extractions traditionnelles en utilisant des solvants à hautes températures et hautes pressions.

Les expériences réalisées ont été inspirées de précédentes recherches (Wianowska, 2014) et d'essais préliminaires réalisés en laboratoire. L'extracteur ASE<sup>®</sup> 150 Dionex (Accelerated Solvent Extractor) a été utilisé à une température allant de 25 à 200°C et à une pression fixe de 100 bars.

Les bouteilles ont été remplies de solvant d'extraction (éthanol ou mélange éthanol/eau). Pour l'extraction, 2 g matériel végétal ont été chargés dans une cellule d'extraction en acier inoxydable de 10 ml, comblés avec du sable de Fontainebleau. La cellule a ensuite été placée dans l'ASE 150 et la poudre a été extraite avec EtOH ou EtOH/ H<sub>2</sub>O (70/30 ou 30/70) en utilisant les paramètres suivants : température (de 25 à 150 °C), trois cycles statiques de 5 min, volume de rinçage de 75% et temps de purge de 60 s.

Le filtrat ainsi obtenu est concentré sous pression réduite à l'aide de l'évaporateur rotatif et fournit ainsi l'extract brut.

### III.5. Rendement massique

Le rendement massique est le premier résultat accessible après la réalisation d'une extraction. Il permet de connaître le pourcentage d'extrait brut obtenu par rapport à la masse du matériel végétal initialement utilisée pour l'extraction. La formule qui a été utilisée pour déterminer le rendement massique est la suivante :

$$\text{Rendement massique (\%)} = 100 \times \frac{\text{masse extrait brut finale (mg)}}{\text{masse initiale fleurs (mg)}}$$

Tableau 4 : Rendements massiques obtenus après les 11 extractions réalisées sur les cônes de houblons broyés

	Rendements massique (%)
SE	8.7 ± 0.3
UAE-B +SE	10.1 ± 2.1
UAE-P +SE	14.9 ± 1.1
Triphasic SE	14.9 ± 0.7
PLE 25	8.9 ± 0.2
PLE 75	20.4 ± 0.4
PLE 125	28.0 ± 0.4
PLE 75 (30% H <sub>2</sub> O)	31.7 ± 1.2
PLE 75 (70% H <sub>2</sub> O)	27.1 ± 5.2
MAE 75 (5)	12.6 ± 0.9
MAE 75 (15)	13.0 ± 1.2

Tableau 5 : Rendements massiques obtenus après les 24 extractions réalisées sur les fleurs de cannabis (lot « THC dominant » )

	Rendements massique (%)		Rendements massique (%)
PLE 25	23.3 ± 1.9	SE 0	21.9 ± 2.4
PLE 50	25.7 ± 1.3	SE -10	21.8 ± 2.3
PLE 75	25.1 ± 3.8	SE 25	22.2 ± 1.1
PLE 100	28.5 ± 1.9	SE 50	24.9 ± 1.0
PLE 125	28.4 ± 1.0	SE 25 H <sub>2</sub> O	9.8 ± 0.3
MAE 50 (5)	21.8 ± 1.7	SE 50 H <sub>2</sub> O	14.4 ± 3.0
MAE 75 (5)	22.3 ± 2.7	Soxhlet	24.8 ± 1.3
MAE 100 (5)	22.2 ± 2.3	Successiv SE	34.0 ± 1.2
MAE 125 (5)	21.6 ± 0.9	Triphasic SE	21.3 ± 3.0
MAE 50 (15)	21.5 ± 2.8	UAE-B +SE	20.8 ± 0.5
MAE 75 (15)	24.6 ± 4.6	UAE-P +SE	22.8 ± 0.3
MAE 100 (15)	22.2 ± 1.9		
MAE 125 (15)	22.9 ± 2.9		

### III.6. Séparations et purifications

#### III.6.1. Préparations révélateurs et phases d'élutions

Il est important de noter que toutes les fractions récupérées ont été regroupées selon les CCM de suivi dans cyclohexane/acétate d'éthyle 90/10 ou 70/30 à l'ANS, avant d'être évaporées à sec à l'évaporateur rotatif et/ou SpeedDry. Elles ont ensuite été stockées à -20 °C au congélateur à l'abri de la lumière. Concernant les révélateurs, deux ont étudiés pendant ces travaux : le FBBS et l'ANS.

Le FBBS semble spécifique aux cannabinoïdes. La molécule de FBBS se complexe par son groupement diazo sur le cycle aromatique des cannabinoïdes, ainsi il rend ces derniers détectables par colorimétrie par une couleur rougeâtre (Dos Santos et al., 2016; França et al., 2020).

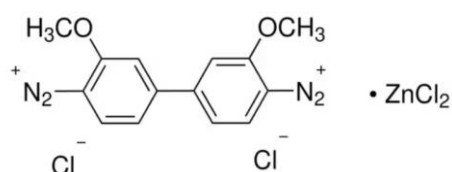


Figure 46 : Molécule de FBBS (Fast Blue B Salt)

Plusieurs solutions d'essai sont ainsi préparées à 5 mg/mL : FBBS H<sub>2</sub>O distillée ; FBBS EtOH absolu ; FBBS HCl / EtOH (2 :10) et FBBS NaOH 0.1M.

L'ANS est quant à lui un révélateur universel fréquemment utilisé. Son principe repose sur l'ajout d'un chromophore par complexation sur les molécules aromatiques et les rend identifiables par coloration. La solution d'ANS se prépare dans une bouteille avec 895 mL de MeOH et 5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. On rajoute ensuite avec précaution 100 mL d'acide acétique glacial. Une fois l'ANS vaporisé sur la plaque CCM, il est nécessaire de placer cette dernière 5 min à l'étuve pour la révélation.

Les tests d'élutions ont été réalisés sur différentes phases mobiles afin de mieux comprendre le profil des extraits sur plaque CCM ainsi que leurs mobilités sur silice. Les phases mobiles C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/ AcOEt testées sont à 98/2 ; 95/5 ; 90/10 ; 70/30 et 50/50.

Tableau 6 : Récapitulatif des R<sub>f</sub> des standards d9-THC, d8-THC et CBN

C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> / AcOEt	98/2	95/5	90/10	70/30
R <sub>f</sub> CBN	0.21	0.32	0.49	0.76
R <sub>f</sub> d8-THC	0.27	0.41	0.6	0.85
R <sub>f</sub> d9-THC	0.24	0.37	0.56	0.83

Les étapes de séparation ont été effectuées en phase normale par Flash (colonne) ou MPLC avec l'utilisation de solvant tels que C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> et AcOEt. Plusieurs étapes de séparations (>3 ou 4) sont nécessaires afin d'obtenir des cannabinoïdes purs à partir des extraits (Madaka et al., 2021).

### III.6.2. Séparations du THCA et d9-THC sur résines brute de cannabis

La résine brute de cannabis a été séparée avec les techniques de colonnes LH-20 Sephadex, en phase normale et de CCM préparatives.

Le principe de purification sur LH-20 repose sur l'exclusion stérique des molécules qui traversent la phase stationnaire. En fonction de leurs tailles, elles sont plus ou moins ralenties lors de leurs passages et sont donc éluées plus ou moins rapidement dans le MeOH. Les plus grosses molécules ne sont pas ralenties par les interstices de différentes tailles des billes de silices contrairement à celles de plus petites tailles qui sont éluées en dernier.

La chromatographie sur colonne en phase normale utilise une phase stationnaire polaire et une phase mobile ou éluant moins polaire (ex C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/ AcOEt ou C/A). L'extrait à séparer est dissous dans un minimum de solvant et appliqué sur le dessus de la colonne remplie de silice. Le solvant, ajouté au-dessus de la colonne, descend par gravité (LC) ou sous pression (MPLC), entraînant les composés le long de la colonne. Les composés polaires interagissent fortement avec la silice et se déplacent lentement, tandis que les composés moins polaires ont moins d'affinités pour la phase stationnaire et sont élués plus rapidement.

Le principe de la séparation par chromatographie sur plaque préparative repose sur le même que celui des CCM utilisés. Elle ne peut être utilisée qu'avec un maximum de 30 à 50 g d'extrait ou fraction par plaque. Un dépôt sur plusieurs plaques reste possible lorsque l'extrait comporte une masse de plusieurs centaines de mg.

L'extrait de cannabis issu de la macération à froid (SE 0°C) (1.004 g) a été fractionné sur gel de Sephadex (20 g) et élué avec le MeOH (100%). Dix fractions ont été obtenues.

Tableau 7 : Masse (en mg) des fractions obtenues lors de la séparation VP1

Fractions VP1	Masses obtenues (mg)
1	3.6
2	30.9
3	61.3
4	154.8
5	509.2
6	127.8
7	15.4
8	7.7
9	7.9
10	3.4

Les fractions VP1-5 et 6 ont été rassemblées (637 mg) et purifiées sur colonne de silice (60 g) avec un gradient C/A de 98/2 à 50/50. Dix fractions ont été obtenues.

Tableau 8 : Masse (en mg) des fractions obtenues lors de la séparation VP2

Fractions VP2	Masses obtenues (mg)
1	17.9
2	27.2
3	273.1
4	25.4
5	120.2
6	29.8
7	31.4
8	54.6
9	31.2
10	22.7

La fraction VP2-2 (27.2 mg) a été purifiée sur plaque CCM préparative avec un gradient C/A de 90/10. Sept fractions ont été obtenues.

Tableau 9 : Masse (en mg) des fractions obtenues lors de la séparation VP3

Fractions VP3	Masses obtenues (mg)
a	0.9
b	0.5
c	0.8
d	16.2
e	1.5
f	1.0
g	2.7

La fraction VP2-3 (273.1mg) a été purifiée sur colonne de silice (40g) avec un gradient C/A de 95/5 à 50/50. Quatre fractions ont été obtenues.

Tableau 10 : Masse (en mg) des fractions obtenues lors de la séparation VP4

Fractions VP4	Masses obtenues (mg)
1	11.1
2	6.6
3	76.4
4	177.6

Les fractions VP4-1, 2 et 3 ont été rassemblées (94.1 mg) et purifiés sur LH-20 (20g) avec le MeOH comme éluant. Trois fractions ont été obtenus.

Tableau 11 : Masse (en mg) des fractions obtenues lors de la séparation VP5

Fractions VP5	Masses obtenues (mg)
1	12.9
2	72.3
3	4.8



### III.6.3. Séparations du CBN et d8-THC sur résines décarboxylée de cannabis

Les résines décarboxylées de cannabis ont été séparées avec les techniques de Flash chromatography (MPLC) et de CCM préparatives.

La chromatographie flash repose sur le principe de séparation par polarité et le partage d'affinité des molécules entre la phase mobile et la phase stationnaire. Il est identique à la technique de séparation en colonne de silice ouverte néanmoins la notion de débit avec une pompe en amont de la colonne est ajoutée (chromatographie liquide moyenne pression).

Une colonne de 25 g de SiOH préremplie (Chromabond Flash RS 25 sphère 15 µm, Macherey-Nagel) a été utilisée avec un débit de 20 ml/min de mélange d'éluant C/A (98/2). Elle a été équilibrée pendant 6.6 min avant de réaliser une purification en 63 min avec un suivi UV (220-400 nm) sur les deux résines décarboxylées.

Tableau 12 : Gradient utilisé pour la séparation des résines décarboxylée en MPLC

Temps (min)	AcOEt (%)	Cyclohexane (%)
0	2	98
10	2	98
1	5	95
10	5	95
1	10	90
5	10	90
1	20	80
10	20	80
1	30	70
5	30	70
1	50	50
6	50	50
1	70	30
5	70	30
1	100	0
5	100	0

#### - Résine décarboxylée par l'iode (DIF)

La résine décarboxylée (150 mg) a été fractionnée par MPLC (25 g) avec un gradient C/A de 98/2 à 0/100. Quatre fractions ont été obtenues.

Tableau 13 : Masse (en mg) des fractions obtenues à la suite de la séparation DIF

Fractions DIF	Masses obtenues (mg)
1	7.2
2	60.2
3	8.4
4	26.6

Les fractions DIF-1 et 2 (67.4 mg) ont été rassemblées et purifiées sur plaques CCM préparatives avec une double élution par un gradient C/A de 98/2. Cinq fractions ont été obtenues.

Tableau 14 : Masse (en mg) des fractions obtenues à la suite de la séparation DIF-I12

Fractions DIF-I <sub>12</sub>	Masses obtenues (mg)
a	2.1
b	3.6
c	38.5
d	8.0
e	2.5

- Résine décarboxylée par chauffage à l'étuve

La résine décarboxylée (160 mg) a été fractionnée par MPLC (25 g) avec un gradient C/A de 98/2 à 0/100. Cinq fractions ont été obtenues.

Tableau 15 : Masse (en mg) des fractions obtenues à la suite de la séparation D3

Fractions D3	Masses obtenues (mg)
1	24.1
2	15.1
1'	17.1
2'	3.0
3'	46.0

La fraction D3-1 (24.1 mg) a été purifiée sur plaque CCM préparative avec une double élution par un gradient C/A de 98/2. Quatre fractions ont été obtenues.

Tableau 16 : Masse (en mg) des fractions obtenues lors de la séparation de D3-1

Fractions D3-1	Masses obtenues (mg)
A	1.2
B	1.0
C	3.1
D	13.0

La fraction D3-1-D (13.0 mg) a été purifiée sur plaque CCM préparative avec une double élution par un gradient C/A de 98/2. Cinq fractions ont été obtenues.

Tableau 17 : Masse (en mg) des fractions obtenues lors la séparation de D3-1-D

Fractions D3-1-D	Masses obtenues (mg)
a	1.0
b	0.7
c	5.0
d	1.7
e	2.5

### III.6.4. Analyses RMN 1D ( $^1\text{H}$ / $^{13}\text{C}$ ) et 2D ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY, HSQC, HMBC)

Les spectres RMN 1D et 2D ont été enregistrés sur des instruments Bruker 400 MHz Avance DPX (sondes Dual & BBi) et Bruker 500 MHz Avance III HD (refroidissement du boîtier de l'échantillon, sonde BBFO). Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) ont été rapportés en ppm en aval de l'étalon interne TMS. Le solvant de solubilisation des échantillons avec une masse comprise entre 5 et 10 mg était le chloroforme deutérié ( $\text{CDCl}_3$ ). L'ensemble des données de RMN ont été traitées par le logiciel MestReNova chemistry software solution (version 15.0.0-34764) proposée par MestreLab Research S.L.

A noter que la fréquence émise réelle de l'appareil était de 500.1525 MHz. C'est cette dernière qui a été utilisée pour les calculs de constantes de couplage  $J$ . L'analyse HSQC permet mettre en évidence le couplage direct ( $^1J$ ) entre un proton H et un carbone. L'analyse HMBC a permis de déterminer les corrélations à longue distance ( $^2J$ ,  $^3J$ , et  $^4J$ ) entre un proton et carbones. Ainsi, la structure de la molécule a pu être élucidée et comparée aux études déjà réalisées sur les cannabinoïdes.

### III.7. Suivi de la cinétique de décarboxylation

Plusieurs températures comprises entre 100 et 160°C ont été testées afin de réaliser une décarboxylation sur la résine obtenue après les extractions sur les fleurs de cannabis (Moreno et al., 2020)

Environ 100 mg de résines concentrées (issues d'une extraction en bioréacteur à 0°C) a été disposée dans une coupelle en verre et placée dans l'étuve pendant 3 h à 100, 120, 140, 150 et 160 °C. Un prélèvement de contrôle a été effectué à  $t = 0, 15, 30, 60, 90, 120$  et 180 min afin de suivre l'avancement de la réaction.

Une quantification par HPLC a permis d'établir pour chaque échantillon les concentrations précises en cannabinoïdes par rapport à un temps  $t$  lors de l'étape de décarboxylation. Un modèle simplifié de cinétique a été appliqué selon la formule de la constante de cinétique suivante :  $kt = -\ln([C]_0/[C]_t)$

Où  $[C]_0$  est la concentration à l'origine,  $[C]_t$  la concentration à l'instant  $t$  du prélèvement. La constante  $k$  peut être observée graphiquement en exprimant le logarithme népérien de concentrations en fonction du temps de réaction.

Tableau 18 : Résultats de teneurs en cannabinoïdes des résines après décarboxylation et en fonction des différentes températures appliquées.

Températures (°C)	Temps (min)	Teneur (en µg/mg d'extrait)			
		[THC]	[THCA]	[CBN]	[CBGA]
100 °C	0	63.583	910.473	0.926	40.149
	15	158.281	772.785	3.554	20.763
	30	219.956	487.614	3.346	15.150
	60	330.502	463.802	5.225	9.998
	90	400.060	333.457	4.808	3.904
	120	284.939	392.809	5.528	2.790
	180	248.380	324.179	6.442	1.672
120 °C	0	63.583	910.473	0.926	40.149
	15	401.670	192.144	14.308	17.863
	30	301.128	119.249	18.873	10.924
	60	268.135	119.859	20.894	3.944
	90	207.305	148.070	36.785	3.369
	120	203.761	178.859	47.079	3.202
	180	237.303	207.281	65.791	3.069
140 °C	0	63.583	910.473	0.926	40.149
	15	793.136	205.104	16.933	1.385
	30	717.756	198.655	26.767	0.914
	60	307.464	195.271	54.659	0.800
	90	302.261	205.633	67.820	0.984
	120	315.943	210.614	75.860	0.733
	180	243.440	199.114	95.003	0.893
150 °C	0	63.583	910.473	0.926	40.149
	15	528.125	217.716	11.039	0.919
	30	585.049	213.880	20.848	0.834
	60	375.988	214.686	31.392	0.829
	90	381.671	213.001	54.710	0.773
	120	230.468	207.759	102.491	0.878
	180	204.148	198.623	162.344	0.902
160 °C	0	63.583	910.473	0.926	40.149
	15	457.758	62.128	31.508	0.000
	30	402.969	60.469	46.837	0.000
	60	180.924	56.301	154.779	0.000
	90	114.550	55.744	182.078	0.000
	120	109.391	62.845	246.309	0.000
	180	21.789	74.431	285.709	0.000

### III.7.1. Dégradation thermique du THCA en CBN

Après détermination de la température optimale de décarboxylation d'après l'expérience précédente, une masse de 160 mg de résine concentrée a été placée dans une coupelle à l'étuve pour une durée de 3 h à 160 °C. La résine décarboxylée a été ensuite récupérée et stockée au congélateur.

### III.7.2. Hémi-synthèse CBN à partir de THC

Elle a été effectuée selon le protocole précédemment décrit (Pollastro et al., 2018) et quelques modifications ont été apportées. Après décarboxylation de 200 mg de résines concentrées 30 minutes à 160 °C à l'étuve, un montage à reflux a été réalisé à 100°C avec cette dernière dans 50 mL de toluène et 460 mg de I<sub>2</sub> solide (3 éq en moles). Le suivi de la réaction a été fait par CCM. Trois extractions liquide-liquide ont été ensuite réalisées successivement. La première était dans un solvant non polaire aliphatique (50 mL de C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>) permettant d'éliminer la majorité de l'iode (par affinité supérieure au toluène). La phase organique a été traitée avec 100 mL d'une solution aqueuse de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> à 5% (2 moles pour neutraliser 1 mole de I<sub>2</sub>). La phase aqueuse contenant NaI a été ensuite éliminée. La phase organique a été lavée une dernière fois avec une solution de NaCl saturée. Les traces d'eau ont été éliminées à l'aide de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre.

Les résines décarboxylées ont été analysées en LC-UV selon la même méthode que celle utilisée pour la quantification des cannabinoïdes décrites plus loin dans cette étude.

## III.8. Analyses par spectrophotométrie, chromatographies et traitements informatiques

### III.8.1. Dosages colorimétriques

#### III.8.1.1. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux (TPC et TFC)

Le principe de ce dosage spectrophométrique est basé sur la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu par les groupements des phénols et l'apparition d'une coloration avec une absorption maximale à l'environ de 750nm. Celle-ci est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits. Un équivalent en polyphénols par gramme de matière sèche est déterminé à l'aide de la gamme étalon d'un polyphénol spécifique tel que l'acide gallique.

Le TPC a été déterminé selon les méthodes décrites précédemment par Tiago et Waterhouse avec quelques modifications (Tiago et al., 2022; Waterhouse, 2002).

Une solution mère d'acide gallique dans le méthanol a été préparée à 5 g/L. La gamme étalon a été obtenue en utilisant la solution de stockage de 0.05 à 2.5 g/L dans MeOH. L'extrait brut concentré a été préalablement dilué avec un rapport masse/volume de 1/12,5 dans MeOH. A 20 µL de la solution standard ou de l'extrait a été ajouté 1.58 mL de H<sub>2</sub>O distillée puis 100 µL de réactif de Folin-Ciocalteu. La solution résultante a été agitée et laissée pendant 7 minutes à 25 °C. Après addition de 300 µL d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 250 g/L, la solution a été incubée à 40 °C pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 750 nm (A<sub>750</sub>).

La droite de la gamme obtenue de l'acide gallique a été réalisée et exprimée par :

$$[Cx] = 0.9775 \times A + 0.0521 \text{ avec } R = 0.9990 \text{ pour l'analyse du houblon,}$$

$$[Cx] = 1.1052 \times A + 0.0480 \text{ avec } R = 0.9989 \text{ pour l'analyse du Cannabis.}$$

(Cx pour la concentration et A pour l'absorbance de l'extrait).

Le TPC a été exprimé en équivalent d'acide gallique par g de masse sèche (mg GAE/g DM).

Pour quantifier les flavonoïdes totaux, le principe de la méthode colorimétrique repose sur le complexe formé par la quercétine (ou les autres flavonoïdes) en présence des ions aluminium en conditions acides. Ce dernier absorbe à des valeurs maximales de l'ordre de 510 nm. Les valeurs obtenues ont été exprimées en équivalent de mg de quercétine par masse de matière sèche.

La teneur en flavonoïdes a été déterminée selon la méthode décrite par Navarro avec quelques modifications (Navarro et al., 2015). La gamme d'étalons de 0.025 à 5 g/L a été préparée à l'aide de la solution mère de quercétine dans le MeOH préparée à 2 g/L.

L'extrait brut a d'abord été dilué à un rapport masse/volume de 1/12.5 dans le méthanol. Il a ensuite été dilué à nouveau à 1/20 ou 1/30 dans du méthanol pour obtenir la partie linéaire de la gamme établie.

A 125  $\mu$ L de la gamme diluée ou de l'extrait, a été ajouté 37.5  $\mu$ L d'une solution de NaNO<sub>2</sub> à 5%, puis 75  $\mu$ L d'une solution d'AlCl<sub>3</sub> à 10%, puis 250  $\mu$ L de NaOH 1M et enfin 1.25 mL d'eau distillée. La solution résultante a été conservée pendant 30 min à 25 °C avant la mesure de l'absorbance à 510 nm (A<sub>510</sub>).

La droite de la gamme obtenue de quercétine a été réalisée et exprimée par l'équation:

$$[Cx] = 2.0978 \times A + 0.076 \text{ avec } R = 0.9997 \text{ pour l'analyse du houblon,}$$

$$[Cx] = 2.6253 \times A - 0.0019 \text{ avec } R = 0.9991 \text{ pour l'analyse du Cannabis.}$$

(Cx pour la concentration et A pour l'absorbance de l'extrait).

Le résultat du TFC a été exprimé en équivalent quercétine par g de masse sèche (mg QueE/g DM).

### III.8.1.2. Teneurs en chlorophylles et caroténoïdes totaux (TCC et TCCa)

Le principe de ce dosage repose sur l'extraction totale des pigments photosynthétiques (chlorophylles a, b et caroténoïdes) de la matière végétale et la mesure de l'absorption à 662 et 644 nm pour déterminer la concentration en chlorophylles et 440 nm pour les caroténoïdes.

Ces teneurs ont été déterminés selon la méthode décrite par des études précédentes (Telichowska and Kobus-Cisowska, 2020). Brièvement, 100 mg d'extrait ont été dissous dans 600  $\mu$ L d'acétone à 85% et la solution a été laissée 15 h dans l'obscurité à température ambiante.

Le surnageant a été prélevé et complété à 2 mL de volume final avec de l'acétone à 85%. L'absorbance a été enregistrée à 440, 644 et 662 nm (A<sub>440</sub>, A<sub>644</sub> et A<sub>662</sub>) respectivement.

Les concentrations de chlorophylle A ([Ca]), B ([Cb]) et de caroténoïdes (en mg/L) ont été déterminées à l'aide des équations suivantes et les résultats ont été exprimés en mg chlorophylles ou caroténoïdes /g matière sèche (mg/g DM).

$$[Ca] = 9.784 \times A_{662} - 0.99 \times A_{644}$$

$$[Cb] = 21.426 \times A_{644} - 4.65 \times A_{662}$$

$$[TCC] = [Ca] + [Cb]$$

$$[TCCa] = 4.695 \times A_{440} - 0.369 ([Ca] + [Cb])$$

Avec [Ca] et [Cb] pour les concentrations de chlorophylle a et b ; [TCC] pour la teneur totale en chlorophylle ; [TCCa] pour la teneur totale en caroténoïdes et A pour l'absorbance.

### III.8.1.3. Antioxydants (DPPH)

Concernant le principe, La présence d'un antioxydant induit la réaction de réduction du radical DPPH• violet et donc la formation de DPPH-H (neutre) de couleur jaunâtre. Donc plus la concentration d'antioxydant sera conséquente, plus la coloration jaune sera élevée (DPPH-H) et moins le radical DPPH• violet sera présent en solution. (Addo et al., 2021; Do et al., 2024)

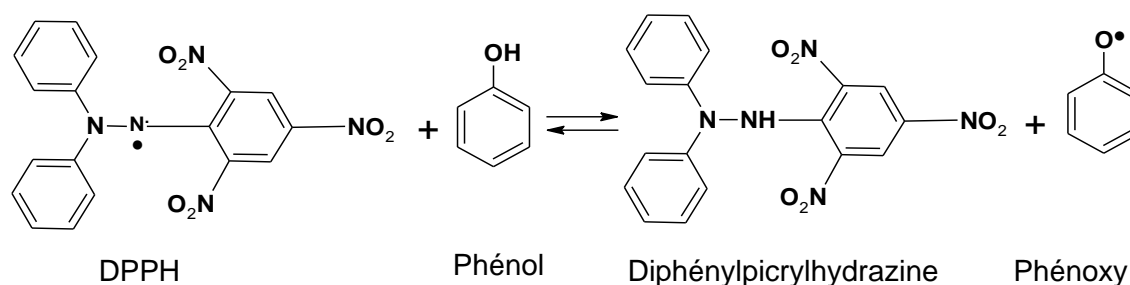


Figure 47 : Réaction du DPPH avec un phénol

La gamme étalon a été obtenue en utilisant du Trolox à 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 1.5, 2 et 2.5 mM dans MeOH. Puis 50 µL d'un extrait (dilué au préalable au 1/150 dans MeOH) ou d'échantillon de gamme de Trolox a été ajouté à 1450 µL de solution de DPPH (0.1mM dans MeOH). Le mélange a été agité 30 s dans le bain à ultrasons avant d'être disposé 30 min à 25 °C à l'obscurité. L'absorbance a été mesurée à 517 nm.

La droite de la gamme obtenue de Trolox a été réalisée et exprimée par  $[Cx] = 0.0157 \times A - 3.1113$  avec  $R = 0.9984$  ; Cx pour la concentration et A pour l'absorbance de l'extrait.

La solution témoin de référence (notée Blanc DPPH) contient seulement du DPPH à 0.1mM dans du méthanol.

Le calcul de pourcentage d'inhibition DPPH à l'aide de la formule suivante a été appliqué pour chaque extrait :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Absorbance blanc DPPH} - \text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance Blanc DPPH}}$$

Le résultat est exprimé en mg équivalent Trolox/g de masse sèche (mg TE/g DM). A noter que le DPPH est instable sur plusieurs heures et la solution doit donc être préparé juste avant l'analyse.

L'ensemble des teneurs obtenus pour les dosages colorimétriques sont représentés dans les tableaux ci-dessous pour les extraits issus de houblon et de cannabis.

Tableau 19 : Récapitulatif des teneurs en TPC, TFC, TCC et TCCa pour *Humulus lupulus* L.

	TPC (mg GaE /g DM)	TFC (mg QueE/g DM)	TCC (mg /g DM)	TCCa (mg /g DM)
SE	24.5 ± 1.9	10.7 ± 1.9	6.5 ± 0.4	0.5 ± 0.1
UAE-B +SE	50.6 ± 5.5	18.2 ± 1.8	7.3 ± 1.3	2.4 ± 0.6
UAE-P +SE	36.7 ± 6.9	13.2 ± 3.4	5.2 ± 2.0	2.2 ± 0.6
Triphasic SE	33.1 ± 3.1	9.7 ± 0.6	5.8 ± 0.9	0.4 ± 0.1
PLE 25	26.5 ± 2.2	11.9 ± 0.9	5.9 ± 0.1	1.4 ± 0.1
PLE 75	55.0 ± 1.1	19.5 ± 2.0	11.2 ± 0.9	2.3 ± 0.7
PLE 125	75.5 ± 7.8	24.9 ± 2.1	13.5 ± 1.2	0.8 ± 0.6
PLE 75 (30% H <sub>2</sub> O)	50.7 ± 1.4	16.5 ± 0.7	5.8 ± 0.5	1.8 ± 0.1
PLE 75 (70% H <sub>2</sub> O)	33.8 ± 7.0	8.8 ± 2.5	2.1 ± 0.4	1.0 ± 0.3
MAE 75 (5)	46.2 ± 7.6	15.5 ± 1.2	10.3 ± 0.6	2.9 ± 0.5
MAE 75 (15)	38.9 ± 6.0	16.1 ± 0.9	8.0 ± 1.1	1.7 ± 0.1

Tableau 20 : Récapitulatif des dosages colorimétriques sur les extraits de cannabis en triplicat (TCPC/TFC/TCC/TCCa/DPPH)

	TPC (mg GaE /g DM)	TFC (mg QueE/g DM)	TCC (mg /g DM)	TCCa (mg /g DM)	DPPH (mg TroloxE/g DM)
SE 25 H <sub>2</sub> O	2.93 ± 0.28	0.00 ± 0.00	0.79 ± 0.27	6.18 ± 0.63	0.64 ± 0.08
SE 25	45.29 ± 2.60	12.89 ± 1.89	115.27 ± 20.17	54.36 ± 5.46	6.02 ± 0.17
UAE-B+SE	42.59 ± 4.00	12.07 ± 2.19	72.58 ± 5.37	45.97 ± 5.79	5.44 ± 0.23
UAE-P+SE	47.89 ± 2.47	14.80 ± 1.49	122.39 ± 19.73	59.29 ± 5.98	6.40 ± 0.2
Successiv SE	64.35 ± 10.96	24.34 ± 9.11	392.11 ± 14.66	12.97 ± 4.45	9.95 ± 1.84
Triphasic SE	44.27 ± 6.08	9.28 ± 2.26	153.23 ± 19.78	36.31 ± 10.21	5.76 ± 0.81
Soxhlet	40.97 ± 1.11	9.84 ± 4.19	456.99 ± 111.27	117.66 ± 15.90	8.54 ± 0.21
SE 50	48.75 ± 5.94	13.27 ± 4.60	410.99 ± 57.38	118.16 ± 8.86	7.43 ± 0.17
SE 50 H <sub>2</sub> O	5.31 ± 1.67	0.00 ± 0.00	18.21 ± 8.31	11.94 ± 1.58	2.17 ± 0.57
MAE 50 (5)	41.54 ± 5.06	11.04 ± 1.45	106.18 ± 25.60	43.25 ± 8.03	6.54 ± 0.25
MAE 75 (5)	40.77 ± 2.86	8.61 ± 2.57	148.73 ± 31.08	42.15 ± 4.48	6.87 ± 0.88
MAE 100 (5)	40.95 ± 7.33	8.34 ± 1.30	214.26 ± 83.82	43.15 ± 11.84	6.99 ± 0.36
MAE 125 (5)	35.54 ± 0.38	6.34 ± 1.78	259.88 ± 73.69	54.60 ± 18.11	7.80 ± 0.36
MAE 50 (15)	40.10 ± 6.47	11.74 ± 3.46	151.19 ± 16.70	40.06 ± 10.23	7.36 ± 1.01
MAE 75 (15)	39.51 ± 8.27	10.51 ± 0.89	223.12 ± 40.64	63.62 ± 8.30	7.90 ± 2.42
MAE 100 (15)	38.19 ± 3.00	9.23 ± 1.32	268.53 ± 9.42	67.61 ± 14.58	8.23 ± 0.40
MAE 125 (15)	36.41 ± 2.84	4.01 ± 1.28	441.88 ± 85.12	103.31 ± 14.63	10.19 ± 0.62
PLE 25	108.20 ± 7.39	13.07 ± 3.93	144.25 ± 40.14	43.99 ± 15.62	7.96 ± 0.65
PLE 50	87.99 ± 6.76	10.25 ± 1.74	295.52 ± 19.68	69.97 ± 7.78	9.17 ± 0.80
PLE 75	52.17 ± 8.98	9.85 ± 2.07	433.59 ± 87.14	74.85 ± 21.15	9.14 ± 0.37
PLE 100	51.17 ± 6.97	9.15 ± 0.82	429.75 ± 62.46	51.44 ± 11.36	10.19 ± 0.64
PLE 125	50.20 ± 5.01	5.92 ± 1.62	451.58 ± 12.56	62.69 ± 25.12	11.10 ± 0.43
SE 0	42.13 ± 8.40	15.05 ± 1.63	145.72 ± 33.79	44.10 ± 10.40	7.09 ± 0.73
SE -10	42.78 ± 5.18	14.33 ± 1.60	159.95 ± 56.26	46.19 ± 17.06	7.05 ± 0.49



### III.8.2. Analyses HS-SPME-GC-MS

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est une méthode sensible, sélective et précise pour l'analyse des composés organiques volatils et semi-volatils d'échantillons. Pour ce travail, la micro-extraction en phase solide de l'espace de tête (HS-SPME) a été couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (GC-MS) pour l'analyse des terpènes et terpénoïdes.

Dans un flacon fermé hermétiquement, une masse connue de fleurs a été placée et chauffée pour libérer les terpènes volatils. Puis, une fibre recouverte d'un matériau absorbant (approprié aux molécules souhaitant être adsorbée) a été insérée pendant un temps donné. La fibre a ensuite été insérée dans l'entrée du système GC-MS (au niveau de l'injecteur) et les molécules sont désorbées et injectées dans la colonne GC. Les spectres de masse obtenus ont été comparés aux banques de données interne du logiciel.

Le protocole suivant a été établi à partir de la méthode décrite par Song avec quelques adaptations puisqu'une fibre différente (ZB) a été utilisée (Song et al., 2022). Dans un flacon serti 3 g de fleurs a été placé et laissé 10 min à 60 °C à l'étuve avant d'insérer la fibre au contact des fleurs pendant 30 min. L'appareil de GC-MS a été paramétré comme suit : une température de colonne à 40 °C, de source d'ionisation à 230 °C, d'interface à 250 °C et d'injection à 260°C ; un mode d'injection split en ratio de 20 ; l'hélium comme gaz vecteur avec une pression de 49.5 kPa ; le débit total à 24 mL/min, de colonne à 1 mL/min et de purge à 3.0 mL/min ; une vitesse linéaire de 36.1 cm/sec et un temps total de programme de 73.33 min.

Le programme de température pour l'analyse de la chromatographie gazeuse était le suivant : 5 min à 40 °C, puis une première montée à 100 °C (rate = 3.00), puis une seconde montée entre 100 et 230 °C (rate = 3.00) et enfin un temps statique à 230 °C pendant 5 min.

L'aire relative pour un pic donné (et donc une molécule) a été transformée en pourcentage d'aire par rapport à l'aire totale de l'ensemble des pics (résultats qualitatifs) en utilisant la formule qui suit :

$$\% \text{ molécule} = \frac{\text{Aire de la molécule}}{\text{Somme aires totales}} \times 100$$

### III.8.3. HRLC-MS/MS

Le principe de fonctionnement de la LC-MS/MS est brièvement rappelé. C'est une technique qui consiste en l'élution des différents métabolites de l'extrait injecté (principe de la chromatographie liquide) suivi d'une ionisation et d'une fragmentation des ions produits (principe de la spectrométrie de masse en tandem).

Cette étape de spectrométrie de masse est sous-divisée en trois parties distinctes dans notre cas : le passage des différentes molécules dans une source d'ionisation douce (Electrospray), puis dans un analyseur de masse (Q-TOF) et enfin dans un détecteur qui transformera les signaux en données de spectres de masse. L'ESI (Electrospray Source Ionization) permet de créer des ions à partir de fines gouttelettes d'échantillons chargés. Le Q-TOF (Quadrupole Time Of Flight) permet de trier dans un premier temps les ions en fonction de leurs  $m/z$  (rapport masse/charge) permettant d'obtenir le spectre  $MS^1$ . Ces ions sont ensuite dirigés vers une cellule de collision entraînant la production d'ions fragmentés (« ions fils ») qui seront à nouveau analysés, permettant d'obtenir les spectres de masse  $MS^2$ . Le spectre  $MS^1$  traduit donc de connaître la charge  $m/z$  de la molécule ionisée la plus présente à l'instant « t » de sa mesure et le spectre  $MS^2$  représente les fragments d'ions produits de celle-ci.

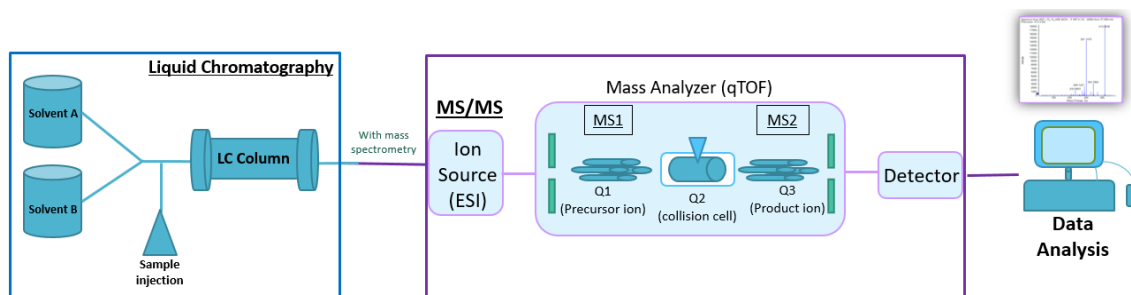


Figure 48 : Schéma du principe de la LC-MS/MS

#### III.8.3.1. Conditions opératoires

Les analyses en chromatographie liquide/spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) ont été réalisées à l'aide d'un système Nexera X2 équipé d'un passeur d'échantillons SIL-40C X3, d'un four à colonne CTO-40S maintenu à 40°C et d'un détecteur PDA SPD-M40 couvrant toute la gamme d'acquisition (190-800 nm). La séparation des extraits de houblon a été effectuée avec une colonne Atlantis T3 (5µm, 2.1x150 mm, Waters) à un débit de 200 µL/min avec une phase mobile composée de 0,1% d'acide formique dans l'eau (A) et de 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile (B). La séparation des molécules des extraits de houblon a été effectuée avec une colonne Atlantis T3 à un débit de 200 µL/min avec une phase mobile composée de 0,1% d'acide formique dans l'eau (A) et de 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile (B). La séparation des cannabinoïdes a été effectuée quant à elle avec une colonne NUCLEODUR Isis à un débit de 200 µL/min dans une phase mobile composée de 0,1% d'acide formique et 2 mmol/L formiate d'ammonium dans l'eau (A) et de 0,1% d'acide formique dans du méthanol avec 10% de la phase A (B). Ce système était interfacé avec un spectromètre de masse quadripolaire à temps de vol (QTOF) (TripleTOF® 5600+, Sciex, Concord, Canada), équipé d'une source d'ions DuoSpray™. Les paramètres de source suivants ont été utilisés pour toutes les analyses : température à 200 °C ; potentiel de declustering (DP) à -150 V (houblon) et +10V (cannabis) ; gaz de rideau (CUR) à 40 unités ; gaz de source d'ions (GS1, GS2) à 10 unités respectivement. Les paramètres spécifiques (paramètres de la source, gradient) pour les différentes méthodes sont détaillés dans les paragraphes correspondants.

### III.8.3.2. Quantification

Pour l'analyse d'extraits de houblons, les droites d'étalonnage ont été créées à l'aide des trois standards commerciaux : lupulone (Lp, 1 à 20 µg/mL), xanthohumol (XN, 0.5 à 10 µg/mL) et isoxanthohumol (IX, 0.05 à 1 µg/mL). Les extraits bruts concentrés ont été resolubilisés dans du méthanol jusqu'à une concentration finale de 1 mg/mL, vortexés et soniqués. Le programme d'élution était le suivant : 40 % B à 95 % en 15 minutes pour un cycle de 25 minutes. Le volume d'injection des échantillons était de 10 µL. L'ionisation par électrospray a été réalisée en mode négatif. L'énergie de collision (CE) et le potentiel de déclustering (DP) ont été optimisés pour les 3 standards (XN, IX et Lp) en utilisant des solutions commerciales. Le DP et le CE de l'étalon le plus proche ont été utilisés pour les 5 autres composés. Le spectromètre de masse a été utilisé de manière à effectuer un balayage de 250 ms (TOF-MS) de m/z 200 à 600 et des expériences MS/MS ont été réalisées sur les 8 précurseurs en utilisant un temps d'accumulation de 100 ms par composé pour un temps de cycle total de 1.1 s.

Tableau 21 : Paramètres MS/MS des précurseurs spécifiques du houblon pour la quantification

Composé	Précurseur m/z	Potentiel de déclustering (DP)	Energie de collision (CE)
Cohumulone	347.1812	-150 V	-30 V
Xanthohumol	353.1340	-150 V	-30 V
Isoxanthohumol	353.1341	-150 V	-30 V
Humulone	361.1961	-150 V	-30 V
Colupulone	399.2446	-150 V	-30 V
Lupulone	413.2594	-150 V	-30 V
Hydroxytricyclocolupone	415.2380	-150 V	-30 V
Hydroxytricyclolupone	429.2542	-150 V	-30 V

Tableau 22 : Quantification des composés caractéristiques du houblon dans les différents extraits obtenus : isoxanthohumol (IX), xanthohumol (XN), cohumulone (CoHu), humulone (Hu), colupulone (CoLp), lupulone (Lp), Hydroxytricyclocolupone (HtCoLp) et Hydroxytricyclolupone (HcLp)

	XN (mg /g DM)	IX (mg /g DM)	CoHu (mg Lp eq/g DM)	Hu (mg Lp eq/g DM)	CoLp (mg Lp eq/g DM)	Lp (mg /g DM)	HcCoLp (mg Lp eq/g DM)	HcLp (mg Lp eq/g DM)
SE	0.200	0.015	0.060	0.145	0.000	0.000	0.065	0.035
UAE-B +SE	0.520	0.040	0.790	3.130	0.570	0.520	0.100	0.060
UAE-P +SE	1.960	0.130	6.550	18.000	2.190	2.180	0.610	0.610
Triphasic SE	1.145	0.055	5.999	5.374	7.684	10.768	0.195	0.130
ASE 25	0.980	0.050	5.604	4.964	0.145	0.140	0.125	0.160
ASE 75	0.745	0.035	2.430	7.790	1.125	1.130	0.215	0.195
ASE 125	0.805	0.040	4.275	9.830	6.015	8.435	0.370	0.260
ASE 75 (30% H <sub>2</sub> O)	0.595	0.030	2.360	6.409	5.174	7.519	0.155	0.075
ASE 75 (70% H <sub>2</sub> O)	0.420	0.045	2.745	8.069	1.385	1.310	0.090	0.030
MAE 75 (5)	1.220	0.070	5.898	16.663	7.637	11.026	0.640	0.470
MAE 75 (15)	1.220	0.110	3.819	14.526	8.168	11.347	0.630	0.460

Pour l'analyse d'extraits de cannabis, les droites d'étalonnage ont été créées à l'aide des sept standards commerciaux (CBN, CBD, CBDA, THCA, d9-THC, d8-THC et CBGA) avec des dilutions comprises entre 0.05 et 10 µg/mL. Les extraits bruts ont été resolubilisés et préparés à deux concentrations différentes dans une solution 50/50 (eau/méthanol). La première a été faite concentration à 1mg/mL pour détecter les composés minoritaires de notre variété de cannabis (CBN, CBD et CBDA) ; une autre concentration de 10 µg/mL pour détecter les plus des molécules les plus présentes (THC et THCA). Le programme d'élution était le suivant : 80 % B à 95 % en 15 minutes pour un cycle de 20 minutes. Le volume d'injection des échantillons était de 5 µL. L'ionisation par électrospray a été réalisée en mode positif. L'énergie de collision (CE) et le potentiel de déclustering (DP) ont été optimisés en utilisant les standards. Le spectromètre de masse a été utilisé de manière à effectuer un balayage de 250 ms (TOF-MS) de  $m/z$  50 à 1500 et des expériences MS/MS ont été réalisées sur les 7 précurseurs en utilisant un temps d'accumulation de 100 ms par composé pour un temps de cycle total de 1.1 s.

Tableau 23 : Paramètres MS/MS des précurseurs spécifiques du cannabis pour la quantification

Composé	Précurseur $m/z$	Potentiel de déclustering (DP)	Energie de collision (CE)
CBN	311.2006	10 V	30 V
CBD	315.2319	10 V	30 V
d9-THC	315.2319	10 V	30 V
d8-THC	315.2319	10 V	30 V
CBDA	359.2217	10 V	30 V
THCA	359.2217	10 V	30 V
CBGA	361.2374	10 V	30 V

Tableau 24 : Quantification des composés caractéristiques du cannabis dans les différents extraits obtenus

	CBD (µg/mg)	CBDA (µg/mg)	CBGA (µg/mg)	CBN (µg/mg)	d8-THC (µg/mg)	d9-THC (µg/mg)	THCA (µg/mg)
ASE 25	0.19	1.55	40.09	1.90	0.00	164.18	683.77
ASE 50	0.17	1.41	34.62	1.89	0.00	148.37	628.90
ASE 75	0.20	1.50	37.88	1.98	0.00	158.53	629.40
ASE 100	0.25	1.21	24.00	3.36	0.00	189.57	472.46
ASE 125	0.51	0.98	23.99	5.34	0.00	376.78	318.58
MAE 50-5	0.15	1.52	34.63	2.26	0.00	126.20	668.01
MAE 75-5	0.17	1.33	27.20	2.26	0.00	124.53	579.13
MAE 100-5	0.24	1.26	29.61	3.15	0.00	230.41	590.98
MAE 125-5	0.39	0.99	18.63	5.70	0.00	322.79	344.48
MAE 50-15	0.13	1.64	36.16	2.10	0.00	112.02	739.97
MAE 75-15	0.18	1.38	20.31	3.77	0.00	153.67	636.64
MAE 100-15	0.36	1.35	24.49	5.90	0.00	284.12	537.35
MAE 125-15	0.71	0.83	17.76	9.09	0.00	518.96	203.93
SE 0 EtOH	0.11	1.46	12.78	3.49	0.00	79.08	614.10
SE -10 EtOH	0.14	1.41	21.39	2.52	0.00	93.91	582.68
SE 25 EtOH	0.11	1.51	29.11	1.70	0.00	75.69	599.64

SE 50 EtOH	0.11	1.41	24.86	2.02	0.00	82.07	584.41
SE 25 H2O	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.38
SE 50 H2O	0.00	0.12	0.68	0.31	0.00	4.29	42.69
Soxhlet	0.63	1.17	27.23	6.72	0.00	443.21	398.04
Successiv SE	0.03	0.71	12.12	0.81	0.00	27.11	293.97
Triphasic SE	0.09	1.58	33.34	1.16	0.00	75.42	671.67
USB+SE	0.10	1.77	40.32	1.39	0.00	76.92	888.72
USS+SE	0.15	1.73	35.90	2.20	0.00	128.82	805.00

### III.8.3.3. Déréplication par HR-LC/MS-MS

Pour créer les réseaux moléculaires des extraits de houblon, le programme d'élution a été modifié comme suit : 5 % B à 95 % en 35 min pour un cycle de 45 min. Le volume d'injection était de 5  $\mu$ L. L'ionisation par électrospray a été réalisée dans les deux modes d'ionisation avec les réglages suivants : potentiel de déclustering (DP) à -50 V et énergie de collision (CE) à -30 +/- 15 V pour le mode négatif et potentiel de déclustering (DP) à 50 V et énergie de collision (CE) à 30 +/- 15 V pour le mode positif. En bref, l'acquisition a été réalisée en mode DDA (Data-Dependent Acquisition), dans lequel le TripleTOF 5600+ commute continuellement entre un scan de 250 ms acquis en mode TOF-MS (de 50 à 1500 m/z) et jusqu'à 20 scans dépendants de 100 ms (de 10 à 2000 m/z) obtenus en mode scan de l'ion produit.

Pour l'analyse des extraits de cannabis et la construction de leurs réseaux moléculaires, le programme d'élution a été modifié comme suit : 80 % B à 100 % en 33 min pour un cycle de 45 min. Le volume d'injection était de 5  $\mu$ L. L'ionisation par électrospray a été réalisée en mode positif uniquement avec les réglages suivants : potentiel de déclustering (DP) à 10 V et énergie de collision (CE) à 30 +/- 15 V. En bref, l'acquisition a été réalisée en mode DDA (Data-Dependent Acquisition), dans lequel le TripleTOF 5600+ commute continuellement entre un scan de 250 ms acquis en mode TOF-MS (de m/z 50 à 1500) et jusqu'à 20 scans dépendants de 100 ms (de m/z 10 à 2000) obtenus en mode scan de l'ion produit.

### III.8.4. Réseaux moléculaires

Les méthodes de métabolomiques consistent aux traitements des données LC-MS/MS par des outils de bio-informatiques. Les données obtenues (spectre MS1 et MS2) permettent ainsi l'annotation de molécules majoritaires et minoritaires présentes au sein de nos extraits (Breaud et al., 2023; Intelmann et al., 2009; Zhou et al., 2021). Ces annotations se font à travers la formation de réseaux moléculaires avec de nombreux outils et de larges banques de données et qui sont complémentaires aux résultats de spectrométrie de masse. Le terme utilisé sera « Feature-based molecular networking ». L'utilisation de ces logiciels s'est largement développée et impose au cours de ces dernières décennies. La majorité sont connectés à la plateforme GNPS (Global Natural Product Social Molecular Networking). A la suite de ça, le réseau créé peut-être développé sur des outils de visualisation tels que Cytoscape ou Metgem. En parallèles des résultats obtenus par GNPS, d'autres logiciels permettent de l'analyse via comparaison *In silico* (ou *De novo*) et possèdent de nombreux outils de prédictions de structures et de fragmentations comme Sirius (Dührkop et al., 2019).

Chacune des étapes admet son importance et un rôle crucial dans la construction des réseaux.

Après une conversion par MSconverter des données brutes de LC-MS/MS, elles peuvent être utilisées dans le logiciel MZmine 2 ou 3 (Schmid et al., 2023). L'analyse et le tri des spectres de masse MS1 et MS2 permettent d'obtenir deux formats différents de fichiers informatiques : le format « .mgf » étant le scan MS2 spécifique pour un pic donné et le fichier « .csv » qui correspond à toutes les métadonnées du pic (temps de rétention, formule, aire sous le pic etc.). Ces deux formats sont obtenus à la suite de plusieurs étapes au sein du logiciel qui sont déterminantes telles que : la détection des pics, la construction du chromatogramme, la déconvolution, le regroupement des isotopes, l'alignement et l'ajustement des blancs et trous potentiels. Des réglages de paramètres différents pour les diverses étapes peuvent influencer fortement et changer totalement les fichiers obtenus (.mgf et .csv), et donc, amener à donner des annotations différentes. Les choix de paramètres sont donc cruciaux.

A la suite du traitement sous MZmine, et pour construire ces réseaux, les données sont donc exportées sur la plateforme en ligne d'accès libre de GNPS (Global Natural Products Social molecular networking) pour réaliser l'étape de déréplication et le regroupement sous forme de cluster (Nothias et al., 2019). Les réseaux obtenus (feature-based molecular networking = FBMN) regroupent ou dispersent les ions détectés en fonctions de leurs similarité spectrale (entre spectres MS2). Les réseaux sont par définition un ensemble de nœuds reliés entre eux ou non par des liens et pouvant être regroupés pour former un cluster. Chaque nœud est représentatif d'une molécule ionisée. Si ce nœud est relié par un lien à un autre nœud, alors ils possèdent une ou plusieurs fragmentations identiques. Plus cette liaison est épaisse en taille et courte en distance, et plus le nombres de fragmentations similaires sont identiques. Cela signifie que les annotations proposées seront proches et que ces deux ions possèdent des structures moléculaires communes. Si l'on prend l'exemple de cannabinoïdes, en théorie, le THC et le THCA qui ne diffèrent que par une fonction acide carboxylique devraient être représentés par des nœuds proches au sein du réseau. Ils devraient également être reliés à travers une liaison plus conséquente qu'une liaison avec d'autres cannabinoïdes. A l'inverse, moins il y aura de similarité entre les fragmentations et plus la liaison sera faible voire inexistante suivant les cas, et les deux nœuds seront totalement éloignés ou dans des clusters différents. Un score de similarité est obtenu à la suite de comparaison des spectre MS2 aux multiples banques de données à disposition, et plus ce dernier sera élevé et plus la ressemblance et donc l'annotation de la structure sera fiable. Ces banques de données sont issues de données expérimentales partagées par l'ensembles des utilisateurs de la plateforme qui le souhaite.

Cytoscape est un logiciel complémentaire permettant de créer une visualisation sous forme de réseaux de l'ensemble des traitements de données réalisés par MZmine et GNPS. D'ailleurs, GNPS propose un preview online (Ono et al., 2014) sur sa plateforme au format Cytoscape avant de pouvoir l'exporter pour le traiter dans celui-ci. Ce logiciel, tout comme Metgem (Olivon et al., 2017a),(Olivon et al., 2018), ont le même objectif mais avec des fonctionnalités différentes : l'un est plus orienté dans du réarrangement graphique (Cytoscape) et l'autre propose ds réseaux et une fenêtre T-SNE, proposant un tri des noeuds par familles potentielles (Metgem). Cytoscape permet donc la création visuelle de ces réseaux mais également de changer l'ensemble des caractéristiques visuelles de celui-ci (Shannon et al., 2003). Les couleurs, les formes, les tailles, les positions, les légendes pour chaque nœud et liaisons peuvent être modifiées. En plus de cela, les données d'intensité des ions MS1 produits

entre différents extraits (fichier .csv) peuvent être importées sur le même réseau afin de les comparer entre eux.

SIRIUS est un autre logiciel qui est également utilisé pour la déréplication après un traitement MZmine et proposant des annotations de formules dites *de novo* ou *in silico* (Dührkop et al., 2019). Contrairement à GNPS où les banques de données proviennent de données expérimentales partagées et améliorées par les utilisateurs, SIRIUS est entraîné par des algorithmes de prédictions de fragmentations et de probabilités par rapport à toutes les molécules existantes référencées. Ce logiciel est constitué de plusieurs outils que l'on peut choisir ou non d'utiliser. Parmi ces outils, on retrouve l'outil propre à SIRIUS du même nom (Dührkop et al., 2021), mais également CANOPUS (Djombou Feunang et al., 2016; Kim et al., 2021), CSI:FingerID (Dührkop et al., 2015; Hoffmann et al., 2021) et ZODIAC (Ludwig et al., 2019). Chacun d'entre eux apporte des informations utiles aux annotations des structures des ions analysés.

L'outil primaire Sirius permet une identification de la formule moléculaire la plus probable en fonction des atomes (C, N, H, O, P, S, B, F, I, Cl, Si, Se), les produits d'ionisations potentiels ( $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ), l'instrument (Q-TOF, Orbitrap, FT-ICR) et les banques de données de références que l'on choisit de lui imposer. Le second outil, ZODIAC, est complémentaire au premier et améliore la formule proposée. ZODIAC réalise une annotation *de novo* en comparant la formule annotée aux banques de données issus d'échantillons biologiques. Cet outil se sert de l'arbre de fragmentation créé pour les formules proposées et réajuste leurs rangs et donc leurs probabilités de correspondance à l'ion analysé (Böcker and Dührkop, 2016). Chaque formule proposée possède son arbre de fragmentation théorique et les outils SIRIUS+ZODIAC permettent d'établir un ZODIACscore et SIRIUSscore. Plus ces scores sont élevés et plus les formules proposées deviennent fiables pour l'annotation.

Après avoir prédit une formule chimique et son arbre de fragmentation spécifique, l'outil de CSI:FingerID permet de proposer une empreinte moléculaire liée à ces derniers. Chaque structure moléculaire possède une empreinte spécifique répertoriée dans les banques de données (telle que PubChem) à laquelle sera comparée l'empreinte d'un ion analysé de notre extrait. Une valeur générale de score de confiance (ou COSMIC score) est calculée. Elle est comprise entre 0 et 1, la valeur maximale (=1) serait pour l'empreinte, une formule et un arbre de fragmentation de la molécule proposée totalement identique à celle étudiée. En parallèle de ce score, une autre valeur est utilisée : la similarité de Tanimoto exprimé entre 0 et 100%. Celle-ci est uniquement représentative de la similarité entre l'empreinte *de novo* et l'ion observé.

EPIMETHEUS consiste à la proposition de sous-structures spécifiques de la structure annoncée par CSI:FingerID. Il affiche un code couleur et un pourcentage de probabilité (entre 0 et 100%) à chacune des sous-structure théoriques par rapport aux données de masse de notre ion. Si l'ensemble des sous-structures sont présentes (> 90%), la structure peut être annotée. Et si certaines sont manquantes, les sous-structures à fortes probabilités présentes permettent de se rapprocher de la classe chimique de la molécule. Par exemple, une longue chaîne aliphatique avec une fonction acide comme sous-structure validée permet d'envisager la forte probabilité de la présence d'un acide gras, sans pour autant envisager la structure exacte.

Le dernier outil, CANOPUS, permet quant à lui de prédire la classe du composé analysé à partir de l'empreinte moléculaire issus de CSI:FingerID et EPIMETHEUS. Les structures proposées sont affiliées des pourcentages de classes chimiques les plus générales

(Composés organiques) jusqu'aux plus précises (ex : cannabinoïdes). La probabilité d'annotation est proportionnelle au pourcentage (entre 0 et 100%). Aucune banque de données n'est utilisée et les propositions se font uniquement par rapport aux squelettes et atomes spécifiques présents. C'est pour cela que CANOPUS n'identifie pas la voie de biosynthèse du composé.

#### III.8.4.1. Paramètres Mzmine 2.5 et Metgem (*Humulus lupulus* L.)

Les fichiers (spectre MS2) obtenus lors des acquisitions LC-MS/MS ont d'abord été convertis en ".mzML" sur un logiciel MSconverter (ProteoWizard 3.0.19124 64-bit) avant d'être traités sur le logiciel MZmine2 (version 2.53 windows).

La détection des pics en mode négatif a été réalisée avec l'algorithme "mass detection" avec un niveau de bruit à 1E3 pour MS1 et à 1E10 pour MS2 en mode centroïde. Ensuite, des chromatogrammes ont été construits pour tous les ions détectés avec l'algorithme "ADAP chromatogram builder" avec un scan de taille de groupe minimum de 5, un seuil d'intensité de groupe de 500, une intensité minimum la plus élevée de 1E3 et une tolérance  $m/z$  de 0,005 ou 20 ppm. Une déconvolution des pics a été appliquée pour générer des chromatogrammes avec l'algorithme "Baseline cut off" avec les paramètres suivants : hauteur de pic minimale de 2E3, durée de pic comprise entre 0,01 et 2, niveau de base de 1E3, centre médian de  $m/z$ , plage de  $m/z$  de 0,02 Da pour MS2 et plage de RT de 0,5 min pour MS2. L'élimination des isotopes a été effectuée avec le groupeur de pics isotopiques avec les paramètres suivants : tolérance  $m/z$  de 0,005 et 10 ppm, tolérance RT de 0,2 min, charge maximale de 2. L'alignement a ensuite été effectué avec "RANSAC alignment" avec une tolérance  $m/z$  de 0,005 et 100 ppm, une tolérance RT de 0,2 min, une tolérance RT après correction de 0,1, RANSAC Iteration de 0, 50% pour le nombre minimum de points et 0,2 comme valeur de seuil. Enfin, une dernière étape de filtre a été réalisée en utilisant les "feature list raw filters" avec ces deux sélections : "Keep only peaks with MS2 scan" et "Reset the peak number ID". Après plusieurs étapes dans ce logiciel, les fichiers avec les données traitées étaient prêts à être exportés au format ".mgf" (Mascot Generic Format) et au format ".CSV" (Comma-separated values) et dans le logiciel de réseaux moléculaires MetGem (Olivon et al., 2017b; Schmid et al., 2021). Les paramètres suivants ont été appliqués pour MetGem : pour le calcul du cosinus, les données MS1 n'ont pas été cochées, le nombre minimum de pics appariés a été fixé à 4, la visualisation du réseau a permis d'obtenir un cosinus minimal de 0,60, la visualisation du t-SNE a utilisé un cosinus supérieur à 0,6. Afin d'annoter les molécules, tous nos résultats ont été comparés avec toutes les bases de données connectées à GNPS à l'aide du logiciel Metgem (par exemple, la bibliothèque GNPS, la bibliothèque FDA, la bibliothèque Phytochemical, etc.)

#### III.8.4.2. Paramètres Mzmine 3, GNPS, Cytoscape et Sirius (*Cannabis sativa* L.)

Les cinq fichiers des extraits (spectre MS2) obtenus lors des acquisitions LC-MS/MS ont d'abord été convertis en fichiers de type ".mzML" sur MSconverter (ProteoWizard 3.0.19124 64-bit) avant d'être traités sur le logiciel MZmine3 (version 3.9.0 windows).

La détection des pics en mode négatifs a été réalisée en appliquant l'algorithme « mass detection » en mode centroid avec un niveau de bruit de fond à 1e03 pour les spectres MS1 et 1e0 pour les spectres MS2. Les chromatogrammes ont ensuite été construits avec tous les



ions détectés en utilisant l'algorithme "ADAP chromatogram builder" (Myers et al., 2017) avec le nombre de scan minimum de 5, le minimum d'intensité en scan à  $1e03$ , la hauteur minimale absolu à  $3e03$  et une tolérance de  $0.005$   $m/z$  et  $15.00$  ppm. L'étape de déconvolution des pics est appliquée en générant des chromatogrammes avec l'algorithme « local minimal resolver » et les paramètres suivants : un appariement des scans MS1 à MS2 avec une tolérance des précurseurs à  $0.005$   $m/z$  ou  $5.0$  ppm, une hauteur relative minimale de 25% et une intensité minimale de 1%. Ainsi que : un seuil de chromatogramme à 80%, la gamme de recherche minimal à  $0.05$ , une hauteur minimal absolue à  $5e03$ , un ratio minimal entre le sommet et le bord du pic à 1.9 sur une durée de pic entre 0 et 2 min et un nombre de scans minimum de 3. Les isotopes sont ensuite regroupés avec le filtre «  $^{13}C$  isotop » et les paramètres suivants : une tolérance  $m/z$  de  $0.005$  to  $15.0$  ppm, un temps absolu de  $0.05$  min et un maximum de charge de 1. L'étape d'alignement est réalisée avec « Join aligner » selon : une tolérance  $m/z$  de  $0.005$   $m/z$  to  $15.0$  ppm, un poids de  $m/z$  à 75, une tolérance du temps de rétention de  $0.10$ min et un poids de  $R_t$  de 25 et une mobilité de 1. Une étape de remplissage de pics manquants/trous est réalisés avec « peak finder » sous les réglages suivants : une tolérance d'intensité de 20%, de  $0.005$   $m/z$  et de  $15$  ppm ; une tolérance de temps de rétention de  $0.05$  min avec un minimum de 3 scans. Enfin, une dernière étape de suppression des ions produits par le blanc avec « feature list blank subtraction » où l'on a importé les fichiers MzML du blanc de méthanol pour les soustraire aux chromatogrammes construits. Après l'ensemble de ces différentes étapes, les fichiers avec les données traitées sont exportés au format ".mgf" (Mascot Generic Format) et au format ".CSV" (Comma-separated values) et dans GNPS, suivi de cytoscape et Sirius.

Les résultats obtenus après MZMine3 ont été exportés vers GNPS pour l'analyse FBMN. Les données ont été filtrées en supprimant tous les ions fragments MS/MS situés à  $\pm 17$  Da du  $m/z$  du précurseur. Les spectres MS/MS ont été filtrés par fenêtre en choisissant uniquement les 6 premiers ions fragments dans la fenêtre de  $\pm 50$  Da sur l'ensemble du spectre. La tolérance de masse de l'ion précurseur est fixée à  $0,02$  Da, tout comme la tolérance des ions du spectre MS2. Le réseau moléculaire a ensuite été créé, avec un filtre du score de cosinus supérieur à  $0,65$  et plus de 6 pics correspondants. Enfin, la taille maximale d'une famille moléculaire a été fixée à 100. Les spectres appartenant à ce réseau sont ensuite recherchés dans les banque de données "speclibs" de GNPS (Horai et al., 2010; Wang et al., 2016). Les spectres de la bibliothèque sont filtrés avec les mêmes paramètres que ceux utilisés pour la création du réseau. Toutes les correspondances potentielles doivent admettre un score de cosinus supérieur à  $0,7$  et au moins 6 pics identiques. L'outil DEREPLICATOR a été utilisé pour annoter les spectres MS2 (Mohimani et al., 2018). Les réseaux moléculaires enfin créés seront visualisés à l'aide du logiciel Cytoscape et les données de spectrométrie de masse sont déposées selon le choix de l'utilisateur dans un dépôt public (tel que MassIVE ou MetaboLights).

La liste suivante contient l'ensemble des banques de données utilisées. Leurs descriptions peuvent être retrouvées sur la documentation mise à disposition par la plateforme de GNPS.

Tableau 25 : Banques de données utilisées pour l'annotation par GNPS

GNPS-SAM-SIK-KANG-LEGACY-LIBRARY	CASMI	GNPS-SCIEX-LIBRARY	MONA
GNPS-EMBL-MCF	XANTHONES-DB	TUEBINGEN-NATURAL-PRODUCT-COLLECTION	GNPS-PRESTWICK-PHYTOCHEM
LDB_POSITIVE	BIRMINGHAM-UHPLC-MS-NEG	GNPS-NIH-NATURAL-PRODUCTS-LIBRARY	GNPS-NIH-CLINICAL-COLLECTION 1
LDB_NEGATIVE	HMDB	BIRMINGHAM-UHPLC-MS-POS	DERPLICATOR_IDENTIFIED_LIBRARY
PNNL-LIPIDS-NEGATIVE	PNNL-LIPIDS-POSITIVE	GNPS-NIST14-MATCHES	DRUGS-OF-ABUSE-LIBRARY
SUMNER	GNPS-LIBRARY	GNPS-COLLECTIONS-MISC	MMV_NEGATIVE
BILELIB19	HCE-CELL-LYSATE-LIPIDS	MASSBANKEU	PNNL-LIPIDS
GNPS-NIH-CLINICAL-COLLECTION 2	GNPS-SELLECKCHEM-FDA-PART1	GNPS-COLLECTIONS	PESTICIDES-NEGATIVE
MIADB	GNPS-COLLECTIONS-PESTICIDES-POSITIVE	GNPS-MSMLS	GNPS-FAULKNERLEGACY
BERKELEY-LAB-MMV_POSITIVE	GNPS-NIH-NATURALPRODUCTSLIBRARY-ROUND2_NEGATIVE	GNPS-SELLECKCHEM-FDA-PART2	LEAFBOT
ECG-ACYL-AMIDES-C4-C24-LIBRARY	ECG-ACYL-ESTERS-C4-C24-LIBRARY	PSU-MSMLS	BMDMS-NP
IQAMDB	GNPS-D2-AMINO-LIPID-LIBRARY	GNPS-IOBA-NHC	GNPS-NIH
NEO-MSMS	UM-NPDC	MASSBANK	GNPS-NIH-NATURAL-PRODUCTSLIBRARY-ROUND 2_POSITIVE
RESPECT	SMALL MOLECULE PHARMACOLOGICALLY ACTIVE		

Le fichier traité par GNPS a été exportée au format «.cys » au sein de la version du logiciel Cytoscape (version 3.10.2 windows). En plus de ce fichier, le tableau des intensités des ions détectés dans chacun des 5 extraits y a été importés (format «.quantif.resolved.csv»). Les réseaux créés ont été personnalisés par changement de couleurs des nœuds d'ions qui ont pu être annotés. La visualisation obtenue a été exportée au format vectorisé (.SVG). Deux visuels finaux ont pu être réalisés : l'un avec des formes géométriques colorées pour distinguer les molécules annotées en fonction de leurs classes et l'autre avec les molécules annotées en fonction de leurs charges  $m/z$ .

Le fichier «.mgf » de Mzmine a été importé dans SIRIUS (version 4 windows). L'ensemble des outils présents dans logiciel sont utilisés pour l'analyses (SIRIUS, ZODIAC, CSI:FingerID et CANOPUS). Pour l'identification de la formule moléculaire par SIRIUS, les paramètres suivants sont utilisés : Instrument Q-TOF, un filtre des isotopes, un nombre de candidats proposés par ion entre 1 et 10, une précision à 10ppm, une comparaison à l'ensembles des bases de données connectées à SIRIUS, les trois ionisations possibles ( $[M+H]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ) et C, H, N et O comme éléments chimiques choisis. L'amélioration des résultats à l'aide de ZODIAC a été réalisée à l'aide des options suivantes : le nombre candidats à  $m/z$  300 est de 10 et les candidats à  $m/z$  800 de 50 avec une approche en deux étapes, un filtre du seuil de bordure à 0.95 et du nombre minimal de connections à 10, l'échantillonnage de Gibbs avec 20 000 iterations, 2000 Burn-in et séparés par 10 runs.

Concernant la prédiction d'empreintes avec CSI : FingerID, les adduits suivants sont admis :  $[M+H]^+$ ,  $[M+H_2O+H]^+$ ,  $[M-H_2O+H]^+$ ,  $[M+K]^+$  et  $[M+Na]^+$ . Et on choisit d'utiliser les banques de données de cette liste : CheBI, COCONUT, Bio database, GNPS, HMDB, HSDB, Norman, PUBCHEM, Natural Products. Enfin, l'utilisation complémentaire de CANOPUS est choisie et elle ne nécessite aucun paramètre spécifique à déterminer.

### III.9. Optimisations et études statistiques

Les plans d'expériences et les analyses statistiques offrent des outils puissants pour concevoir des expériences de manière efficace et d'extraire des informations significatives à partir des données expérimentales. Cela permet ainsi d'obtenir des conclusions robustes et généralisables, renforçant ainsi la crédibilité et la validité des résultats obtenus. Les premiers travaux sur les plans d'expérience remontent au début du XX<sup>ème</sup> siècle avec des statisticiens pionniers tels que Ronald A. Fisher, Georges E.P. Box et bien d'autres. Ronald Fisher s'est essentiellement intéressé aux principes fondamentaux des plans d'expérience dans un ouvrage intitulé « The design of experiments » de 1935. Ces méthodes ont évolué pour développer plusieurs formes de plans d'expérience jusqu'au début du XXI<sup>ème</sup> siècle.

Le Definitive Screening Design (DSD) est une forme spécifique de plan développée pour permettre une étude rapide et efficace d'un grand nombre de facteurs tout en réduisant le nombre total d'essais nécessaires. Contrairement à d'autres, tels que les plans factoriels complets, qui nécessitent souvent un grand nombre d'essais pour étudier plusieurs facteurs à plusieurs niveaux, le DSD est optimisé pour minimiser le nombre d'essais tout en détectant un maximum d'effets significatifs des facteurs (Xiao et al., 2012). Il est donc totalement adapté lorsque les ressources étudiées, le temps ou le budget s'avèrent limités. Il se positionne donc comme un outil très intéressant pour la recherche, le développement et l'optimisation en milieux scientifiques et industriels (Nguyen and Stylianou, 2013; Phoa and Lin, 2015).

Dans notre travail, la méthode du DSD a été choisie pour des extractions sous agitation en bioréacteur, avec et sans prétraitement ultrasons. Le but étant d'explorer la zone à basse température afin de limiter l'extraction de molécules tels que la chlorophylle tout en maximisant l'obtention des cannabinoïdes. L'intérêt du plan d'expérience est concrètement de réaliser une optimisation de cette extraction à des fins de scale-up à l'échelle pilote et industrielle. De multiples logiciels informatiques existent (ex : Matlab etc.) mais nous choisissons de réaliser l'entièreté de nos analyses statistiques à l'aide de Microsoft Excel.

L'ensemble des termes concernant le domaine des plans d'expériences sont définis par la norme ISO 3534-3 :2013 : « *Plus spécifiquement, elle définit les termes utilisés dans le domaine des plans d'expériences pour lesquels la variable de réponse est unidimensionnelle et continue et pour lesquels l'espérance mathématique de la variable de réponse est linéaire dans les paramètres. Les termes relatifs à l'analyse statistique sont fondés sur l'hypothèse que le terme d'erreur suit une loi normale avec une variance constante.* »

Il est donc important de bien définir et comprendre chaque terme qui sera utilisé dans la partie statistique :

- L'expérience est une étude intentionnelle d'un système par l'ajustement sélectif de conditions maîtrisables et l'affectation de ressources.
- Une réponse est une variable représentant le résultat d'une expérience (Ex : Rendements massiques, concentrations, teneurs, etc.).

- Un facteur est une propriété étudiée comme cause potentielle de variation (Ex : Température, vitesse agitation, temps d'extraction etc.).
- Le niveau est une mise en œuvre, valeur ou affectation d'un facteur (Ex : pour le nombre de variations de la température avec  $-30^{\circ}\text{C}$ ,  $0^{\circ}\text{C}$  et  $+30^{\circ}\text{C}$  soit  $n=3$ ).
- Le traitement est une mise en œuvre spécifique de chaque facteur utilisé sur une unité expérimentale particulière (Ex : ligne d'un tableau de l'expérience à mettre en œuvre, c'est-à-dire l'essai T01 à  $0^{\circ}\text{C}$ , 250rpm, sans ultrasons et pendant 60 minutes).
- Un plan d'expérience est l'affectation de traitements expérimentaux à chaque unité expérimentale.
- Une expérience planifiée doit fournir la méthode la plus efficace et la plus économique permettant, à partir de cette expérience, d'obtenir des conclusions valides et pertinentes.
- Un modèle est représentation formalisée des résultats d'une expérience. C'est une représentation simplifiée du système réel dans laquelle seules les caractéristiques clés ou fondamentales sont prises en compte. C'est un polynôme, une somme d'une constante avec des monômes de degré 1, de degré 2 et de degré rectangle dépendant du nombre de facteurs étudiés. Il y a 4 facteurs étudiés dans notre cas (température, vitesse, ultrasons, temps d'extraction) donc le polynôme complet est la somme d'une constante plus de quatre monômes de degré 1 ( $X_1, X_2, X_3, X_4$ ), plus de quatre de degré 2 ( $X_1^2, X_2^2, X_3^2, X_4^2$ ) et plus de quatre de degré rectangle ( $X_1X_2, X_1X_3, X_1X_4, X_2X_3, X_2X_4, X_3X_4$ ).
- La variable de prédiction est une variable susceptible de contribuer à l'explication du résultat d'une expérience Parmi les indicateurs de qualité, la qualité descriptive est exprimée par le coefficient de détermination  $R^2$  (entre 0 et 1) et la qualité prédictive est exprimée par le coefficient  $Q^2$ . Si cette dernière est négative, elle ne permet pas de prédire les résultats pour une réponse donnée.
- Le tracé des effets principaux est un tracé donnant la réponse moyenne aux différents niveaux de chaque facteur.
- L'effet principal est l'effet de facteur applicable dans le contexte de modèles linéaires par rapport à l'espérance mathématique. C'est-à-dire que l'effet principal est le résumé le plus drastique interprétable des variations observées.

### III.9.1. Désirabilité

La désirabilité est une fonction de description qui permet de mesurer en pourcentage la proximité des valeurs (spécifiques des facteurs) par rapport à une cible déterminée pour un ensemble de réponses donné. Elle peut être calculée suivant notre choix de maximiser le résultat (par exemple les rendements) ou bien minimiser le résultat (par exemple, la chlorophylle ou les écarts types) (Amdoun et al., 2018; Li et al., 2007).

La démonstration de ces formules d'optimisation a été bien développée dans la littérature, et elles ont été utilisées dans tous les domaines. Dans ce travail, le tableau de données a été créé et le minimum et le maximum pour chaque réponse définie ont été déterminés en utilisant toutes leurs valeurs de TPC, TFC, TCC, rendements et quantifications. Deux possibilités s'offraient à ce projet : maximiser une réponse ou la minimiser. Les formules

ont été exprimées en utilisant l'angle tangent  $\theta$  issu du graphique de la désirabilité en fonction de l'objectif à atteindre.

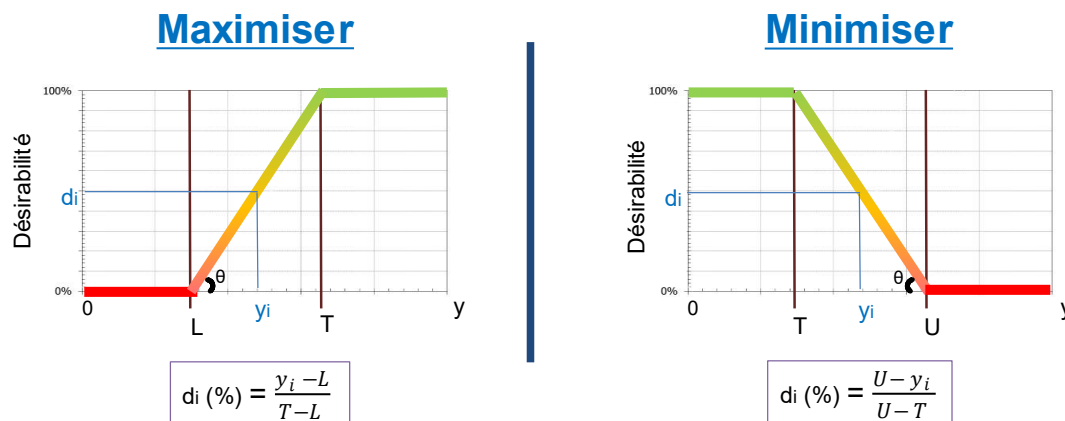


Figure 49 : Courbes explicatives des formules de maximisation ou minimisation de désirabilité  $d_i$

Les différents termes utilisés ont été définis comme suit : T la valeur ciblée souhaitée (Target), L la valeur la plus basse non souhaitée (Lower) ou U la valeur la plus haute non souhaitée (Upper) Les formules de désirabilité sont exprimées à l'aide de celle de la tangente l'angle  $\theta$ .

La désirabilité globale  $d_g$  a ensuite été calculée par le produit des désirabilités ( $d_n$ ) de chaque réponse entre elles pour un facteur donné. Les désirabilités ont été pondérées avec les objectifs souhaités, c'est-à-dire qu'elles ont été affectées d'un coefficient si certaines réponses étaient plus importantes que d'autres. La pondération est notée  $W_n$ . Si toutes les réponses ont le même poids, alors  $W_n$  prend la valeur 1. Ce concept peut donc être utilisé pour générer par fusion un indice de satisfaction "global".

$$d_g (\%) = (d_1^{w_1}) \times (d_2^{w_2}) \times \dots \times (d_n^{w_n})$$

Une fonction de distribution (utilisant les probabilités) a été produite avec la désirabilité globale pour tous les facteurs afin que ces valeurs classées puissent être comparées dans un seul graphique efficace.

$$\text{Probabilité (\%)} = \frac{d_{g \text{ rang}} - 1}{d_{g \text{ rang max}} - 1}$$

Les valeurs sont comprises entre 0 et 100 %. Le  $d_g$  ayant le rang le plus bas (1 dans notre cas) a été positionné à 0% et le  $d_g$  ayant le rang le plus élevé (11 ou 24 dans notre cas) sera positionné à 100%.

Les paramètres de désirabilité ont été appliqués pour corrélérer les réponses obtenues telles que le rendement, les teneurs en composés selon l'extraction et les facteurs expérimentaux (température, temps, agitation, solvant). Ce choix a permis de déterminer l'efficacité du plan d'expérience réalisé sur les 11 traitements du houblon et 24 traitements du cannabis.

Tableau 26 : Résumé des conditions imposées lors de l'approche statistique et de l'expression de leurs valeurs de désirabilité pondérées (dnWn) pour les traitements du houblon

	TPC	Ecart-type TPC	TFC	Ecart-type TFC	TCC	Ecart-type TCC	Rendement massique	Ecart-type rendement	CoHu	IX	XN	Hu	CoLp	Lp
Objectif	Max	Min	Max	Min	Min	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Max	Max	Max
L (mg/g DM) ou (%)	24.498		8.770				8.700		0.118		0.400	0.294	0.000	0.000
U (mg/g DM) ou (%)		7.819		3.368	13.475	2.049		1.783		0.130				
T (mg/g DM) ou (%)	75.526	1.063	24.928	0.642	2.081	0.142	31.700	0.007	12.001	0.030	2.290	19.661	15.367	21.540
Importance	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Haute	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Moyenne
Note	2	1	2	1	2	1	3	1	2	2	2	2	2	2
Poids	6.9%	6.9%	6.9%	6.9%	6.9%	6.9%	10.3%	6.9%	6.9%	6.9%	6.9%	6.9%	6.9%	6.9%

Désirabilité pondérée	$d_{y1}^{w_{y1}}$	$d_{s1}^{w_{s1}}$	$d_{y2}^{w_{y2}}$	$d_{s2}^{w_{s2}}$	$d_{y3}^{w_{y3}}$	$d_{s3}^{w_{s3}}$	$d_{y4}^{w_{y4}}$	$d_{s4}^{w_{s4}}$	$d_{y5}^{w_{y5}}$	$d_{y6}^{w_{y6}}$	$d_{y7}^{w_{y7}}$	$d_{y8}^{w_{y8}}$	$d_{y9}^{w_{y9}}$	$d_{y10}^{w_{y10}}$
SE	0.0%	99.1%	86.4%	95.9%	96.7%	99.2%	0.0%	99.5%	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
UAE-B +SE	95.5%	92.8%	96.3%	96.4%	95.8%	93.8%	87.3%	99.9%	100.0%	89.5%	100.0%	95.8%	100.0%	100.0%
UAE-P +SE	90.6%	87.0%	91.5%	0.0%	97.8%	0.0%	61.2%	99.7%	99.5%	92.0%	98.7%	95.3%	76.0%	74.1%
Triphasic SE	88.4%	97.5%	81.9%	100.0%	97.3%	96.8%	93.2%	93.9%	93.9%	96.5%	96.3%	98.4%	87.6%	85.6%
ASE 25	80.0%	98.8%	89.4%	99.3%	97.3%	100.0%	98.2%	97.8%	97.7%	95.3%	97.0%	100.0%	98.3%	98.3%
ASE 75	96.5%	100.0%	97.2%	95.2%	89.6%	96.8%	100.0%	99.9%	93.7%	97.6%	94.2%	97.0%	97.3%	97.6%
ASE 125	100.0%	0.0%	100.0%	94.9%	0.0%	94.9%	97.7%	100.0%	94.7%	93.9%	90.4%	98.6%	88.9%	86.5%
ASE 75 (30% H <sub>2</sub> O)	95.5%	99.7%	95.0%	100.0%	97.3%	98.5%	83.2%	97.4%	95.1%	96.5%	94.4%	98.9%	95.3%	95.5%
ASE 75 (70% H <sub>2</sub> O)	88.9%	86.5%	0.0%	92.3%	100.0%	99.1%	84.1%	0.0%	92.3%	89.5%	94.4%	97.9%	95.7%	95.7%
MAE 75 (5)	94.3%	78.1%	94.2%	98.5%	91.6%	97.9%	87.3%	99.1%	82.0%	99.3%	82.7%	87.6%	79.7%	77.4%
MAE 75 (15)	91.7%	91.2%	94.7%	99.3%	95.0%	95.5%	75.0%	97.1%	95.9%	0.0%	98.7%	99.4%	87.4%	85.4%

Tableau 27 : Désirabilité globale (dg) de chaque extraction du houblon et leur classement, ainsi que les probabilités associées à ces classements

Extrait	$d_g$ (%)	Rang	Probabilité (%)
SE	0.0	1	0
UAE-B +SE	64.5	8	70
UAE-P +SE	0.0	1	0
Triphasic SE	58.3	7	60
ASE 25	65.5	9	80
ASE 75	77.4	11	100
ASE 125	0.0	1	0
ASE 75 (30% H <sub>2</sub> O)	70.3	10	90
ASE 75 (70% H <sub>2</sub> O)	0.0	1	0
MAE 75 (5)	53.0	6	50
MAE 75 (15)	51.9	5	40

Tableau 28 : Résumé des conditions imposées lors de l'approche statistique et de l'expression de leurs valeurs de désirabilité pondérées (dnWn) pour les traitements cannabis

	TPC	Ecart type TPC	TFC	Ecart type TFC	TCC	Ecart type TCC	DPPH	Ecart type DPPH	Rendement massique	Ecart type Rendement
Objectif	Maximiser	Minimiser	Maximiser	Minimiser	Minimiser	Minimiser	Maximiser	Minimiser	Maximiser	Minimiser
L (mg/g DM) ou (%)	2.93		0.00				0.64		9.76	
U (mg/g DM) ou (%)		10.96		9.11	456.99	111.27		2.42		4.63
T (mg/g DM) ou (%)	108.20	0.28	24.34	0.00	0.79	0.27	11.10	0.00	33.95	0.27
Importance	Fort	Faible	Moyen	Faible	Fort	Faible	Faible	Faible	Fort	Faible
Note	3	1	2	1	3	1	1	1	3	1
Poids	18%	6%	12%	6%	18%	6%	6%	6%	18%	6%

	$d_{Y1}^{wY1}$	$d_{S1}^{wS1}$	$d_{Y2}^{wY2}$	$d_{S2}^{wS2}$	$d_{Y3}^{wY3}$	$d_{S3}^{wS3}$	$d_{Y4}^{wY4}$	$d_{S4}^{wS4}$	$d_{Y5}^{wY5}$	$d_{Y6}^{wY6}$
SE 25 H <sub>2</sub> O	0.00%	100.00%	0.00%	100.00%	100.00%	100.00%	0.00%	99.80%	0.00%	100.00%
SE 50 H <sub>2</sub> O	51.22%	99.18%	0.00%	100.00%	99.32%	99.56%	89.32%	100.00%	74.83%	94.30%
SE -10	84.25%	96.46%	93.96%	98.87%	92.71%	95.95%	97.16%	98.69%	88.42%	96.32%
SE 0	84.00%	91.94%	94.50%	98.84%	93.48%	97.91%	97.20%	97.92%	88.50%	96.09%
SE 25	85.16%	98.57%	92.80%	98.64%	95.03%	98.84%	96.17%	99.58%	88.94%	98.72%
SE 50	86.35%	95.65%	93.12%	95.96%	66.71%	95.84%	97.49%	99.58%	92.09%	98.95%
UAE-B +SE	84.17%	97.51%	92.08%	98.40%	97.02%	99.72%	95.53%	99.41%	87.10%	99.62%
UAE-P +SE	86.06%	98.66%	94.32%	98.95%	94.68%	98.87%	96.56%	99.50%	89.66%	99.95%
Successiv SE	90.93%	0.00%	100.00%	0.00%	70.88%	99.19%	99.32%	91.94%	100.00%	98.57%
Triphasic SE	84.79%	95.50%	89.28%	98.34%	93.07%	98.87%	95.88%	97.62%	87.79%	94.35%
Soxhlet	83.56%	99.52%	89.90%	96.44%	0.00%	0.00%	98.37%	99.46%	91.91%	98.41%
MAE 50 (5)	83.78%	96.57%	91.12%	98.99%	95.47%	98.49%	96.69%	99.37%	88.42%	97.71%
MAE 75 (5)	83.48%	98.39%	88.50%	98.07%	93.32%	98.11%	97.00%	97.39%	89.10%	95.24%
MAE 100 (5)	83.55%	93.85%	88.16%	99.10%	89.46%	92.11%	97.11%	99.06%	88.98%	96.47%
MAE 125 (5)	81.32%	99.95%	85.37%	98.73%	86.24%	93.83%	97.79%	99.07%	88.09%	99.11%
MAE 50 (15)	83.22%	95.04%	91.78%	97.23%	93.18%	99.06%	97.43%	96.86%	87.96%	95.13%
MAE 75 (15)	82.98%	92.22%	90.60%	99.40%	88.88%	97.38%	97.88%	0.00%	91.70%	0.00%
MAE 100 (15)	82.44%	98.29%	89.22%	99.09%	85.56%	99.50%	98.13%	98.93%	88.88%	97.36%
MAE 125 (15)	81.70%	98.40%	80.88%	99.12%	54.81%	91.85%	99.46%	98.27%	89.80%	94.84%
ASE 25	100.00%	93.75%	92.94%	96.73%	93.55%	97.42%	97.93%	98.19%	90.22%	97.34%
ASE 50	96.31%	94.66%	90.33%	98.76%	83.25%	98.88%	98.81%	97.65%	92.90%	98.37%
ASE 75	87.45%	90.58%	89.91%	98.49%	59.21%	91.41%	98.79%	99.03%	92.25%	90.97%
ASE 100	87.14%	94.38%	89.13%	99.45%	60.82%	95.28%	99.46%	98.20%	95.60%	97.34%
ASE 125	86.82%	96.61%	84.68%	98.86%	45.73%	99.31%	100.00%	98.85%	95.54%	98.99%

Tableau 29 : Désirabilité globale (dg) de chaque extraction du cannabis et leur classement, ainsi que les probabilités associées à ces classements

	<b>d<sub>g</sub> (%)</b>	<b>Rang</b>	<b>Probabilité (%)</b>
SE 25 H <sub>2</sub> O	0.00%	1	0.00%
SE 50 H <sub>2</sub> O	0.00%	1	0.00%
SE -10	54.80%	18	73.90%
SE 0	53.40%	17	69.60%
SE 25	60.70%	22	91.30%
SE 50	41.70%	10	39.10%
UAE-B +SE	59.30%	21	87.00%
UAE-P +SE	63.90%	23	95.70%
Successiv SE	0.00%	1	0.00%
Triphasic SE	50.70%	13	52.20%
Soxhlet	0.00%	1	0.00%
MAE 50 (5)	57.00%	19	78.30%
MAE 75 (5)	52.30%	16	65.20%
MAE 100 (5)	46.60%	11	43.50%
MAE 125 (5)	46.90%	12	47.80%
MAE 50 (15)	51.50%	15	60.90%
MAE 75 (15)	0.00%	1	0.00%
MAE 100 (15)	51.20%	14	56.50%
MAE 125 (15)	27.00%	6	21.70%
ASE 25	64.90%	24	100.00%
ASE 50	59.00%	20	82.60%
ASE 75	31.20%	8	30.40%
ASE 100	38.40%	9	34.80%
ASE 125	29.80%	7	26.10%



### III.9.2. Méthode TOPSIS

Cette méthode consiste à réduire au minimum la distance entre la solution idéale et le traitement (parmi tous ceux réalisés) tout en augmentant sa distance par rapport à la solution la plus défavorable (Hwang and Yoon, 1981; Liu, 2009). En pratique, cette méthode permet de réaliser un classement préliminaire de l'ensemble des traitements réalisés et donc de savoir lequel aurait une tendance supérieure et idéale par rapport aux autres. Pour appliquer cette méthode, plusieurs étapes doivent être réalisées : Construire une matrice, la normaliser, définir la meilleure et pire solution ( $V^+$  et  $V^-$ ), déterminer les distances de nos traitements par rapports à ces solutions ( $S^+$  et  $S^-$ ) et enfin calculer leurs proximités (scores). Pour mieux visualiser, un schéma explicatif peut-être agencé de la manière suivante. Dans ce dernier seulement 4 traitements de T01 à T04 sont présentés, mais la logique est identique pour les neuf traitements que nous avons réalisés. C'est-à-dire qu'il faut être le plus près de  $V^+$  et le plus loin de  $V^-$ .

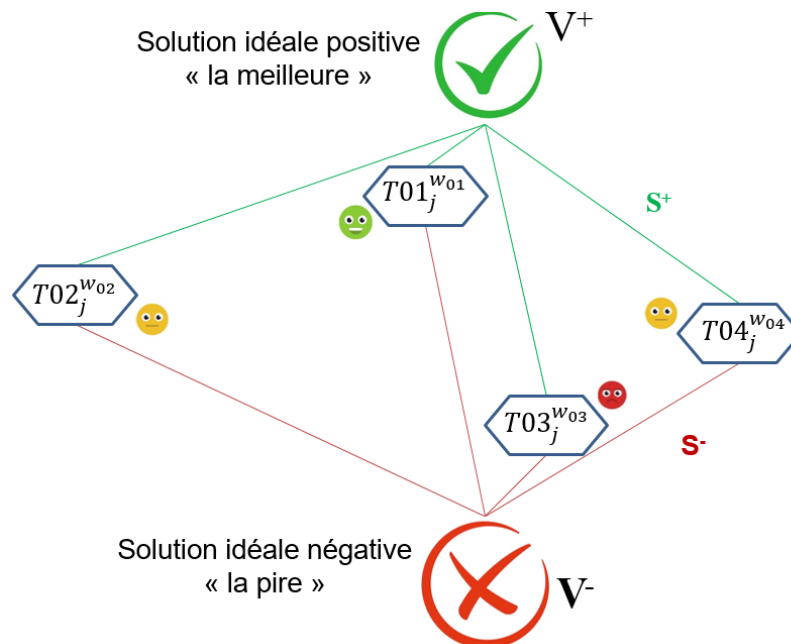


Figure 50 : Schéma méthode TOPSIS

D'un point de vue pratique, une fois que l'ensemble des valeurs des traitements (de T01 à T09) à comparer a été réalisé et disposé en tableau, il a été nécessaire de normaliser ces données. Ceci est obligatoire si l'on souhaite comparer les réponses entre elles du fait de leurs unités de mesures expérimentales différentes. Un traitement normalisé est noté  $T_{ij}$  et la somme des valeurs normées pour les traitements de T01 à T09 d'une réponse doit être égale à 1.

Pour ce faire, la formule suivante a été utilisée pour un traitement  $T_i$  d'une réponse donnée :

$$T_{ij} = \frac{\text{valeur } T_i}{\sqrt{(\text{valeur } T01)^2 + (\text{valeur } T02)^2 + \dots + (\text{valeur } (T_i))^2}}$$

Une importance a été appliquée aux différentes réponses avec une note équivalente : très faible (=1), faible (=3), moyenne (=5), forte (=7) et très forte (=9). En fonction de la note attribuée, le poids ( $w_i$ ) de chaque réponse a été calculé et appliqué pour obtenir la valeur pondérée ( $T_{ij}^{w_i}$ ) avec les formules suivantes :

$$w_i(\%) = \frac{note_i}{\sum_{i=1}^k note_i}$$

$$T_{ij}^{w_i} = T_{ij} \times w_i$$

Pour chaque réponse donnée, un objectif a été défini qu'il soit de maximiser cette dernière ou soit de la minimiser. La meilleure valeur parmi toutes celles pondérées des neuf traitements a été notée  $V^+$  et la valeur qui sera la moins intéressante  $V^-$  (la « pire »). Par exemple, si l'objectif est de maximiser le rendement massique,  $V^+$  est la valeur maximale et  $V^-$  la valeur minimale. Et inversement dans le cas où minimiser était le souhait.

L'étape suivante était de déterminer la distance (S) de chacun des valeurs de traitements précédemment pondérées par rapport à la solution idéale ( $V^+$ ) et à la pire solution ( $V^-$ ). Une distance  $S^+$  a été obtenue par rapport à l'idéal et une distance  $S^-$  par rapport à l'autre. Notre traitement devait être soit le plus près possible de  $S^+$  et le plus loin possible de  $S^-$ .

$$S_{ij}^+ = \sqrt{\sum_{i=1}^k (V^+ - T_{ij}^{w_i})^2} \quad S_{ij}^- = \sqrt{\sum_{i=1}^k (V^- - T_{ij}^{w_i})^2}$$

Enfin, la dernière étape a été de calculer le score, c'est-à-dire le coefficient spécifique à la proximité de chaque traitement par rapport à la solution idéale  $V^+$  et la solution défavorable  $V^-$ . Ce coefficient a permis d'établir le rang du traitement par rapport à tous ceux réalisés. Ainsi chaque coefficient noté  $S_i^*$  a été calculé suivant l'équation suivante :

$$S_i^* = \frac{S_{ij}^-}{S_{ij}^- + S_{ij}^+} \text{ avec } 0 \leq S_i^* \leq 1$$

Ce score devait évidemment être le plus élevé possible et donc le plus proche de 1. Si  $S_{ij}^+ = 0$ , cela signifie que le traitement était très proche de l'idéal, donc  $S_i^* = 1$ . Si  $S_{ij}^- = 0$ , cela signifie que le traitement était éloigné de l'idéal, très proche de la solution défavorable, donc  $S_i^* = 0$ .

Les résultats obtenus pour les différents traitements du cannabis sont exprimés ci-dessous.

Tableau 30 : Paramètres et résultats de l'analyse des traitements par la méthode TOPSIS pour les extraits de cannabis

Définition des pondérations	Rendement massique	TPC	TFC	TCC	DPPH	[THCA]	[THC]	[CBN]	[CBD]
Importances	Très forte	Très faible	Très faible	Moyenne	Faible	Très forte	Très forte	Très forte	Faible
Notes	9	1	1	5	3	9	9	9	3
Poids	18.4%	2.0%	2.0%	10.2%	6.1%	18.4%	18.4%	18.4%	6.1%

Valeurs pondérées	Rendement massique (%)	TPC (mg GAE/g DM)	TFC (mg QuE/g DM)	TCC (mg /g DM)	DPPH (mg TE/g MS)	[THCA] (µg/mg)	[THC] (µg/mg)	[CBN] (µg/mg)	[CBD] (µg/mg)
T01	0.0608	0.0069	0.0032	0.0144	0.0197	0.0751	0.0540	0.0582	0.0152
T02	0.0526	0.0056	0.0032	0.0214	0.0169	0.0681	0.0631	0.0666	0.0190
T03	0.0583	0.0053	0.0078	0.0099	0.0188	0.0634	0.0540	0.0548	0.0190
T04	0.0631	0.0082	0.0100	0.0583	0.0225	0.0579	0.0700	0.0657	0.0228
T05	0.0589	0.0061	0.0076	0.0124	0.0196	0.0668	0.0574	0.0464	0.0190
T06	0.0621	0.0071	0.0087	0.0554	0.0211	0.0511	0.0689	0.0759	0.0228
T07	0.0614	0.0066	0.0071	0.0257	0.0194	0.0555	0.0631	0.0615	0.0228
T08	0.0636	0.0077	0.0057	0.0347	0.0216	0.0544	0.0597	0.0666	0.0190
T09	0.0690	0.0071	0.0044	0.0340	0.0234	0.0544	0.0586	0.0497	0.0228

Définition des objectifs	Rendement massique (%)	TPC (mg GAE/g DM)	TFC (mg QuE/g DM)	TCC (mg /g DM)	DPPH (mg TE/g MS)	[THCA] (µg/mg)	[THC] (µg/mg)	[CBN] (µg/mg)	[CBD] (µg/mg)
Objectif	Maximiser	Maximiser	Maximiser	Minimiser	Maximiser	Maximiser	Maximiser	Maximiser	Maximiser
V_PLUS	0.0690	0.0082	0.0100	0.0099	0.0234	0.0751	0.0700	0.0759	0.0228
V_MOINS	0.0526	0.0053	0.0032	0.0583	0.0169	0.0511	0.0540	0.0464	0.0152

Calculer des distances	S+	S-
T01	0.0279	0.0521
T02	0.0264	0.0464
T03	0.0317	0.0514
T04	0.0527	0.0306
T05	0.0353	0.0495
T06	0.0520	0.0361
T07	0.0311	0.0394
T08	0.0360	0.0344
T09	0.0431	0.0317

### III.9.3. Plan d'expérience (DSD) et effets principaux

La première étape de réalisation d'un DSD était la création d'une matrice. Afin de créer cette matrice et d'obtenir les traitements, il a fallu définir le nombre de facteurs, le nombre de niveaux, le pas et le centre de ces niveaux et les réponses à étudier.

Tableau 31 : Facteurs et niveaux définis pour le plan d'expérience

Définition des facteurs	F1	Température
	F2	Vitesse agitation
	F3	Temps Ultrasons
	F4	Temps extraction

Réglages	Température (°C)	Vitesse agitation (rpm)	Temps Ultrasons (min)	Temps extraction (min)
CENTRE	0	150	15	90
PAS	30	100	15	30

Après que les facteurs ont été définis, la matrice présentée dans la publication de Jones a été utilisée afin de réaliser un DSD de 4 facteurs à 3 niveaux (Jones and Nachtsheim, 2011).

#### DEFINITIVE SCREENING IN THE PRESENCE OF SECOND-ORDER EFFECTS

m = 4	m = 5	m = 6	m = 7	m = 8
1 0+--	1 0++--	1 0+----	1 0+----+	1 0-++++
2 0-++	2 0--++	2 0-++++	2 0-+++++	2 0+----
3 -0-+	3 +0--+	3 +0-++-	3 -0-++-	3 -0-++++
4 +0+-	4 -0++-	4 -0-++-	4 +0-++-	4 +0-++-
5 --0-	5 +-0+-	5 --0+--	5 +-0++++	5 --0++-
6 ++0+	6 --0-+	6 ++0-++	6 --0----	6 ++0-++-
7 -++0	7 +-+0-	7 -++0+-	7 +-+0+-	7 +-+0+-
8 +-+0	8 --+0-	8 +-+0-+	8 --+0-+	8 --+0-+
9 0000	9 ++++0	9 +-+-0-	9 ---+0-	9 ---+0-
	10 ----0	10 -++0+	10 ++-0++	10 ++-0++
	11 00000	11 ++++0	11 -+-+0+	11 -+-+0+
		12 ----+0	12 +-+-0-	12 -++-0-
		13 000000	13 +++++0	13 -++-+0
			14 ----+0	14 +-+-0-
			15 0000000	15 ++++++0
				16 ----+0
				17 00000000

Figure 51 : Matrices de plan d'expérience à 3 niveaux de 4 à 8 facteurs

Le tableau suivant a été obtenu après application de la matrice présentée ci-dessus en sachant que + = 1 et que - = -1. Les niveaux -1, 0 et +1 ont été définis et remplacés par leurs valeurs respectives pour chaque facteur.

Tableau 32 : Matrice de 4 facteurs à 3 niveaux traduit avec nos paramètres à étudier

	Température (°C)	Vitesse agitation (rpm)	Temps Ultrasons (min)	Temps extraction (min)
T01	0	250	0	60
T02	0	50	30	120
T03	-30	150	0	120
T04	30	150	30	60
T05	-30	50	15	60
T06	30	250	15	120
T07	-30	250	30	90
T08	30	50	0	90
T09	0	150	15	90

Pour chaque réponse obtenue à l'issue des traitements, un enchainement de fonctions (fonction de répartition, moyenne des résultats et le tracé des effets principaux) a été effectué.

Tout d'abord, pour rappel, la fonction de répartition permet de réorganiser simplement nos jeux de données afin d'en faciliter la lecture. Elle permet de faire apparaître visuellement le meilleur résultat pour une réponse donnée, la pire condition expérimentale ainsi que les écarts (graphiquement visibles) entre certains résultats. L'ensemble de données des traitements pour toutes les réponses ont été compilées dans un tableau avant d'être triées et classées après leur avoir affiliées un rang. La probabilité a été calculé par rapport au rang maximal de la manière suivante :

$$\text{Probabilité (\%)} = \frac{\text{rang} - 1}{\text{Rang max} - 1}$$

Le graphique de la fonction de répartition pour une réponse donnée a été tracé et exprimé par la probabilité en fonction de la réponse obtenue pour chaque traitement.

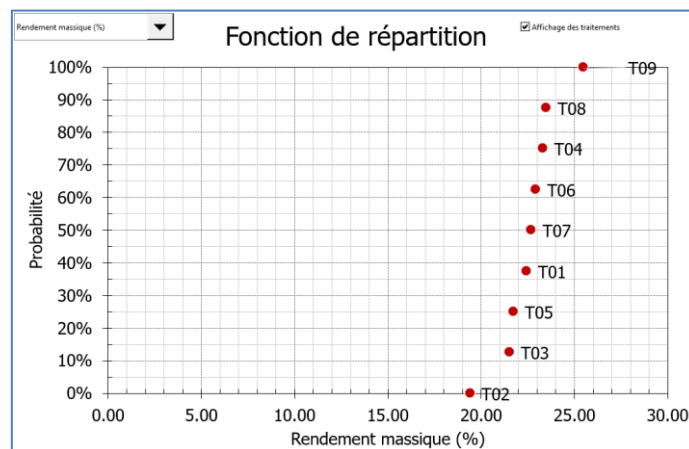


Figure 52 : Fonction de répartition du rendement massique en fonction de la probabilité des 9 traitements (T01 à T09) du DSD sur les extraits de cannabis

Pour chacune des réponses 9 étudiées (rendements, teneurs etc.), les calculs de moyenne pour les trois niveaux (par exemple : -30, 0 et 30 °C) de chacun des quatre facteurs que nous étudions (température, vitesse, ultrasons et temps d'extraction) ont été réalisés.

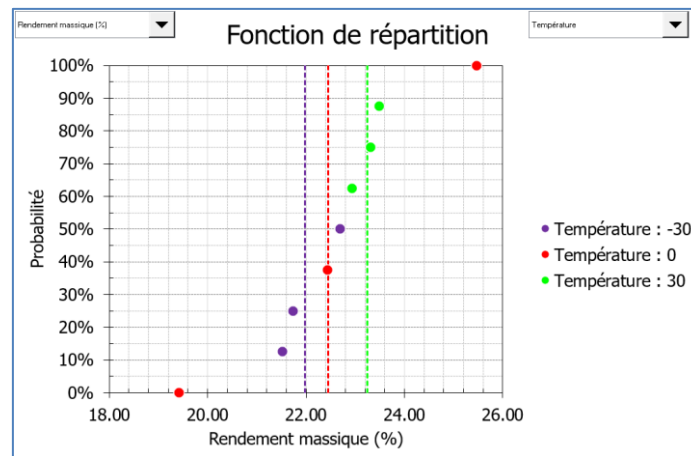


Figure 53 : Fonction de répartition du rendement massique en fonction de la probabilité des 9 traitements (T01 à T09) du DSD avec les moyennes des trois niveaux de température sur les extraits de cannabis

Sur le graphique ci-dessus, le trait vertical coloré correspond à la moyenne des résultats propre à cette couleur d'un même niveau.

La dernière étape est le tracé des effets principaux à l'aide des moyennes décrites précédemment. Mais avant il est important de définir l'intérêt de ces tracés sur notre étude.

Un total de quatre facteurs (vitesse, temps, ultrasons, température) notés « k » et de trois niveaux (-1, 0 et +1) notés « n » ont été déterminés. Le nombre total de traitements à réaliser aurait dû être :  $N_{total} = k^{n_i} = 3^4 = 81$  combinaisons. Le DSD nous a permis d'en étudier donc seulement 9 au lieu de 81. De plus, le nombre total d'effets potentiels et principaux liés aux nombres de combinaisons spécifiques à notre projet ont également été calculés par :

$$N_{effets} = N_{total} \times (N_{total} - 1) = 6480 \text{ effets potentiels}$$

$$N_{effets\ principaux} = \sum_{i=1}^k n_i (n_i - 1) = \sum_{i=1}^k n_i (n_i - 1) = 12 \text{ effets principaux}$$

Les effets principaux ont permis d'obtenir ainsi le résumé le plus drastique des effets potentiels tout en éliminant les covariances, donnant les réponses moyennes aux différents niveaux de chaque facteur.

Afin d'obtenir ces effets principaux, la fonction de répartition précédemment décrites ainsi que les moyennes des résultats pour un même facteur ont été utilisées. La différence entre les moyennes des résultats expérimentaux obtenus représente les effets principaux. Les points obtenus (spécifiques à une réponse donnée) sont ensuite reportés sur un graphique pour l'ensemble des quatre facteurs étudiés (température, temps, ultrasons, agitation).

Chacune des réponses a été étudié de façon identique (9 réponses en tout). L'ensemble des tracés des effets principaux de toutes les réponses ont été discutés dans la partie dédiée aux résultats.

### III.10. Formulation galénique

L'un des objectifs fixés par l'entreprise a été d'évaluer la possibilité d'administrer le THC ou le CBN par voie buccale, sous forme de comprimés sublinguaux dosés à 5 mg.

Le travail de formulation s'est appuyé sur une publication présentant le développement de comprimés orodispersibles à base de CBD par compression directe en utilisant le PROSOLV® Easytab SP comme excipient de compression directe. (Vlad et al., 2021).

#### III.10.1. Préparation du mélange pour la compression

Le principe actif et l'excipient ont été tamisés puis pesés pour que les 200 g de mélange final contiennent 5% de CBD (10 g de CBD et 190 g de PROSOLV®). Après pesée, le mélange a été réalisé dans un flacon, avec un mélangeur Turbula (Figure 54) pendant 10 minutes. Le mélange obtenu a été versé dans la trémie de la machine de compression alternative Frogerais OA (Figure 55) montée avec des poinçons de forme concave de 6 mm. Une fois la force ajustée et le volume de la matrice réglé pour que la masse des comprimés soit égale à 100mg, la dureté et l'aspect d'un comprimé ont été contrôlés (une force de rupture suffisante, c'est-à-dire supérieure à 10 daN, et une cassure diamétrale sans formation de strates). Après ajustement de ces réglages, la machine de compression a été démarrée en mode automatique pour produire une série d'environ 100 comprimés afin de réaliser les tests de désagrégation,



Figure 54 : Mélangeur Turbula avec le flacon contenant la formulation de CBD+ PROSOLV®



Figure 55 : Machine de compression FROGERAIS

d'uniformité de masse, de résistance à la rupture et de friabilité.

### III.10.2. Tests pharmacotechniques

L'ensemble des méthodes utilisées dans ce travail sont décrites dans la pharmacopée européenne version 11.4.

#### III.10.2.1. Uniformité de masse

L'uniformité de masse est un contrôle de pharmacotechnie réalisé sur un lot de comprimés afin de s'assurer de la régularité de masse des comprimés. Ce contrôle est défini par la monographie 2.9.5 Uniformité de masse des préparations unidoses de la Pharmacopée Européenne.

Un prélèvement de 20 comprimés a été réalisé. Ces comprimés ont été dépoussiérés à l'aide d'un pinceau et pesés séparément sur la balance de précision Kern 770. La masse moyenne (notée  $m_{\text{moyenne}}$ ) et l'écart-type ( $\sigma$ ) de la masse individuelle des comprimés ont été calculés. L'écart-limite (EI) était donné par la Pharmacopée Européenne d'après la forme pharmaceutique réalisée et sa masse moyenne (Tableau 33).

Tableau 33 : Masse des formes pharmaceutique selon la monographie 2.9.5

Forme pharmaceutique	Masse moyenne	Ecart en pourcentage
Comprimés non enrobés et comprimés pelliculés	Au maximum 80 mg	10
	Plus de 80 mg et moins de 250 mg	7,5
	250 mg ou plus	5
Poudres pour injection ou pour perfusion*	Plus de 40 mg	10
Suppositoires et ovules	Sans distinction de masse	5
Autres formes pharmaceutiques, sauf si la monographie de la forme pharmaceutique considérée spécifie d'autres limites, notamment mais non exclusivement les capsules, les granulés (non enrobés), les poudres, les poudres pour collyres et les poudres pour solutions pour lavage ophtalmique.	Moins de 300 mg	10
	300 mg ou plus	7,5

\* Lorsque la masse moyenne est au maximum de 40 mg, on effectue l'essai d'uniformité de teneur des préparations unidoses (2.9.6) au lieu de l'essai d'uniformité de masse.

Les résultats ont été ensuite exprimés dans deux essais différents : l'essai pharmacopée et l'essai statistique. Dans l'essai pharmacopée, les intervalles ( $m_{\text{moyenne}} \pm EI$ ) et ( $m_{\text{moyenne}} \pm 2EI$ ) ont été déterminés. Pour que le résultat soit conforme, au maximum 2 valeurs de masses peuvent être en dehors du premier intervalle mais aucune valeur en dehors du second intervalle. Dans l'essai statistique, l'intervalle théorique est déterminé à l'aide de la masse théorique (100mg) et l'écart limite de la pharmacopée ( $m_{\text{théorique}} \pm EI$ ). Puis l'intervalle expérimental ( $m_{\text{moyenne}} \pm tS_m$ ) est calculé avec  $t=2.093$  (coefficient de Student) et  $S_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$  ( $n= 20 =$  nombre de comprimés contrôlés). L'intervalle expérimental doit être totalement intégré dans l'intervalle théorique pour que le lot de comprimés soit jugé conforme.

L'essai pharmacopée permet de vérifier la régularité de masse du lot de comprimés alors que l'essai statistique permet de vérifier que la masse des comprimés est régulière mais également qu'elle est proche de la masse théorique.



### III.10.2.2. Résistance à la rupture

Cet essai est décrit dans la monographie 2.9.8 Résistance à la rupture des comprimés. Il permet de mesurer la résistance des comprimés à une force appliquée diamétralement. Cet essai permet d'étudier d'une part la force moyenne nécessaire pour rompre les comprimés et d'autre part les types de fissures, cassures provoquées sur les comprimés. La meilleure situation s'avère être une cassure diamétrale rectiligne formant deux morceaux avant qu'ils soient écrasés. Si des stratifications sont observées ou que les fissures sont incomplètes, des corrections doivent être appliquées (force, masse, excipient etc.).

10 comprimés ont été dépoussiérés avant d'être disposés un par un dans le duromètre (Schleuniger 2<sup>E</sup>, Figure 56). La valeur de force exprimée en déca Newtons (daN) a été relevée lorsque le comprimé a complètement été écrasé.



Figure 56 : Duromètre Schleuniger-2E

### III.10.2.3. Friabilité

Ce contrôle, défini dans la monographie 2.9.7 Friabilité des comprimés non enrobés, permet d'évaluer la résistance des comprimés soumis à des chocs répétitifs.

La masse unitaire étant inférieure à 650mg, un échantillon de comprimés a été prélevé correspondant à une masse la plus proche possible de 6,5 g. La masse exacte initiale (notée  $m_i$ ) est obtenue après dépoussiérage au pinceau. Les comprimés ont ensuite été disposés dans le tambour de l'appareil (Figure 57) et soumis à 25tours par minute, pendant 4 minutes (afin de subir environ 100 chutes). Les comprimés ont été récupérés et dépoussiérés avant d'être à nouveau pesés ensemble pour obtenir la masse finale (notée  $m_f$ ). Les résultats ont été interprétés grâce au calcul de la perte de masse notée PM qui est exprimée en pourcentage (%).

$$PM (\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100$$

Si  $PM < 1,0\%$  alors l'essai est conforme. Si certains comprimés récupérés sont fissurés, fêlés, éclatés ou cassés, la friabilité est non conforme. Un ajustement de la formule ou bien de la force de compression est à réaliser pour améliorer la tenue mécanique des comprimés.



Figure 57 : Appareil de friabilité APPARATEBAU Erweka

#### III.10.2.4. Désagrégation

La procédure à suivre pour mesurer le temps de désagrégation est décrite dans la Pharmacopée Européenne à la monographie 2.9.1 Désagrégation des comprimés et des capsules. Elle permet d'évaluer le temps nécessaire pour que la forme pharmaceutique se délite dans un milieu liquide.

L'essai de désagrégation a été réalisé en une fois sur 6 comprimés répartis chacun dans un tube grillagé du panier de l'appareil (Figure 58). L'eau a préalablement été chauffée à  $37 \pm 2$  °C avant de démarrer un cycle de 15 min au maximum. L'essai a été arrêté après que l'ensemble des 6 comprimés soit délité.

L'essai était conforme si les comprimés se délitaient en moins de 3 min. Ce temps de 3 min a été choisi afin de garantir une libération rapide du principe actif puisque l'objectif est de soulager rapidement le patient. Cette limite a été définie arbitrairement dans la mesure où il n'y a pas de spécification à la Pharmacopée pour les comprimés sublinguaux.

Dans le cas où un comprimé n'était pas délité dans le délai, le test devait être réitéré avec 12 comprimés. Pour que l'essai soit conforme, 16 comprimés sur l'ensemble des deux essais (18 comprimés au total) devaient s'être désagrégés dans le temps imparti. Si le résultat était non conforme, la formule et/ou les conditions de compression devaient être retravaillés.



Figure 58 : Appareil de désagrégation Erweka ZT3



# Partie IV

## Résultats et discussions





## Partie IV. Résultats et discussions

### IV.1. *Humulus lupulus* L.

#### IV.1.1. Etude préliminaire des différentes extractions

Une étude préliminaire des rendements massiques d'extraction de l'ensemble des manipulations a été réalisée afin de définir des « meilleures » conditions pour chacune expérience.

A noter que les deux premières expériences (extractions par macération de 0.5 h à 4h et bains à ultrasons de 10 à 60 min uniquement) ont été réalisés sur un lot ancien de cônes de houblons présent au laboratoire. Ceci explique le léger décalage des valeurs de masses extraites et de rendements obtenus pour une même expérience en raison de dégradations potentielles de molécules. Même si les valeurs sont légèrement différentes, ces manipulations ont donné un ordre de grandeur et ont permis de déterminer des paramètres de références qui ont ensuite été reproduits sur le lot frais exclusif à ce travail.

#### - Macération classique sous agitation (SE) :

Le temps de contact entre le solvant et le matériel végétal a été le paramètre principal affectant les rendements.

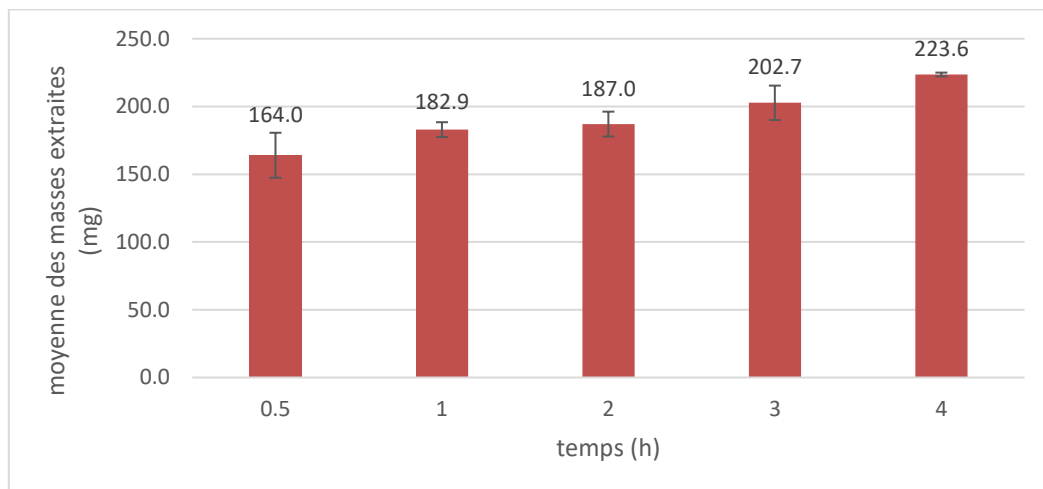


Figure 59 : Graphique de la moyenne des masses extraites en fonction du temps de macération à l'éthanol

Le rendement massique varie entre 8.2 et 11.1 % entre 0,5 h et 4 h. En fonction de ce résultat, une durée de 2 h a été choisie comme référence car il représente un compromis entre rendement massique convenable et le coût énergétique.

La formation de produits secondaires ou l'extraction de composés non désirables peuvent être également suspectés lorsque le temps d'extraction est prolongé.

- Macération avec un bain à ultrasons (UAE-B) :

Le type de source d'ultrasons employée et son intensité sont des paramètres en plus qui peuvent faire varier les rendements.

Une macération dans un bain à ultrason (UAE-B) sous agitation à température ambiante pendant 2h en triplicat a été réalisée et a conduit à un rendement de  $8.7 \pm 0.3$  % (moyenne de masses extraites de  $173.6 \pm 6.1$  m).

Une réduction de la fourchette du temps d'extraction entre 40 et 60 min a permis d'obtenir des résultats comparables à 2h, prouvant l'intérêt de l'utilisation des ultrasons sur cette plante.

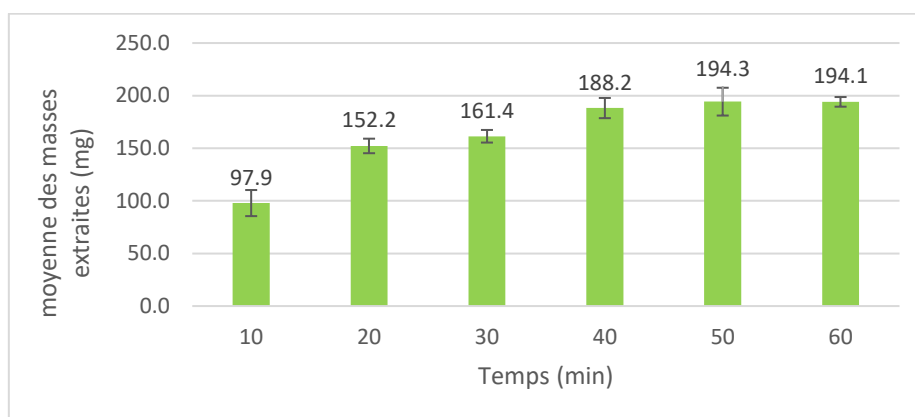


Figure 60 : Graphique de la moyenne des masses extraites en fonction du temps d'ultrasons à l'éthanol

Cependant, les ultrasons produits par le bain ont induit une hausse de température non négligeable (5 à 15 °C) après 20 à 30 min. Cette hausse pourrait expliquer des masses extraites plus conséquentes après ces durées. Le temps maximal de prétraitement de 15 min a été fixé afin de ne pas engendrer de modifications de la température et d'induire des dégradations de métabolites.

Une comparaison des extractions avec un bain et une sonde à ultrasons dans les mêmes conditions et un temps de 5 et 15 min a été effectuée.

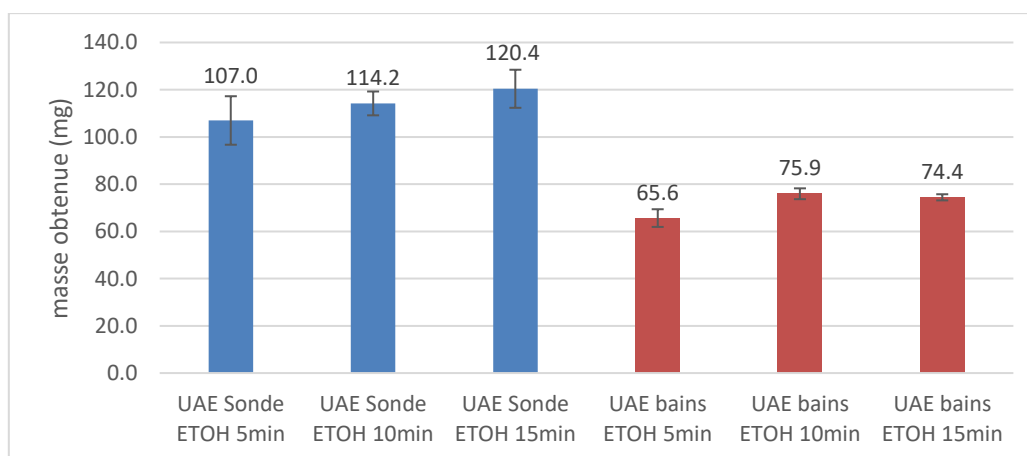


Figure 61 : Graphique de la moyenne des masses extraites en fonction du temps d'ultrasons par bain ou sonde à l'éthanol

Les résultats ont montré qu'avec la sonde (UAE-P), les rendements sont quasiment le double pour un même temps donné. En effet, à 15 min :  $UAE_{\text{bain}} = 7.4 \pm 0.2 \%$  et  $UAE_{\text{sonde}} = 12.0 \pm 0.8 \%$ . Néanmoins, malgré la différence de résultats, le bain à ultrasons n'est pas à exclure pour le côté pratique d'utilisation et moins coûteux que la sonde.

- Combinaison bain ou sonde à ultrasons et macération conventionnelle (UAE + SE)

Le couplage de ces deux méthodes extractives a été effectué dans les conditions jugées intéressantes des essais précédents. Les résultats obtenus par ultrasons seuls (par bain ou sonde) ont été comparés aux ceux obtenus en rajoutant une macération sous agitation de 2 h.

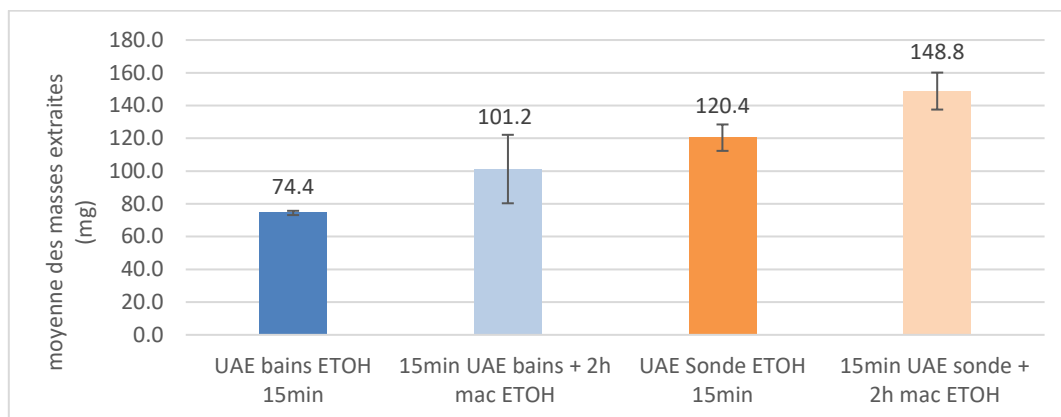


Figure 62 : Graphique de la moyenne des masses extraites en fonction du temps comparant les techniques d'ultrasons seuls à un couplage UAE+SE

La combinaison d'un prétraitement aux ultrasons suivi d'une macération sous agitation de 2 h a amélioré de manière positive les résultats. Une augmentation des masses extraites (+26.8 mg et +28.4 mg) et donc des rendements a été observée.

Ce prétraitement de courte durée aux ultrasons avant de réaliser une macération classique pourra donc être envisagé comme une technique intéressante.

- Macération successive (Successive SE)

L'épuisement maximal des métabolites accessibles de la matrice végétal a été effectué à l'aide des solvants de différentes polarités.

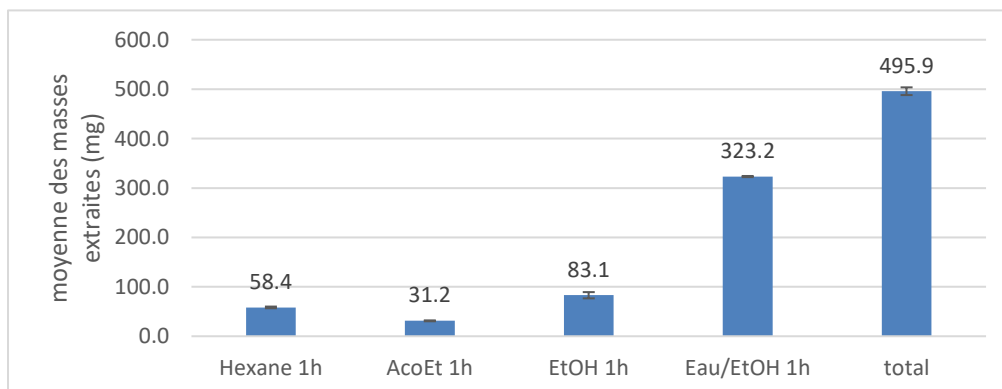


Figure 63 : Graphique de la moyenne des masses extraites en fonction du solvant d'extraction successif



Ces extractions ont donné une information à la fois sur la quantité maximale pouvant être obtenue par macération (24.8 % extractibles de la masse de végétal initial) mais également sur la polarité de molécules pouvant être extraites et leurs affinités présumées pour un solvant. Plus de 65 % de la masse totale extraite a été récupérée lors de la 4<sup>ème</sup> macération avec le mélange hydroéthanolique (métabolites plutôt polaires comme les sucres).

L'impact de l'utilisation de plusieurs solvants de polarités différentes est indéniable. En effet, les premiers essais de macération classique (SE) d'une durée maximale de 4 heures ne permettaient que d'atteindre les 12 % de rendements. Cette extraction par solvants successifs à quant à elle permis d'extraire les 24.8 % à temps d'expériences identiques.

- Macération triphasique (Triphasic SE)

Un premier essai en triplicats de 2 h a été réalisée avec une moyenne de masses extraites de  $298.4 \pm 13.7$  mg et un rendement d'extraction massique de  $14.9 \pm 0.7$  %.

Le but de ces essais était de valider ou non l'hypothèse de mettre tous les solvants de l'extractions précédentes ensembles (« one-pot ») pour obtenir des rendements similaires. Le protocole d'extraction triphasique a été réalisée trois fois d'affilées en réutilisant le marc à chaque nouvelle extraction. Ceci permettait également de vérifier si la première extraction triphasique épuisait la matrice végétale ou si plusieurs cycles étaient nécessaires.

Le rendement massique total obtenu après 3 extractions triphasique consécutives était de 17.58 % avec 15.12 % extrait après la première extraction. Cela a représenté la majorité (86 %) de la masse totale extractible récupérée (des 17.58 %) après la première extraction. La conclusion était qu'une seule extraction au ratio prédéfinis a permis de récupérer la majorité des composés d'intérêt.

- Extraction liquide sous pression (PLE)

Pour l'extraction sous pression et précisément avec l'appareil de PLE (nommé ASE), de nombreux paramètres sont variables comme le solvant, la température. L'extraction a été effectuée avec l'éthanol ou le mélange éthanol/eau (70/30 ou 30/70) dans les mêmes conditions. La température utilisée a quant à elle été le seul paramètre variable.

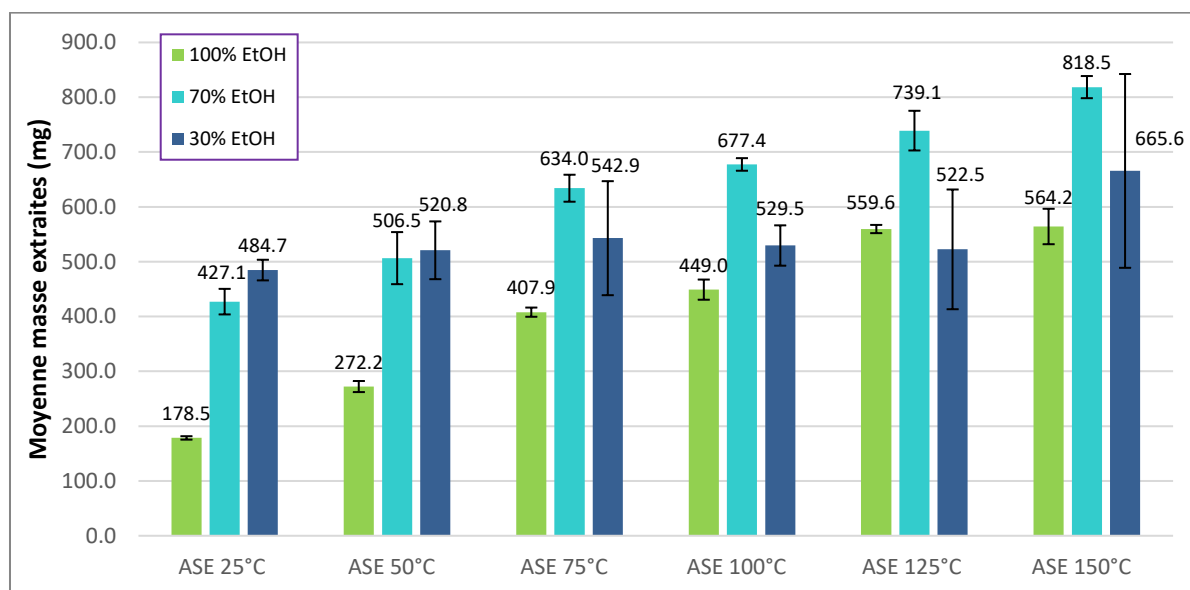


Figure 64 : Graphique de la moyenne des masses extraites en fonction de la température d'extraction par PLE à l'éthanol (100% en vert, 70% en bleu clair et 30% en bleu foncé)

Le rendement d'extraction maximal a été obtenu entre 125°C ( $28 \pm 0.4\%$ ) et 150°C ( $28.2 \pm 1.6\%$ ) avec 100% EtOH. Les rendements massiques ont été triplés entre l'essai à 25°C et celui à 125° C.

De plus, en comparant les ratios de différents solvants utilisés, le compromis EtOH/H<sub>2</sub>O 70/30 semble être le plus optimal. Il a permis d'obtenir un rendement massique de  $37.0 \pm 1.8\%$  soit 9% de plus que l'extrait EtOH, et 10.9% de plus que l'extrait à EtOH/H<sub>2</sub>O 30/70 à 125°C.

En effet, le fait d'augmenter le pourcentage d'eau a augmenté également la polarité du solvant d'extraction et donc les métabolites extraits ayant une affinité pour ce solvant (tout comme dans l'extraction successive et triphasique). Il serait donc intéressant de prévoir des optimisations autour de ce ratio afin de voir s'il peut encore être amélioré. L'avantage de l'utilisation de l'eau est de réaliser des économies de solvant et son inconvénient est de ralentir l'étape d'évaporation de solvant et l'obtention de l'extrait brut. Il ne faudrait pas pour autant accentuer la proportion de composés non désirables dans nos extraits.

Il a été remarqué que les rendements se font par paliers. C'est-à-dire que les résultats obtenus ont pu être regroupés afin de définir 3 valeurs seuils de température (25°, 75°C et 125°C) pour les prochaines expériences.

Une zone médiane semblait intéressante entre 75 et 125°C pour les paramètres de cet appareil. Néanmoins, des optimisations supplémentaires pourraient être encore envisagées afin de réduire cette température et donc diminuer le coût énergétique d'une part et d'autre part d'éviter les dégradations éventuelles des molécules induites par de fortes températures (observées à 150°C et plus).

#### - Extraction assistée par Micro-ondes (MAE)

Elle a été effectuée à des températures comprises entre 50 et 150°C. Une comparaison de chauffage par micro-onde a été ici étudié à 5 et à 15 min.

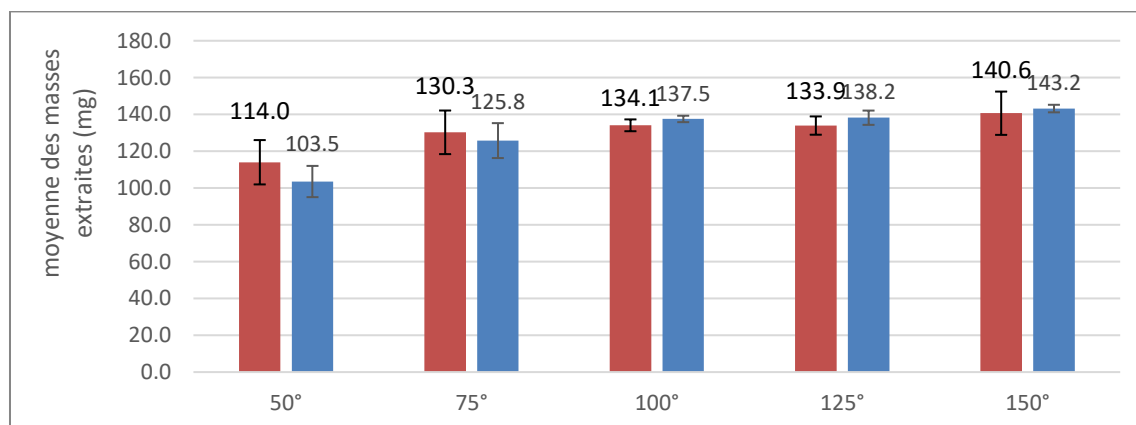


Figure 65 : Graphique de la moyenne des masses extraites en fonction de la température d'extraction par micro-ondes à l'éthanol 5 min (bleu), 15 min (rouge)

Le rendement maximal massique est obtenu entre 75 et 100°C. Un brunissement complet de la matrice végétal (cônes de houblons) et une odeur de brûlé a été noté pour l'extraction à 150°C de 15 min. Ceci nous a alerté de possibles dégradations des molécules présentes dans ces extraits.

Ce temps et cette température ont déterminés la limite des conditions opératoire. Le temps de 15 minutes a permis d'avoir de légers rendements supérieurs à basse température comparé aux extractions de 5 min (+1% à 50°C et +0.4% à 75°C), mais au-delà de 75°C, les rendements massiques étaient similaires.

En effet, l'intérêt du micro-ondes de laboratoire est de réaliser des extractions ou des réactions chimiques avec des temps de manipulations très faibles comparés aux méthodes conventionnelles telle que la macération.

#### IV.1.2. Extractions et rendements massiques

Les conditions optimales obtenues lors de l'étude préliminaire ont été prises en compte et reproduites sur un nouveau lot de cônes de houblon, ainsi que pour la suite de ce projet pour l'étude de rendements massiques, de dosages colorimétriques, de quantifications et statistiques.

Les masses extraites obtenues sont transposées en rendement massique pour comparer l'ensemble des résultats entre eux. Le même ratio de solvant (1/10) a été utilisé dans ces cas (tableau 4).

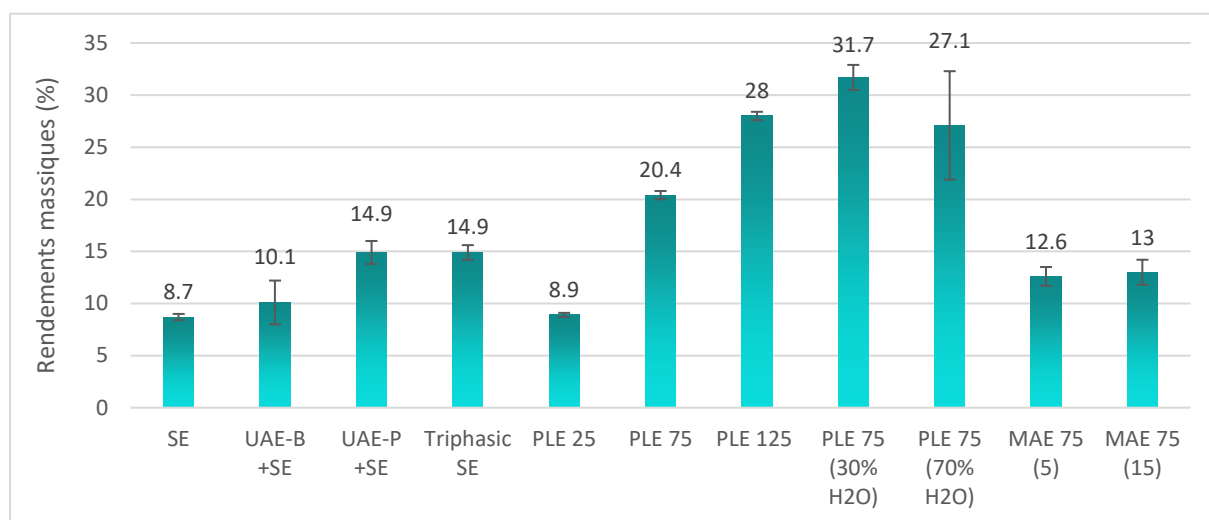


Figure 66 : Graphique des rendements massiques obtenus pour les 11 extractions définies et réalisées sur les cônes de houblons

La macération conventionnelle (SE) a conduit au rendement le plus faible (8.7 %) et sert de témoin pour toutes les extractions. L'éthanol a été la référence utilisée dans chaque test selon l'éco-extraction et les solvants verts (Chemat et al., 2012).

L'utilisation d'un prétraitement ultrasonique avec un bain suivi d'une SE (UAE-B + SE) a donné le même résultat que SE et une amélioration (x 1.71) a été observée avec une sonde (UAE-P +SE). Ces augmentations de rendement sont dues à la création de bulles de cavitation qui implosent à la surface de la matrice végétale et la brisent. La puissance et de la fréquence des impulsions sont plus élevés dans la sonde, ce qui explique les rendements plus élevés qu'avec le bain.

La sonde ultrasonique permet de contrôler chaque paramètre tout en concentrant l'émission des ondes en un point central au cœur du mélange solvant/végétal (Vinatoru, 2001; Wen et al., 2018).

Une utilisation prolongée des ultrasons conduit à une élévation de la température, ce qui peut être préjudiciable pour le rendement d'extraction et conduire à la dégradation des molécules thermolabiles (Vicente de Andrade Silva et al., 2023).

L'utilisation en une seule étape d'un mélange de solvants de différentes polarités (SE triphasique) a permis d'obtenir un rendement de 14.9 %, avec la même efficacité que UAE-P + SE.

Un même rendement a été obtenu par PLE (ASE) qu'avec la macération éthanolique (SE) à 25 °C, mais avec une réduction du temps expérimental de 2 h à 20 min. De 75 °C à 125 °C avec EtOH, les rendements ont été multipliés par 2.34 et 3.21 respectivement. Le rendement obtenu à 150 °C, est similaire à celui à 125 °C.

L'augmentation du rendement en fonction de la température a également été rapportée pour l'extraction du houblon à l'eau chaude sous pression (Gil-Ramírez et al., 2012). En outre, la comparaison des trois différents ratios de solvants utilisés pour PLE à 75°C, a montré que 30% d'eau semblait légèrement optimal, donnant une amélioration de 3.64 fois suivie de 3.11 fois plus pour 70 % d'eau (par rapport à la SE). Cette tendance a été décrite pour l'extraction hydroalcoolique des variétés de houblon « Perle Hallerteau » avec les meilleurs rendements à 40 % d'eau suivis de 20 % et les plus faibles à 60 % d'eau (Sanz et al., 2022).

L'ajout d'eau augmente la polarité du solvant d'extraction et donc l'accès aux molécules les plus polaires de la matrice végétale.

Pour la MAE, des résultats comparables ont été obtenus à 75 °C à 5 min ou 15 min, avec une augmentation d'un facteur 1.45 ou 1.49 respectivement par rapport à la SE.

L'utilisation de la PLE introduit la pression comme paramètre d'extraction influençant les constantes diélectriques des solvants et permettant de faciliter l'accès aux molécules apolaires. Pour la MAE, les avantages proviennent du chauffage induit par l'agitation moléculaire dans un champ magnétique et d'un paramètre secondaire qui est une pression interne importante à l'intérieur de la cellule fermée hermétiquement.

La teneur en eau plus élevée affecte la polarité du mélange et donc la force d'attraction des molécules extraites. Cela permet également d'économiser du solvant

La valeur de 75°C a été choisie comme valeur seuil pour comparer toutes les différentes extractions, avec un compromis sur le rendement, les molécules extraites non dégradées et la consommation. L'étude de méthodes d'extraction alternatives telles que UAE, MAE, PLE ainsi que les combinaisons UAE + MAE et les solvants verts a déjà été décrite dans la littérature (Carbone et al., 2020a; Gil-Ramírez et al., 2012; Sanz et al., 2022). Ils ont prouvé leur efficacité en termes de réduction du temps, de la quantité de solvant, de l'énergie ainsi que d'amélioration du rendement des extractions.

### IV.1.3. Analyses, quantifications et réseaux moléculaires

#### IV.1.3.1. Dosages colorimétriques

Les résultats expérimentaux des teneurs en polyphénols totaux (TPC), en flavonoïdes totaux (TFC), en chlorophylles totales (TCC) et caroténoïdes totaux (TCCa) obtenus suivant les différentes méthodes d'extraction sont présentés sous la forme de graphiques (tableau 19).

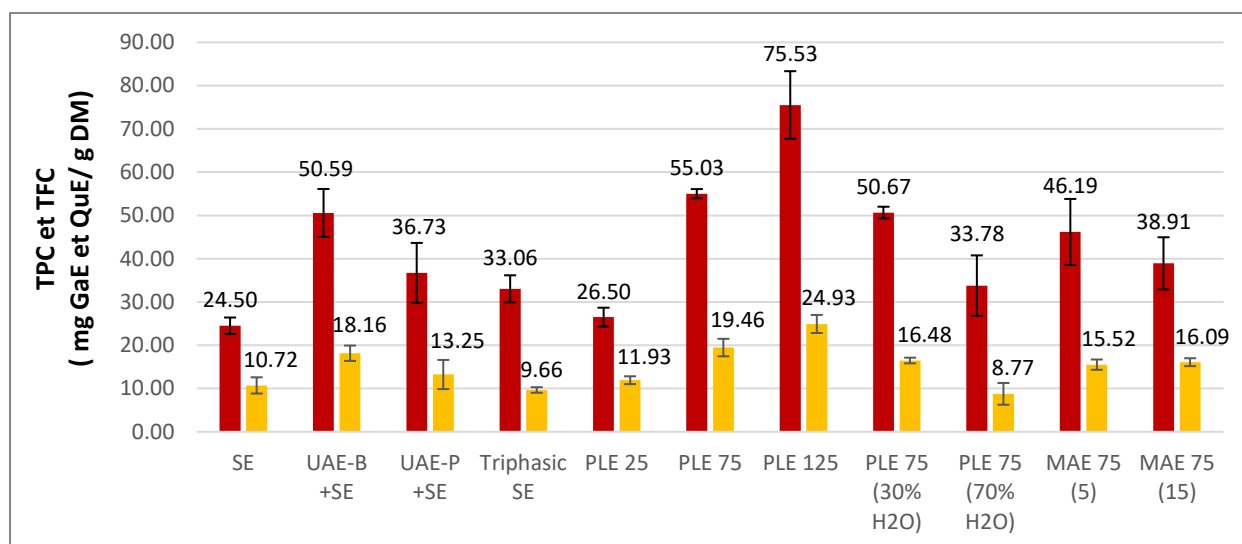


Figure 67 : Graphique de la teneur en polyphénols (rouge) et flavonoïdes totaux (jaune) pour les 11 extractions réalisées sur les cônes de houblons

Pour l'extraction SE de référence, des concentrations de  $24.5 \pm 1.9$  mg GAE /g MS pour les polyphénols totaux et de  $10.7 \pm 1.9$  mg QuE /g MS pour les flavonoïdes totaux ont été déterminées. Lorsque les valeurs de TPC sont placées côte à côte avec celles de TFC, une tendance générale similaire est observée. Ainsi, la teneur en polyphénols a été examinée en détail et le cas particulier observé pour les flavonoïdes.

La valeur la plus faible en TPC est celle de l'extraction SE ( $24.5 \pm 1.9$  mg GAE/g MS) et la valeur la plus élevée est celle de la PLE à 125°C (75,5 mg GAE/g MS). Pour la TFC, la valeur la plus faible est de  $8.8 \pm 2.5$  mg QuE/g MS pour la PLE à 75°C (70% H2O) et la plus élevée de  $24.9 \pm 2.1$  mg QuE/g MS pour la PLE à 125°C.

La combinaison avec les ultrasons (UAE-P + SE) et (UAE-B + SE) a multiplié le TPC extraits par un facteur de 1.5 à 2.06, respectivement. Quelle que soit le type d'ultrason utilisé entre le bain et la sonde, le rendement reste supérieur à la SE.

L'utilisation de l'UAE-B + SE a donné de meilleurs résultats. Ce qui peut s'expliquer par la puissance et la fréquence excessives de la sonde.

L'extraction triphasique a fourni 1.35 fois plus de phénols que la SE. La polarité du solvant affecte évidemment la concentration des molécules extraites dans une certaine mesure (plus de molécules apolaires et polaires que celles obtenues avec l'éthanol seul). Un TPC similaire a été obtenu pour la PLE25 par rapport à la SE (26.5 contre 24.5 mg GAE/g DM). Avec une température plus élevée, l'augmentation du TPC extrait a atteint des facteurs de 2.24 et 3.08 fois plus pour la PLE à 75°C et 125°C.

Les essais impliquant le mélange hydroéthanolique avec la PLE à 75°C ont conduit à une réduction de la teneur avec 50.7 et 33.8 mg GAE/g DM obtenus respectivement à partir de 30% H<sub>2</sub>O et 70% H<sub>2</sub>O.

L'addition d'une trop grande quantité d'eau (70%) a réduit la TPC déterminée. L'utilisation de l'eau n'est donc pas adaptée pour maximiser le contenu phénolique. Par contre, avec un pourcentage entre 0 et 30% d'eau, une zone de compromis pourrait être intéressante. La teneur de la PLE à 75°C (30% H<sub>2</sub>O) était approximativement égale à celle de la PLE 75°C (0% H<sub>2</sub>O). Cela permettrait d'économiser de l'éthanol et donc de réduire les coûts d'achat de solvant et de traitement des déchets.

Enfin, les MAEs, ont conduit à une amélioration du TPC correspondant à un facteur de 1.9 et 1.59 à 5 min contre 15 min par rapport à la SE. A la même température (75°C), les micro-ondes ont permis d'extraire moins de polyphénols que la PLE. Il semblerait qu'un temps d'irradiation des ondes supérieur à 5 min conduise à une dégradation possible des composés thermolabiles. La comparaison des résultats obtenus par UAE et MAE n'a pas montré de grande différence en TPC, contrairement à ce qui a été observé dans l'extraction du houblon avec de l'éthanol (Carbone et al., 2020).

Dans ce travail, il s'est avéré intéressant de déterminer la teneur en chlorophylles dans le but de définir un traitement conduisant à la teneur la plus faible possible dans l'extrait. Ce qui éviterait des étapes supplémentaires pour son élimination.

La chlorophylle est connue son instabilité après extraction. Même en conservant les extraits obtenus à l'état sec, à l'abri de la lumière et à -20 °C, les valeurs présentées (tableau 19) sont susceptibles d'une part d'être différentes et d'autre part d'évoluer par rapport à celles de cônes fraîchement cueillis.

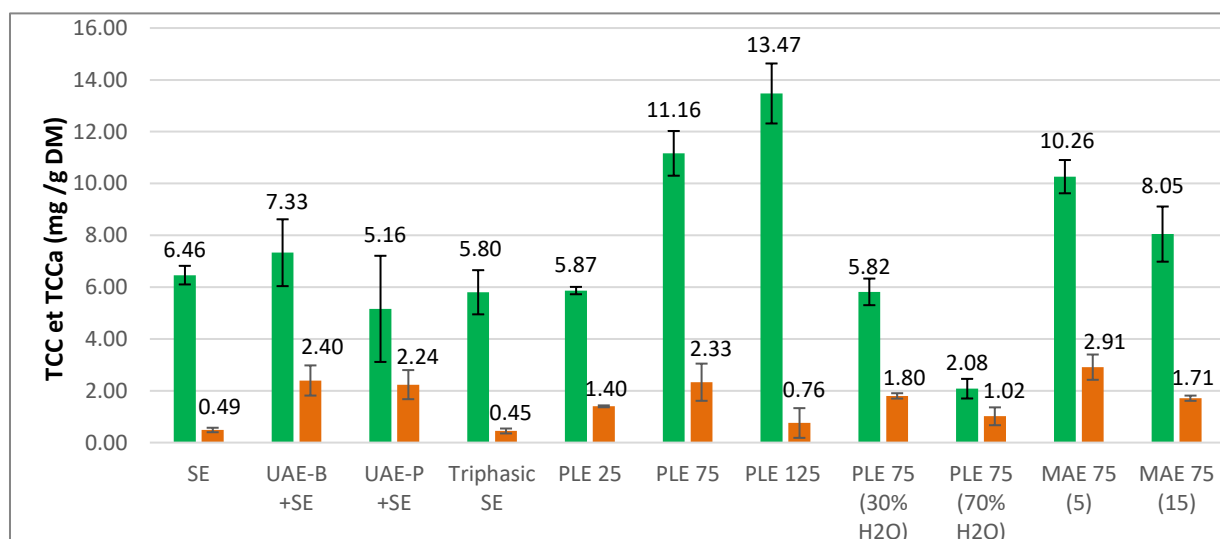


Figure 68 : Graphique de la teneur en chlorophylles totales (vert) et caroténoïdes totaux (orange) pour les 11 extractions réalisées sur les cônes de houblons

La valeur la plus faible en TCC est obtenue pour la PLE75 (70% H<sub>2</sub>O) avec 2.1 ± 0.4 mg/g MS et la valeur la plus élevée de 13.5 ± 1.2 mg/g MS pour PLE125. Par rapport au SE avec

un TCC de  $6.5 \pm 0.4$  mg/g de MS, des teneurs similaires ont été obtenues pour le SE triphasique, l'UAE-B+SE et l'UAE-P+SE. L'utilisation de la Triphasique ou de l'UAE, que ce soit avec le bain ou avec la sonde, ne semble pas avoir d'impact significatif sur l'extraction de la chlorophylle.

PLE à 25°C a produit un TCC similaire à celui de la SE qui a été multiplié par 1,72 et 2,08 à 75 et 125°C, respectivement. L'ajout d'un pourcentage croissant d'eau dans le solvant d'extraction a eu un impact négatif sur l'extraction des chlorophylles totales puisque la teneur a diminué à  $2.1 \pm 0.4$  mg/g MS pour la PLE75 (70 % H<sub>2</sub>O).

Enfin, la MAE a conduit à une augmentation de 1.58 fois par rapport à la SE pour 5 min et 1.23 fois pour 15 min.

Pour les caroténoïdes totaux (TCCa), la valeur minimale extraite est de  $0.4 \pm 0.1$  mg /g MS pour la Triphasique et le maximum est de  $2.9 \pm 0.5$  mg /g MS pour la MAE 75.

D'autre part, la valeur optimale en TCCa a été fournie par UAE-P+SE suivi par PLE 75°C et UAE-B+SE avec une augmentation de la valeur de 4.4, 4.6 et 4.8 fois par rapport à la SE. Des valeurs modérées ont été obtenues pour la PLE à différentes températures ou avec de l'eau et la MAE 75 (15).

En ce qui concerne les caroténoïdes, pour une proportion d'eau à 30 %, les résultats de la teneur semblent inchangés et diminuent pour 70 % d'eau.

#### IV.1.3.2. Quantification par HRLC-MS/MS

Trois différents extraits ont été analysés en LC-UV afin de préparer la quantification avec des standards pour les métabolites d'intérêt.

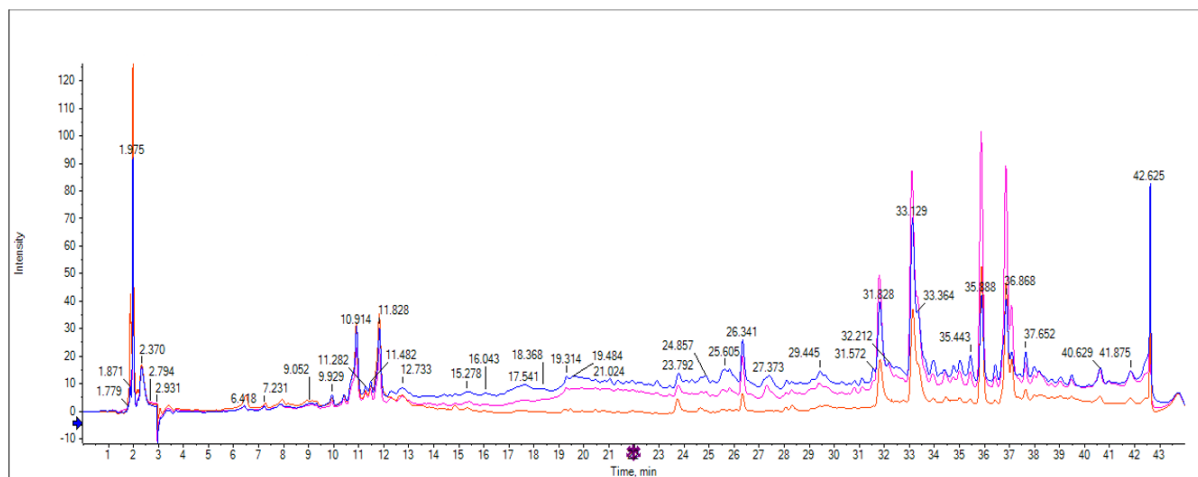


Figure 69 : Chromatogramme HPLC-UV obtenu avec une injection de 10µL de 1mg/mL sur trois extraits différents à 265nm. La phase d'éluion était H<sub>2</sub>O/ACN +0.1% AF pour une durée de 25 minutes. Les chromatogrammes suivants correspondent au SE (rose), au SE triphasique (orange) et PLE 25 (bleu).

A la suite de l'obtention de ce chromatogramme, les extraits ont été analysés en LC-MS/MS permettant d'obtenir les spectres MS<sup>1</sup> et MS<sup>2</sup> des métabolites spécifiques

Les molécules caractéristiques du houblon sont ainsi retrouvées dans nos trois extraits, comme le xanthohumol à 26.54 min, l'isoxanthohumol à 19.48 min, la cohumulone à 32.02 min, l'humulone à 33.37 min, la colupulone à 36.08 min, la lupulone à 37.12 min,

l'hydroxytricycloolupone à 35.64 min et l'hydroxytricycloolupone à 36.64 min. Quelques-uns de leurs spectres MS<sup>1</sup> et MS<sup>2</sup> sont présentés ci-dessous.

Trois fenêtres sont représentées sur chaque figure avec au centre un zoom du pic au temps de rétention sélectionné sur le chromatogramme, à gauche le spectre de masse MS<sup>1</sup> de ce pic avec toutes les molécules ionisées à ce temps donné et à droite le spectre MS<sup>2</sup> de l'ion majoritaire fragmenté.

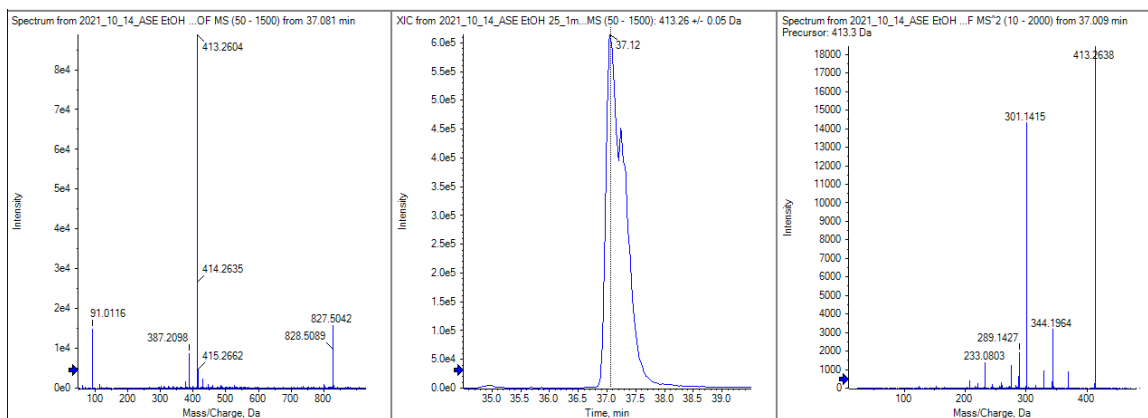


Figure 72 : Spectres de masse MS1 et MS2 de la lupulone à 37.12 min

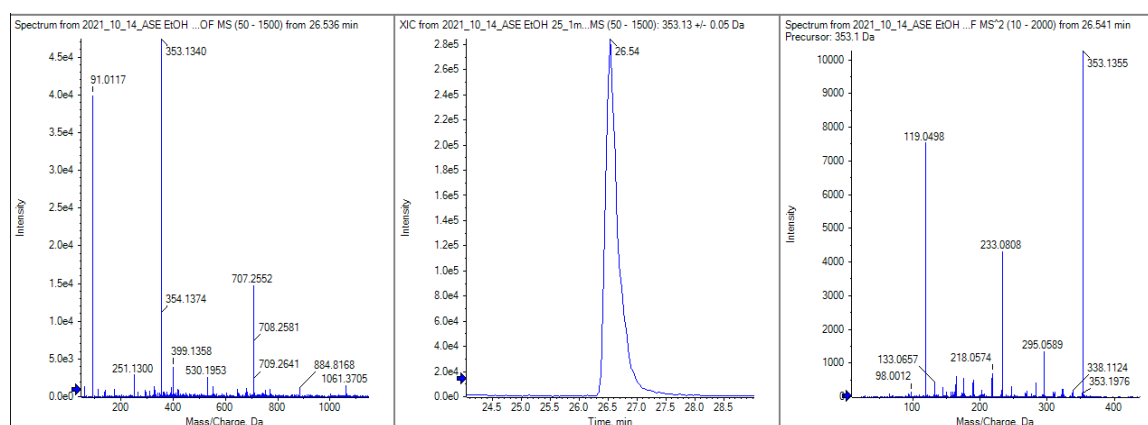


Figure 71 : Spectres de masse MS1 et MS2 du xanthohumol à 26.54 min

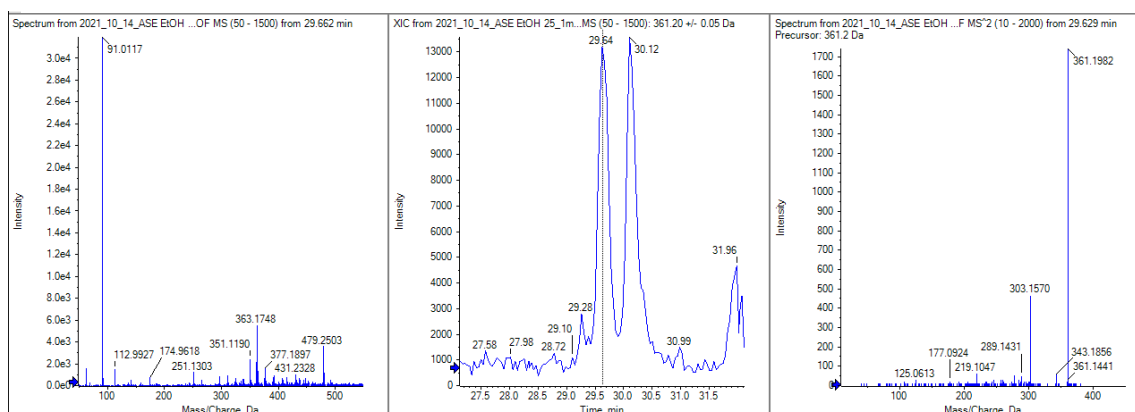


Figure 70 : Spectres de masse MS1 et MS2 de l'humulone à 29.64 min

Ainsi grâce à ces trois premières acquisitions, l'étape de quantification des molécules spécifiques du houblon a pu être préparée car l'appareil a pu être ainsi calibré sur celles-ci.



La quantification a été réalisée sur onze extraits choisis de manière à englober l'ensemble des résultats d'extraction. Afin de pouvoir obtenir les concentrations en molécules d'intérêts dans tous ces extraits, des gammes étalons ont été réalisées à l'aide des trois standards en notre possession : le xanthohumol, l'isoxanthohumol et la lupulone.

Onze extraits résultant des extractions décrites précédemment ont été sélectionnés pour la quantification : 2 h de macération sous agitation 100% éthanol (SE), 2 h de macération 100 % éthanol avec 15 min de prétraitement bain ultrasons(UAE-B +SE ) ou sonde ultrasons (UAE-P +SE), 2 h de macération triphasique (Triphasic SE), extraction liquide sous pression à 25 °C 100 % éthanol (PLE 25), à 75 °C 100 % éthanol (PLE 75), à 125 °C 100 % éthanol (PLE 125), à 75 °C 70 % éthanol / 30 % eau (PLE 75 (30% H<sub>2</sub>O)), à 75 °C 30 % éthanol / 70 % eau (PLE 75 (70% H<sub>2</sub>O)), 5 min extraction micro-ondes à 75 °C 100 % éthanol (MAE 75 (5)) et 15 min extraction micro-ondes à 75 °C 100 % éthanol (MAE 75 (15)).

Huit molécules présentes dans le houblon ont été sélectionnées pour la quantification (tableau 22). Parmi elles, l'humulone (Hu) et la cohumulone (CoHu) qui appartiennent aux acides alpha, la lupulone (Lp), la colupulone (CoLp) qui correspondent aux acides bêta ainsi que l'hydroxytricyclocolupone (HcCoLp) et l'hydroxytricyclopulone (HcLp) leurs produits de transformation, et le xanthohumol (XN) et l'isoxanthohumol (IX) qui sont des flavonoïdes prénylés. La quantification de l'IX a également permis de suivre le processus d'isomérisation du XN.

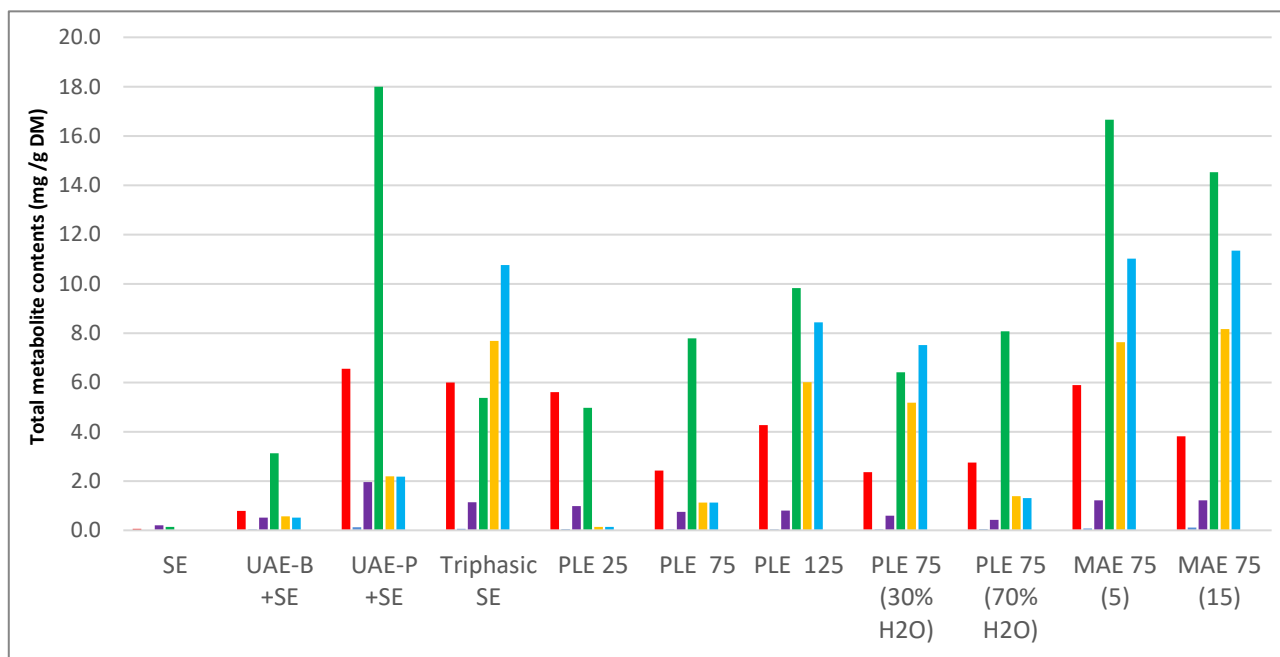


Figure 73 : Comparaison graphique générale des six teneurs en métabolites dont les  $\alpha$ -acides avec l'humulone (vert) et la cohumulone (rouge) ; les  $\beta$ -acides avec la lupulone (bleu) et la colupulone (jaune) et les prénylflavonoïdes avec le xanthohumol (violet) et l'isoxanthohumol (noir) obtenus selon les extraits.

Les quatre meilleures conditions d'extractions parmi les 11 analysées ont ainsi été mises en évidence par rapport au total de l'ensemble des molécules quantifiées obtenues. Il s'agit de la macération avec prétraitement aux ultrasons (UAE-P + SE), de la SE triphasique, de la MAE à 75°C et de PLE à 125°. Les deux premières mentionnées sont des extractions qui durent 2 heures alors que celles par MAE durent 5 à 15 min et celles par PLE 20 min.

Ainsi, chaque paramètre a affecté différemment les rendements d'extraction des molécules d'intérêt. Chaque approche d'extraction favorise une classe spécifique de composés.

Il a été remarqué pour les flavonoïdes prénylés que le contenu le plus élevé a été fourni par UAE-P+SE suivi par MAE (15) et Triphasic SE. Le ratio est de 9.8, 6.1 et 5.73 fois plus par rapport à SE pour XN et de 8.6, 7.33 et 3.6 fois pour l'IX, respectivement. Compte tenu de l'ensemble des différentes méthodes d'extraction utilisées, les quantités les plus faibles ont été obtenues pour l'IX. L'utilisation de PLE ou MAE a eu peu d'influence sur sa teneur par rapport aux températures utilisées de 75 et 125 °C.

La teneur la plus élevée en métabolites a été trouvée pour l'humulone (Hu) parmi tous les composés, comme décrit pour les cultivars et les génotypes sauvages de houblon italien (Prencipe et al., 2014). UAE-P+SE a été plus efficace pour extraire ce composé (18 mg/g DM) avec un ratio de 124.14 fois plus que SE (0.145 mg/g DM), suivi par MAE (5) et MAE (15).

L'UAE-P+SE a fourni une teneur élevée en cohumulone (CoHu), 109.17 fois plus par rapport à la SE, et une teneur comparable pour la SE triphasique et la MAE (5).

Dans le cas des  $\beta$ -acides (colupulone et lupulone), curieusement, la SE n'a pas permis leur extraction et la teneur la plus faible a été fournie avec PLE 25. Dans les deux cas, les MAE (5) et (15) se sont révélées les techniques les plus efficaces par rapport à SE avec des facteurs de 81.05 et 78.76 fois pour la lupulone et de 56.33 et 52.67 fois pour la colupulone. La PLE à 125°C s'est également révélée intéressante.

En ce qui concerne les deux produits issus de leur transformation, les teneurs sont restées faibles ou modérées même s'ils ont été extraits par SE. Des quantités comparables ont été fournies par MAE et UAE-P+SE entre 0,610 et 0,640 mg/mg DM pour l'hydroxytricyclocolupone (HcCoLp). Cette concentration a été influencée par la température, comme le montre sa teneur accrue entre PLE 25 et PLE 125, tandis que l'ajout d'eau a entraîné sa diminution. La même tendance a été observée pour l'hydroxytricyclocolupone (HcLp).

Ces résultats ont également montré que SE est la méthode d'extraction la moins efficace quel que soit le métabolite désiré.

Chaque paramètre (température, solvant, pression, temps) affecte l'extraction d'une molécule plus qu'une autre. Les conditions opératoires doivent donc être choisies en fonction des molécules recherchées dans les extraits.

#### IV.1.3.3. Déréplication et réseaux moléculaires (Mzmine 2.5 + Metgem)

Après traitement de l'ensemble des données de MS<sup>1</sup> et MS<sup>2</sup> sur MZmine, les fichiers des trois extractions (SE, Triphasique SE et PLE 25) ont été importés dans le logiciel de création de réseaux moléculaires (MetGem). Les réseaux suivants ont été obtenus. Les ions et fragmentations issues des résultats ont été comparées à toutes les banques de données disponible dans Metgem. Elles regroupent différentes banques de données de GNPS (par exemple : GNPS library, FDA library, Phytochemical libreray, NIH natural products library, etc.) mais également celle de MS-DIAL (LipidBlast) et ISDB qui sont des banques de données *In silico*.

Le choix du traitement des données en mode négatif de l'appareil devrait permettre de de détecter plus de molécules (ionisées négativement [M-H]<sup>-</sup>) en raison de la forte présence de groupement hydroxyle (-OH) accessibles sur les molécules à analyser. Cependant, la majorité des banques de données expérimentales partagées sont en mode positif, et seulement quelques-unes en mode négatifs.

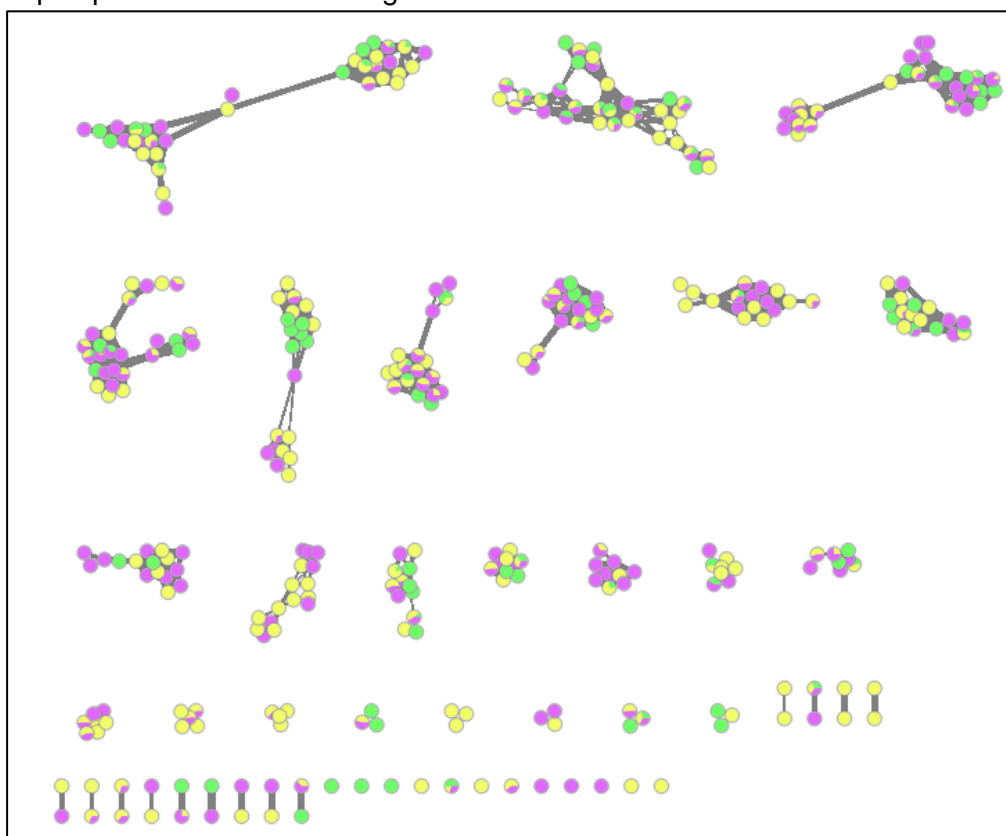


Figure 74 : Réseaux moléculaires sur Metgem obtenues à partir de SE (vert), SE triphasique (jaune) ou PLE25 (violet).

Les molécules reliées entre elles par groupes (ou clusters) sont des molécules qui possèdent des fragmentations similaires donc une structure et une formule brute similaires.

Le nombre total d'ions détectés après analyse et comparaison des trois échantillons est de 327. En plus des acides alpha, bêta et des flavonoïdes prénylés bien connus et décrits du houblon, les réseaux moléculaires ont permis de détecter des molécules en plus faibles quantités de ces groupes spécifiques, ou bien des sucres (tels que le glucose, sucrose ou le saccharose), ou encore divers acides (acide azélaïque, hulupinique et citrique).

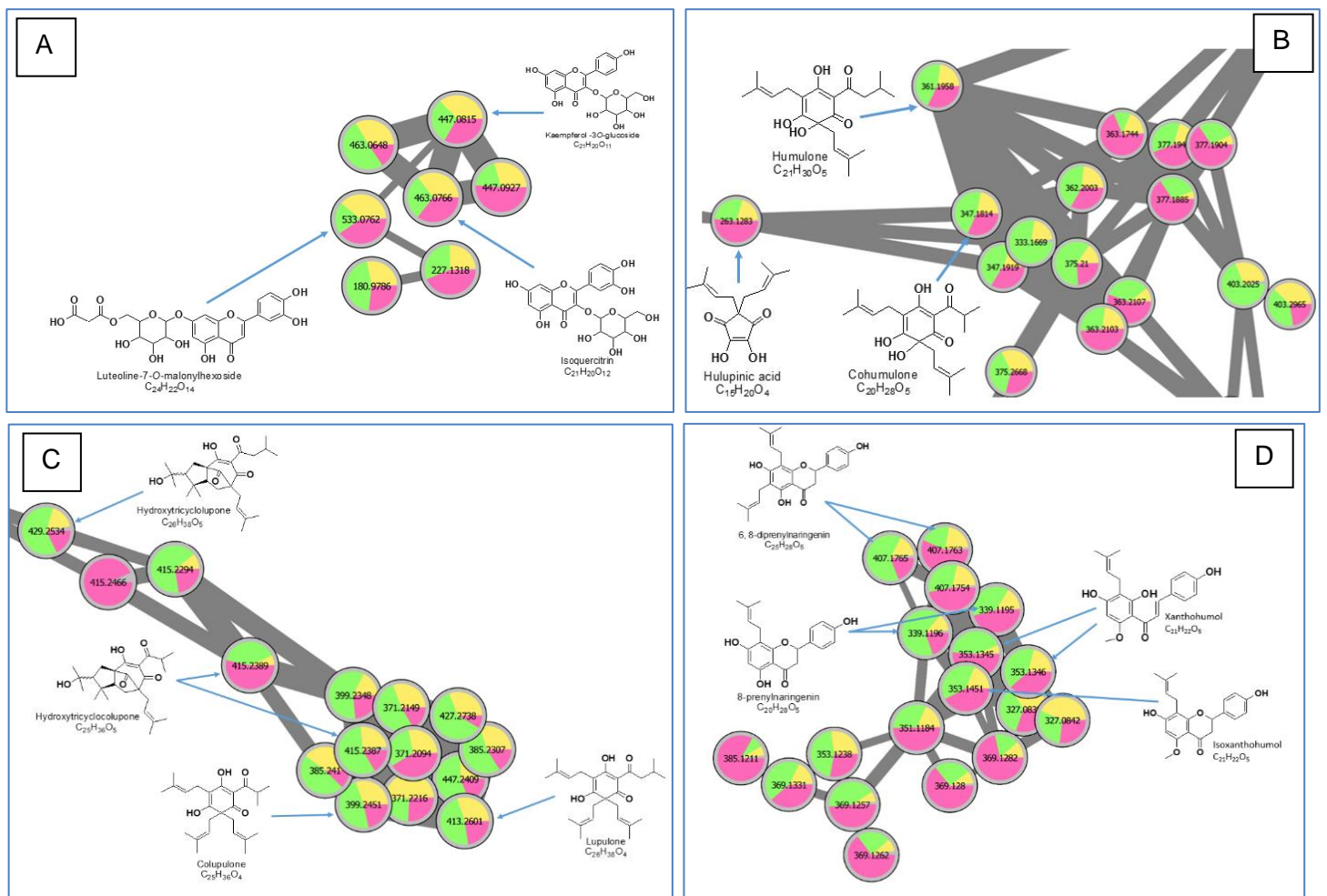


Figure 75 : agrandissements des clusters (A, B, C, D) des réseaux moléculaire de Metgem et quelques molécules annotées, selon les bases de données à partir de SE (vert), SE triphasique (jaune) ou PLE25°C (rose).

Quatre groupes spécifiques (A, B, C, D) de ces réseaux moléculaires ont été examinés. Dans le groupe A, trois ions spécifiques ont été détectés à  $m/z$  463,0766, à  $m/z$  447,0815 et à  $m/z$  533,0762. Ils ont été annotés respectivement comme  $[M-H]^-$  isoquerétine (à 11.085 min,  $C_{21}H_{19}O_{12}^-$ , score : 90),  $[M-H]^-$  astragaline (à 12.002 min,  $C_{21}H_{19}O_{11}^-$ , score : 88) et  $[M-H]^-$  luteoline-7-O-malonylhexoside (à 12.838 min,  $C_{24}H_{21}O_{14}^-$ , score : 90).

Dans le groupe B, trois ions spécifiques ont été détectés à  $m/z$  347,1814, à  $m/z$  361,1958 et à  $m/z$  263,1283. Ils ont été annotés respectivement comme  $[M-H]^-$  cohumulone (à 32.021 min,  $C_{20}H_{27}O_5^-$ , score : 87),  $[M-H]^-$  humulone (à 33.311 min,  $C_{21}H_{29}O_5^-$ , score : 92) et  $[M-H]^-$  acide hulupinique (à 20.924 min,  $C_{15}H_{19}O_4^-$ , score : 87). Les principales molécules  $\alpha$ -acides ont été trouvées dans le cluster B.

Dans le cluster C, quatre ions spécifiques ont été détectés à  $m/z$  399.2451, à  $m/z$  413.2601, à  $m/z$  415.2389 ou 415.2387 et à  $m/z$  429.2534. Ils ont été annotés respectivement comme  $[M-H]^-$  colupulone (à 36.064 min,  $C_{25}H_{35}O_4^-$ , score : 94),  $[M-H]^-$  lupulone (à 37.036 min,  $C_{26}H_{37}O_4^-$ , score : 85),  $[M-H]^-$  hydroxytricyclocolupone (à 31.738 min,  $C_{25}H_{35}O_5^-$ , score : 87), et  $[M-H]^-$  hydroxytricyclolupone (à 36.661 min,  $C_{26}H_{37}O_5^-$ , score : 82). Les principales molécules de  $\beta$ -acides se trouvent dans le cluster C.

Dans le cluster D, quatre ions spécifiques ont été détectés à  $m/z$  339.1196 ou 339.1195, à  $m/z$  353.1345 ou 353.1346, à  $m/z$  353.1451 et à  $m/z$  407.1765 ou 407.1763. Ils ont été annotés respectivement comme  $[M-H]^-$  8-prenylnaringenine (à 24.190 min,  $C_{20}H_{19}O_5^-$ , score : 68),  $[M-H]^-$  xanthohumol (à 26.531 min,  $C_{21}H_{21}O_5^-$ , score : 81),  $[M-H]^-$  isoxanthohumol (à 19.497 min,  $C_{21}H_{22}O_5^-$ , score : 71), et  $[M-H]^-$  6-8-diprenylnaringenine (à 30.510 min,  $C_{25}H_{27}O_5^-$ , score : 68).

Outre les acides alpha et bêta et les flavonoïdes prénylés bien connus décrits pour le houblon, les réseaux moléculaires peuvent également être utilisés pour détecter de plus petites quantités de ces groupes. D'autres composés ont été annotés, tels que divers acides (acides azélaïque et citrique), des sucres (glucose et saccharose) et des hétérosides (junipediol A 8-glucoside). Parallèlement à la comparaison avec les bases de données, d'autres molécules peuvent être annotées manuellement à l'aide de recherches antérieures en spectrométrie de masse (Intelmann et al., 2009; Zhang et al., 2004).

Dans le cluster B, deux  $\alpha$ -acides supplémentaires ont été trouvés : à  $m/z$  375.2103 pour  $[M-H]^-$  prehumulone (à 35.15 min,  $C_{22}H_{31}O_5^-$ , ions fragments : 306.1444, 263.0905) et à  $m/z$  333.1669 pour  $[M-H]^-$  posthumulone (à 34.39 min,  $C_{19}H_{25}O_5^-$ , ions fragments : 289.1839, 177.1322, 111.0484).

Dans le groupe C, deux acides b supplémentaires ont également été déduits : à  $m/z$  427.2738 pour  $[M-H]^-$  prelupulone (à 38.35 min,  $C_{27}H_{39}O_4^-$ , fragments d'ions : 358.2107, 315.1577, 303.1571, 247.0961) et à  $m/z$  385.2307 pour  $[M-H]^-$  postlupulone (à 35.52 min,  $C_{24}H_{33}O_4^-$ , ions fragments : 341.2459, 316.1658, 301.1423, 273.1328, 261.1118, 248.1036, 205.0495).

Le tableau regroupant l'ensemble des molécules annotées du houblon est présenté en annexe 3.

#### IV.1.4. Etudes statistiques (Désirabilité)

Une optimisation avec une approche statistique a été appliquée à tous les résultats obtenus précédemment. L'objectif étant d'identifier les conditions opératoires les plus efficaces parmi toutes celles utilisées, sur la base des rendements massiques et des molécules extraites.

Quatorze réponses ont été retenues et incluses dans la formule de désirabilité globale : les teneurs totales en polyphénols, flavonoïdes et chlorophylle, les rendements massiques, leurs écarts-types respectifs et les concentrations des molécules quantifiées (cohumulone, humulone, colupulone, lupulone, xanthohumol et isoxanthohumol).

Ainsi, il était pertinent de minimiser les teneurs en chlorophylle et en isoxanthohumol. La teneur en chlorophylle doit être réduite dans le but de simplifier les étapes potentielles de fractionnement et de purification des extraits (tableau 26). La concentration élevée en isoxanthohumol est résultante de la dégradation ou de l'isomérisation significative de xanthohumol par les différents processus d'extraction.

En dehors de ces deux paramètres, tous les autres doivent être maximisés. Le choix a été d'appliquer une importance et une notation à toutes les réponses, faible (= 1), moyenne (= 2) et élevée (= 3). Par exemple, le rendement massique était la priorité absolue ( $r = 3$ ), la teneur et la concentration étaient une priorité intermédiaire ( $r = 2$ ) et les écarts-types avaient moins d'importance ( $r = 1$ ).

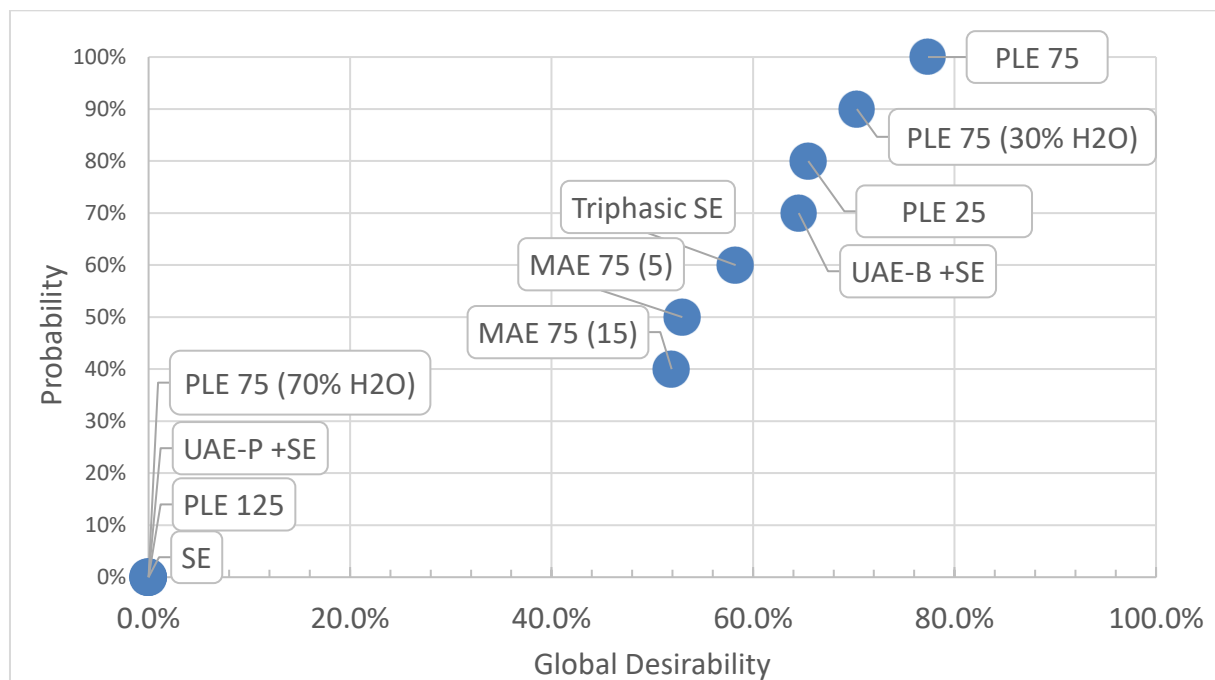


Figure 76 : Comparaison de désirabilité globale des expériences réalisées en fonction de leurs probabilités.

Cette figure résume les valeurs multiples, montrant les meilleures conditions parmi toutes celles qui ont été testées (tableau 27). Les trois meilleures solutions consistent uniquement en des extractions réalisées par PLE à 75 et plus. La combinaison de la pression (100 bars) et de la température donne 3 valeurs de désirabilité globale entre 65.5% et 77.4% (PLE 25, PLE 75 (30% H2O) et PLE 75). Se situant dans la zone des 70-80% de désirabilité

globale ( $d_g$ ), ces résultats sont très intéressants et seront utilisés comme base pour une optimisation ultérieure.

La quatrième place revient à 64.5% de  $d_g$  pour UAE-B+SE. Cette technique est la plus facilement transposable et exécutable au niveau industriel, avec un coût matériel inférieur à celui aux extractions sous pressions ou par micro-ondes.

La cinquième place revient à la macération triphasique avec 58.3 % de  $d_g$ , dans laquelle quatre solvants de polarités différentes sont utilisés pour tenter de maximiser l'extraction. Cette technique reste relativement coûteuse en termes de solvants et de traitement des déchets et est exclue des techniques d'éco-extraction.

Les opérations expérimentales dont la désirabilité globale est de 0% ne sont pas dues à des expériences inintéressantes ou non fonctionnelles, mais aux multiples conditions choisies initialement et imposées au calcul de désirabilité.

En effet, si la valeur de désirabilité est nulle, le produit des valeurs exprimant la désirabilité globale sera également nul (compte tenu de la pondération). C'est pourquoi des méthodes telles que UAE-P+SE ou MAE 75 (5 et 15) ont obtenu des classements "médiocres" et donc une valeur de  $d_g$  égale zéro.

Cette approche descriptive nous permet de choisir les techniques les plus intéressantes en termes de rendements d'extraction, de contenus et de molécules extraites. A première vue, la MAE semble être une technique "supérieure" à toutes les autres présentées dans ce travail en terme de vitesse d'extraction.

Cependant, l'approche statistique utilisée permet de regrouper et de comparer de multiples résultats qui n'étaient pas comparables au départ. Ainsi, l'extraction liquide sous pression (PLE) est apparue comme la technique présentant la meilleure désirabilité globale, suivie de l'extraction assistée par un bain à ultrasons (UAE-B) ou de l'extraction triphasique (Triphasic SE).

La technique extractive qui sera optimisée est UAE-B + SE. En effet, elle s'est avérée être la plus facilement transposable à l'échelle pilote et industrielle à un coût minimal par rapport à d'autres techniques telles que l'extraction sous pression. Elle pourra être effectuée avec par exemple dans bioréacteur à double enveloppe avec palette d'agitation.

## IV.2. Cannabis sativa L.

### IV.2.1. Extractions et rendements massiques

L'ensemble des résultats de rendements de toutes les extractions réalisées sur le cannabis est présenté sur graphique suivant. L'éthanol principalement ainsi que l'eau ont été utilisés comme solvants.

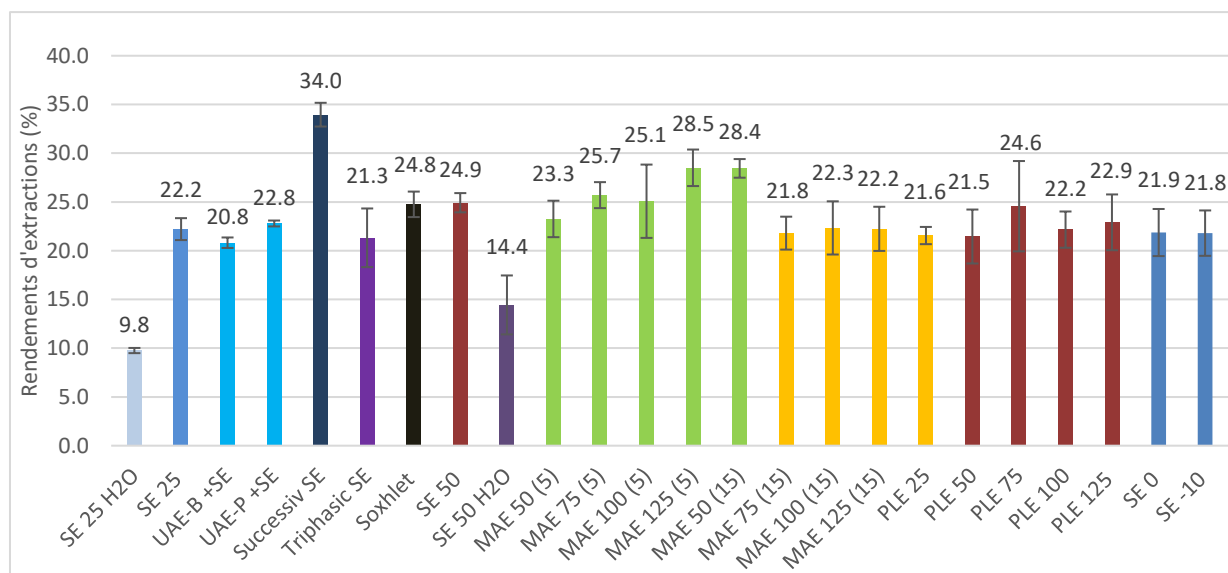


Figure 77 : Graphique récapitulatif des rendements d'extractions en fonction des différentes méthodes d'extractions utilisées pour le cannabis

La référence, tout comme pour le houblon, est la macération classique sous agitation de (SE) 2 h à l'éthanol à 25°C ( $22.2 \pm 1.1\%$ ) (tableau 5).

Ensuite, le couplage UAE-B+SE ne semblait pas avoir d'impact apparent en premier lieu sur le rendement à 15 min ( $20.8 \pm 0.5\%$ ) et pour UAE-P+SE ( $22.8 \pm 0.3\%$ ).

Des essais à différentes températures ont également été réalisés par SE dans le but d'étudier l'impact potentiel de celle-ci sur la SE. Le chauffage devrait entraîner l'extraction de plus de composés à cause d'une dégradation des parois végétales alors que la baisse de température devrait entraîner l'effet inverse tout en faisant précipiter des composés comme les lipides. Des résultats comparables ont été obtenus à 50°C ( $24.9 \pm 1.0\%$ ), 0°C ( $21.9 \pm 2.4\%$ ) et -10°C ( $21.8 \pm 2.3\%$ ). En substituant EtOH par un solvant plus polaire (l'eau), une diminution drastique de rendements a été observée à 25°C ( $9.8 \pm 0.3\%$ ) et 50°C ( $14.4 \pm 3.0\%$ ).

La macération successive (avec  $C_6H_{12}$ , AcOEt, EtOH,  $H_2O$ ) en 4h a permis d'épuiser totalement la matrice végétale et d'obtenir un rendement élevé ( $34.0 \pm 1.2\%$ ). Cette expérience permet de conclure que la macération avec un unique solvant ne suffit pas à extraire l'ensemble des composés extractibles tout comme pour le houblon.

Le rendement massique obtenu avec la macération triphasique ( $21.3 \pm 3.0\%$ ) est équivalent à la SE macération conventionnelle. L'effet attendu par rapport à la macération successive n'a donc pas été atteint en termes de rendements massiques.





Un même rendement a été obtenu pour PLE que SE à (25°C) avec une réduction de temps. Ce dernier atteint un palier à 28.5% lorsque la température atteint 125°C.

La MAE permet d'accéder à  $22.3 \pm 2.7\%$  de molécules extractibles à 75°C pour une durée de 5 min qui est comparable à SE éthanol à 25°C. Un palier de rendement maximal se situe à 75°C que ce soit avec une expérience de 5 ou 15 min.

Il est important de noter que les résultats présentés à ce stade ne sont comparés uniquement que sur des rendements massiques. Les compositions en molécules d'intérêts de chaque extrait seront présentées dans la suite de ce rapport à travers les analyses par dosages spectrophotométriques, les quantifications et déréplication.

## IV.2.2. Analyses et caractérisations

### IV.2.2.1. Dosages colorimétriques

Les résultats expérimentaux des teneurs en polyphénols totaux (TPC), en flavonoïdes totaux (TFC), en chlorophylles totales (TCC) et caroténoïdes totaux (TCCA) obtenus suivant les différentes méthodes d'extraction sont présentés sous forme de graphiques (tableau 20).

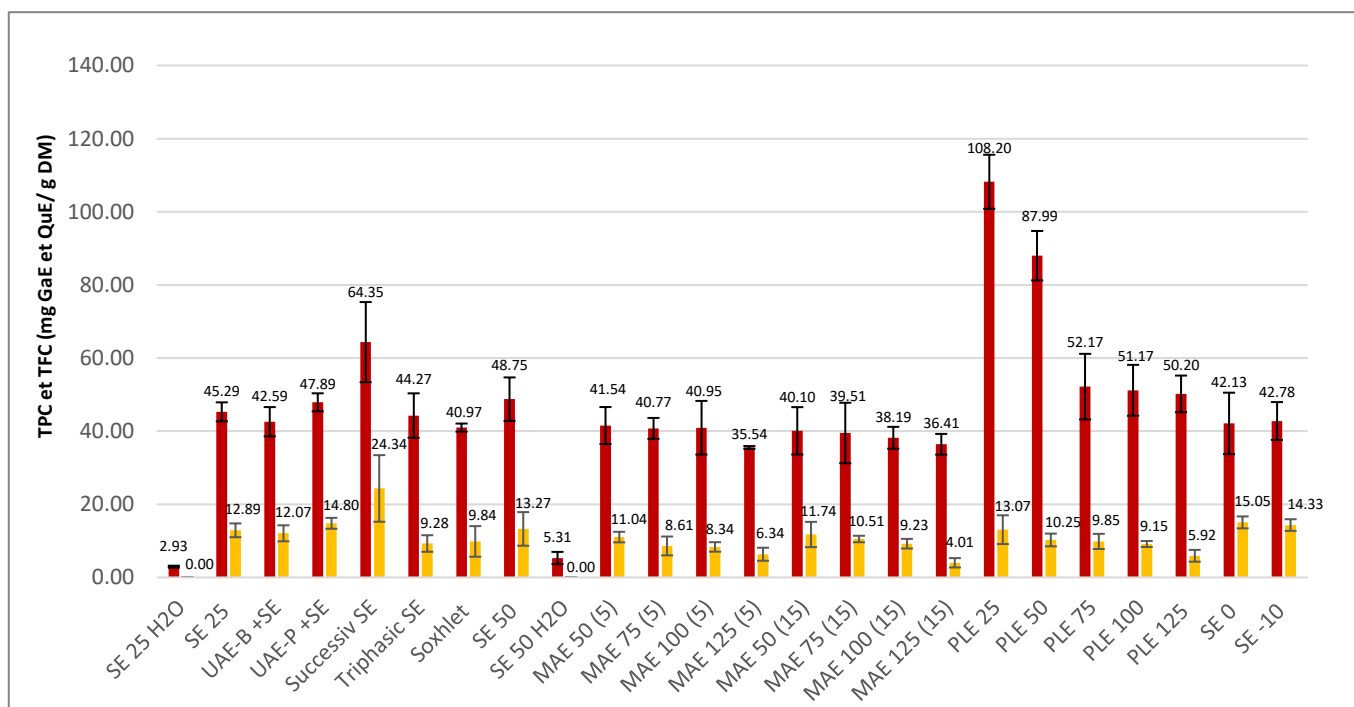


Figure 78 : Graphique de la teneur en polyphénols (rouge) et flavonoïdes totaux (jaune) pour les 24 extractions réalisées sur les fleurs de cannabis

Concernant les flavonoïdes, les résultats ont logiquement admis des valeurs plus basses que ceux des polyphénols. La majorité des extraits ont été situés dans une zone de 10 à 12 mg QuE/g DM excepté pour l'extraction successive à 24.34 mg QuE/g DM. Ainsi seul l'évolution du TPC a été traité dans le paragraphe suivant.

D'allure générale, il a été remarqué que la majorité des extractions possède un équivalent entre 40 et 50 mg GAE/g DM. La TPC pour (SE 2h EtOH) est  $45.29 \pm 2.60$  mg GAE/g DM. Des essais avec chauffage à 50 °C ( $48.75 \pm 5.94$  mg GAE/g DM) ont permis d'obtenir plus de TPC que les essais à température 0 °C ( $42.13 \pm 8.4$  mg GAE/g DM) et -10 °C ( $42.78 \pm 5.18$  mg GAE/g DM).

Pour les macérations (SE) réalisées en substituant l'éthanol par l'eau, les TPC se sont révélés les plus faibles parmi toutes les extractions réalisées (à 25 °C :  $2.93 \pm 0.28$  mg GAE/g DM et 50°C :  $5.31 \pm 1.27$  mg GAE/g DM). Il a été observé dans ce cas-là qu'une température de 50 °C a permis de doubler les TPC contenus dans ces extraits aqueux.

L'utilisation d'un prétraitement de 15 min aux ultrasons (UAE-B) ou (UAE-P) ne semble pas influencer sur la quantité de polyphénols (respectivement  $42.59 \pm 4.00$  et  $47.89 \pm 2.47$  mg GAE/g DM). La légère supériorité du prétraitement par la sonde était dû à sa puissance émise supérieure au cœur du mélange solvant/végétal.

Pour le Soxhlet, où la température de manipulation se situait à l'ébullition de l'éthanol (> 80 °C), une dégradation des molécules extraites a été suspecté. En effet, cette technique a extrait environ 20 % de TPC en moins que l'extraction SE à 50 °C ( $40.97 \pm 1.10$  contre  $48.75 \pm 5.94$  mg GAE/g DM).

La macération successive a exposé des résultats supérieurs de 42% ( $64.35 \pm 10.96$  mg GAE/g DM) à la macération témoin. En effet, les solvants plus apolaires que l'éthanol comme l'acétate d'éthyle ou le cyclohexane ont permis d'extraire et de solubiliser un pull (???) de polyphénols.

Les MAE n'ont pas influé sur les TPC par rapport à SE EtOH, hormis la réduction du temps d'extraction. Cependant, en augmentant de 50 à 125 °C, une baisse du TPC obtenu a été observé d'environ 5 à 6 mg /g DM.

Enfin, l'utilisation de la pression pour la PLE à 100 % d'éthanol était apparu comme le meilleur technique pour maximiser l'extraction de polyphénols. La teneur a été multipliée par 2.4 pour PLE25 ( $108.2 \pm 7.39$  mg GAE/g DM). De plus, l'augmentation de température a également impacté de manière négative les résultats ( $50.2 \pm 5.02$  mg GAE/g DM à 125 °C), comme dans de le cas de MAE et Soxhlet.

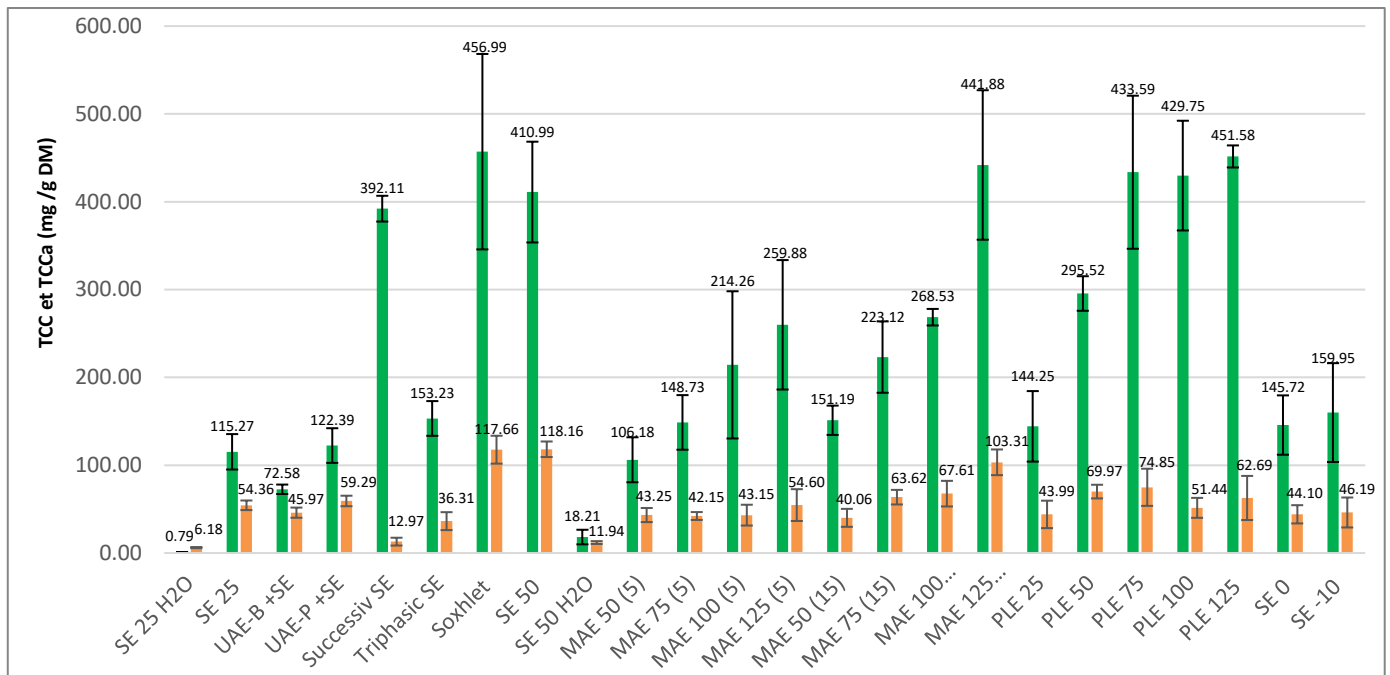


Figure 79 : Graphique de la teneur en chlorophylles totales (verte) et caroténoïdes totaux (orange) pour les 24 extractions réalisées sur les fleurs de cannabis

L'évolution de la TCC a été principalement décrite puisque la TCCa suivait une même tendance (tableau 20). Le minimum de TCCa a été obtenu pour SE H<sub>2</sub>O à 25°C (6.18 ± 0.63 mg/g DM) et le maximum pour SE 50° 2H EtOH (118.16 ± 8.86 mg/g DM).

De manière générale, une allure ascendante du graphique a été constaté lorsque la température, le temps de contact, la pression ou le nombre de solvants de polarités différentes ont augmenté. Tous ces paramètres ont affecté positivement la quantité en chlorophylle et en caroténoïdes totaux.

La TCC de SE est de 115.27 ± 20.17 mg/g DM. Elle a été multipliée par 3.6 pour SE 50°C (410.99 ± 57.38 mg/g DM), prouvant l'effet d'une augmentation de la température. À l'inverse, à 0 °C (145.723 ± 33.79 mg/g DM) et -10 °C (159.95 ± 56.26 mg/g DM), où cette réduction de température ne semblait pas avoir d'impact par rapport SE 25 °C.

Une valeur comparable a été obtenue par UAE-B +SE (122.39 ± 19.73 mg/g DM) que par SE. Par contre, une diminution de 30% a été constatée pour UAE-B+ SE (72.58 ± 5.37 mg/g DM).

De faibles teneurs ont été obtenues par SE avec H<sub>2</sub>O (0.79 ± 0.27 mg/g DM) à 25 °C et (18.21 ± 8.31 mg/g DM) à 50 °C. Ceci a été expliqué par la faible affinité de la chlorophylle pour l'eau. Toutefois, un facteur de 25 entre 25 et 50 °C a été constaté démontrant l'influence de l'augmentation de la température.

La meilleure TCC a été constatée pour le Soxhlet (80°C) avec 456.99 ± 111.27 mg/g DM. Cependant, elle est de 392.11 ± 14.66 mg/g DM pour la Successiv SE. La chlorophylle ayant plus d'affinités pour les différents solvants utilisés (cyclohexane, acétate d'éthyle) a été extraite en plus grande quantité à 25 °C.

Les MAE ont permis d'extraire jusqu'à 2.1 fois plus à 125°C (259.88 ± 73.69 mg/g DM) qu'à 25°C (106.18 ± 25.60 mg/g DM) L'augmentation le temps 5 à 15 min a accru

considérablement la TCC avec un facteur 4 pour MAE de 15min à 125°C ( $441.88 \pm 85.12$  mg/g DM).

Les mêmes conclusions d'expériences ont été constatées avec l'utilisation de PLE. Plus la température a augmenté et plus la TCC a été élevée (de  $144.25 \pm 40.14$  mg/g DM pour 25 °C à  $451.58 \pm 12.56$  mg/g DM pour 125 °C).

Ainsi, toute dégradation physique ou thermique a permis d'augmenter fortement les TCC extraites. Si le souhait était de maximiser ces valeurs, il faudrait se diriger vers des températures supérieures à 75 °C. Et à l'inverse, si le TCC devait être minimiser, les étapes d'extractions seraient contrôlées en minimisant l'apport de température et d'actions mécaniques sur les fleurs à extraire.

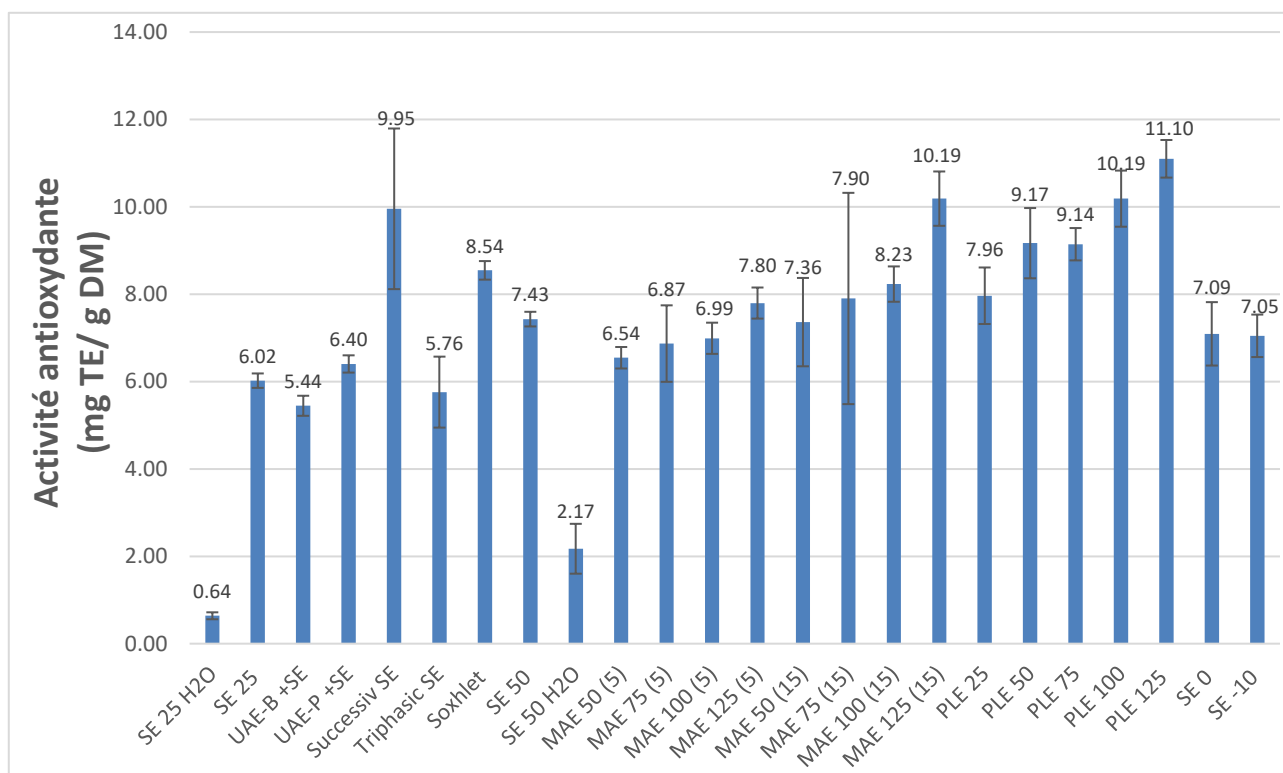


Figure 80 : Graphique du pouvoir antioxydant par test DPPH pour les 24 extractions réalisées sur les fleurs de cannabis

Le test DPPH° a permis de mesurer le pouvoir antioxydant et antiradicalaire des différents extraits réalisés sur les fleurs de cannabis. Une majorité de molécules présentes au cœur des plantes admettent cette propriété, comme par exemple la chlorophylle.

Cette activité antioxydante a été exprimée en équivalent de trolox (TE) par gramme de masse sèche (tableau 20). La SE à 25 °C possédait une valeur de  $6.02 \pm 0.17$  mg TE/g DM. Une augmentation de 25 % en antioxydants a été observée pour SE 50 °C ( $7.43 \pm 0.17$  mg TE/g DM). Pour les macérations aqueuses, les teneurs obtenues ont été les plus faibles ( $0.64 \pm 0.08$  à 25°C et  $2.17 \pm 0.57$  mg TE/g DM à 50 °C).

L'utilisation de (UAE-B+ SE) ou (UAE-P+ SE) de 15 min n'a pas eu d'influence particulière sur la quantité d'antioxydants, avec une légère supériorité de la sonde par rapport au bain :  $5.44 \pm 0.23$  et  $6.40 \pm 0.2$  mg TE/g DM.

La macération successive a admis des résultats nettement supérieurs ( $9.95 \pm 1.84$  mg TE/g DM) à SE à 25 °C, soit plus de 65% de teneurs. L'utilisation de multiples solvants a multiplié les différentes molécules extractibles et potentiellement le nombre de molécules avec des propriétés antioxydantes. Le temps de contact total de 4 heures a également favorisé les échanges entre la matrice végétale et les solvants.

Les MAE ont permis d'obtenir des teneurs supérieures de SE à même température, relevant ainsi de  $6.54 \pm 0.25$  mg TE/g DM pour MAE 5min à 50°C jusqu'à  $10.19 \pm 0.62$  mg TE/g DM pour MAE 15min 125°C.

La PLE a été une fois de plus la technique la plus intéressante proposant une amélioration de l'activité antioxydante de +32% à +85%. Plus la température a augmenté et plus la concentration de TE était importante : de  $7.96 \pm 0.65$  mg TE/g DM pour 25 °C à  $11.10 \pm 0.43$  mg TE/g DM pour 125 °C.

#### IV.2.2.2. Quantification HRLC-MS/MS

A l'issue de la préparation du mix des sept standards et des solutions diluées, ces dernières ont été analysées par HRLC-MS.

Le programme de chromatographie liquide a duré environ 20 min. Les cannabinoïdes ont pu être retrouvés à l'aide du couplage à la spectrométrie de masse en plus de la détection UV. Leurs temps de rétention étaient les suivants : CBD à 6.19 min, CBDA à 7.38 min, CBGA à 8.51 min, CBN à 8.65/8.73 min, D9-THC à 9.95 min, D8-THC à 10.51 min et THCA à 15.69 min. De plus, la spectrométrie de masse permet également d'avoir leurs fragmentations majoritaires en mode positif : le CBN à  $m/z$  311.2006 a formé un ion fils à  $m/z$  223.1117 ; le CBD, le  $\Delta^9$ -THC et le  $\Delta^8$ -THC à  $m/z$  315.2319 ont formé un ion fils à  $m/z$  193.1223 ; le CBDA et le THCA à  $m/z$  359.2217 ont formé un ion fils à  $m/z$  341.2111 et le CBGA à  $m/z$  361.2373 a formé un ion fils à  $m/z$  219.1019 (tableau 23).

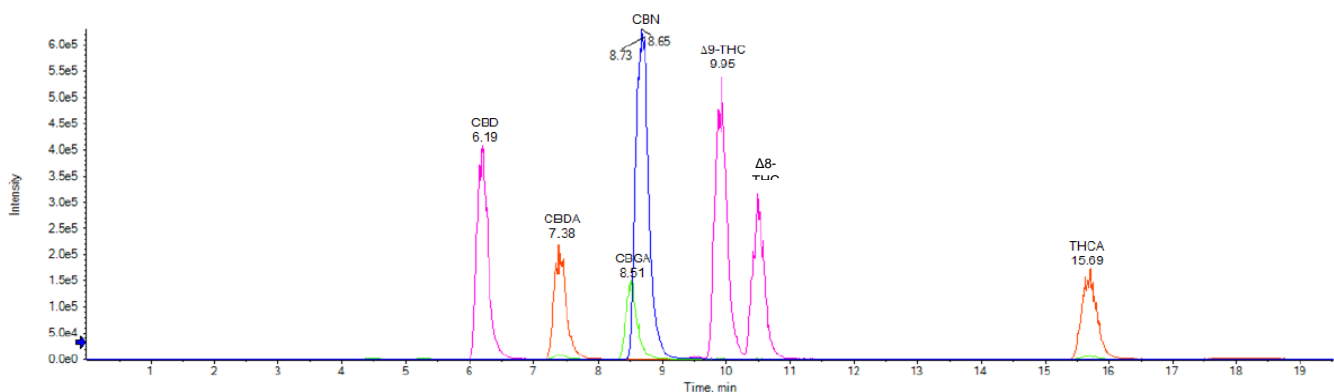


Figure 81 : Chromatogramme du mix de standards de cannabinoïdes en LC-MS

Contrairement à ce qui est décrit dans la littérature (Brighenti et al., 2017), une mise au point a été effectuée de manière à séparer distinctement les pics du  $\Delta^9$ -THC et  $\Delta^8$ -THC. Ce qui a permis leurs quantifications respectives sur des extractions avec des températures élevées ou pour les étapes de décarboxylations.

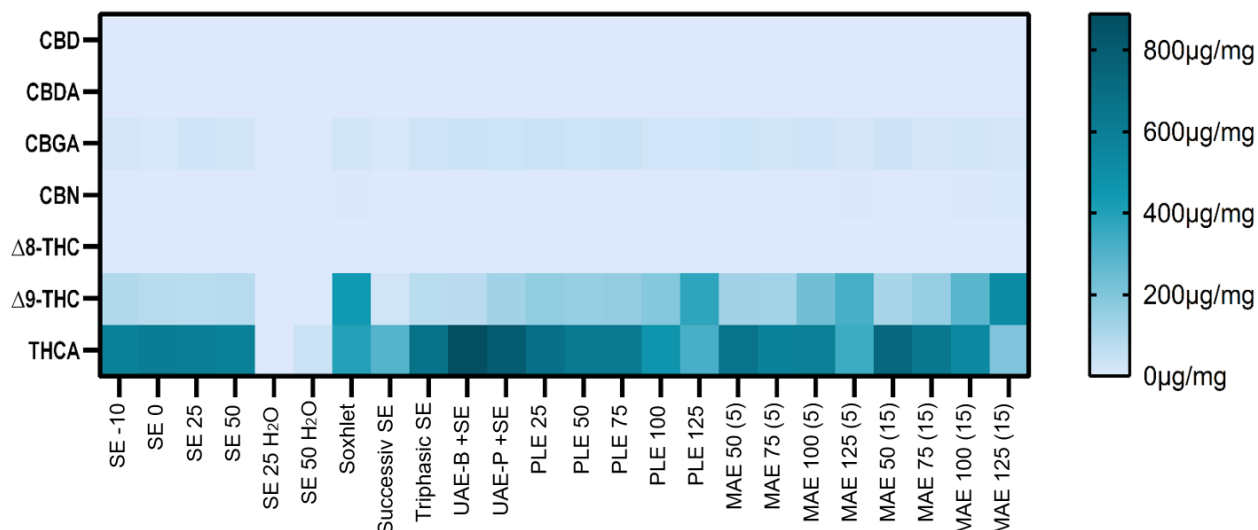


Figure 82 : Heatmap de quantification des cannabinoïdes obtenus pour chaque extrait

Le résultat de quantification des 7 cannabinoïdes sur la totalité des extraits est représenté sous la forme d'une heatmap (tableau 24). Cette représentation a permis d'avoir une première observation générale.

La variété de fleurs de THC dominant étudiée semblait ne posséder que trois cannabinoïdes majoritaires parmi ceux qui ont été étudiés : le THCA, le d9-THC et le CBGA. Le maximum de THCA a été obtenu avec 15 min (USB+SE) et le maximum de d9-THC avec MAE 125° 15min. De plus, les concentrations en CBD, CBDA, CBN ne représentent chacune moins de 1% des cannabinoïdes dans les extraits (de 0.5 à 2 µg /mg de résines) et la concentration en d8-THC n'a pu pas être quantifier.

Afin de mieux comprendre l'évolution des concentrations en fonction des extraits, les graphiques suivants ont été focalisés sur les molécules de THCA, THC et CBN.

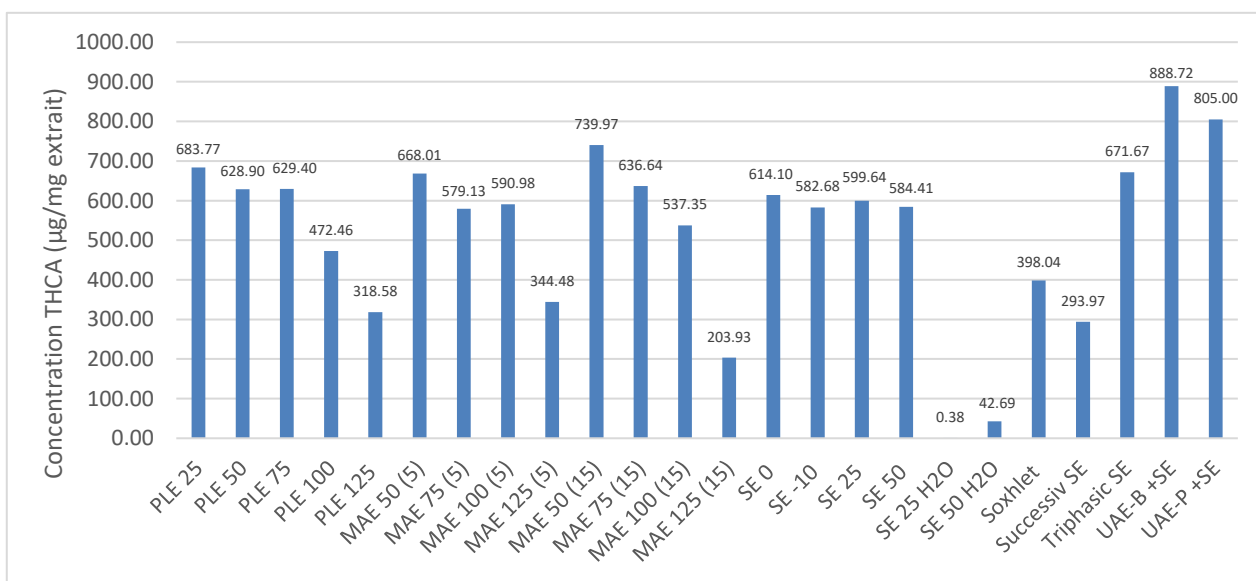


Figure 83 : Histogramme de la concentration en THCA dans les différents extraits

La molécule de THCA est sensible à la chaleur et cela peut amorcer une réaction de décarboxylation pour former du THC. Ainsi toute méthode extractive appliquant une température élevée provoquerait une diminution de la quantité en THCA.

Les quantités les plus élevées en THCA ont été obtenus à des températures inférieures ou égales à 50°C : entre 599.64 µg/ mg pour SE25 et 683.77 µg/mg pour PLE25. Une diminution de 53% a été observée pour la PLE125 (318.58 µg/mg) par rapport à PLE25.

Les ultrasons ont permis d'avoir accès à une quantité supérieure en THCA, une concentration + 30% entre USB+SE et PLE25. Ceci provenait du fait que les cannabinoïdes ne sont pas présents uniquement dans les trichomes glandulaires mais également dans le reste des parties de la fleur. Les ultrasons augmenteraient donc l'accès à ces derniers.

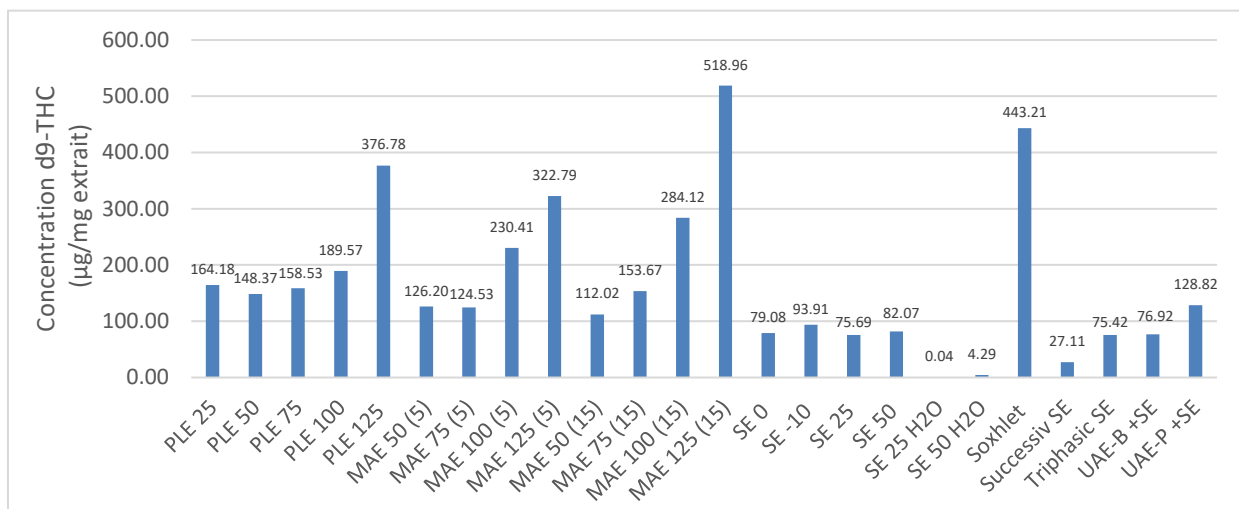


Figure 84 : Histogramme de la concentration en D9-THC dans les différents extraits

En s'intéressant au d9-THC, l'évolution générale était antagoniste à celle du THCA. C'est-à-dire que plus la température appliquée lors de l'extraction augmentait et plus la concentration en THC augmentait également. Elle est due à la décarboxylation des formes acides qui s'ajoute aux concentrations de THC qui était initialement présentes au sein de la plante.

Ainsi, PLE 125, MAE125 (15) et le Soxhlet apparaissent comme les meilleures conditions d'extractions pour obtenir directement un maximum de THC par rapport à SE 25°C qui n'a permis d'obtenir que 75.69 µg/mg. Ceci est directement lié à la réaction de décarboxylation de THCA en THC.

La température n'a pas été le seul paramètre à impacter la concentration en THC. En effet, la technique utilisée a été un facteur non négligeable sur l'accès à la totalité du THC extractible. Les ultrasons, les micro-ondes, la pression ont permis d'augmenter cette concentration de 63 % (+50 µg/mg), 60 % (+48 µg/mg) et 107 % (+85 µg/mg) respectivement pour une même température de 25°C.

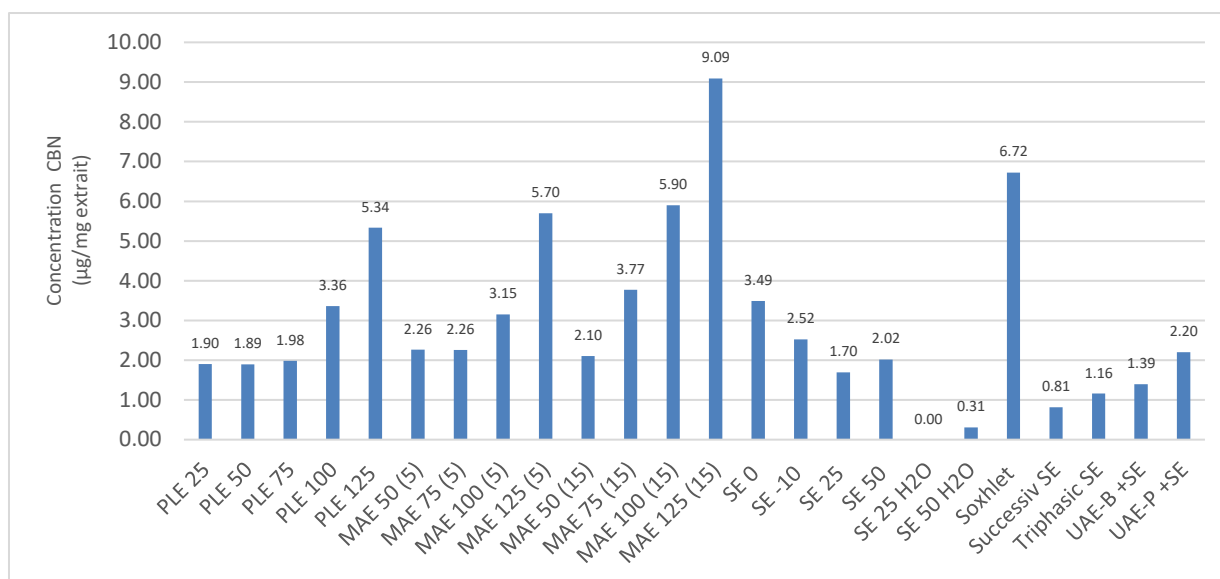


Figure 85 : Histogramme de la concentration en CBN dans les différents extraits

La quantification en CBN a été la dernière étudiée. C'est le produit de dégradation du THC par contact avec l'oxygène et la lumière. Les résultats de quantités peuvent donc être anticipée avec des valeurs en CBN supérieures pour des extractions avec les conditions de températures les plus élevées

Ainsi les extractions à hautes températures ont multiplié les concentrations de CBN par des facteurs de 3.1 (PLE125), de 3.9 (Soxhlet) et de 5.3 (MAE 125-15) par rapport à SE25 avec 1.7 µg/mg.

Un temps de chauffage plus long en MAE (de 15 min à 100 °C) a permis d'obtenir la même concentration (environ 5.8 µg/mg) qu'une extraction de 5 min à 125 °C.

Même si les valeurs de CBN restaient faibles comparées aux THC ou THCA, cette molécule reste tout de même un cannabinoïde avec des propriétés psychoactives pouvant se fixer sur les mêmes récepteurs endocannabinoïde. Des effets identiques peuvent être obtenus à ceux que produit le THC, nécessitant néanmoins une plus forte dose de CBN (Karniol et al., 1975). C'est pour cela que l'étude de sa concentration et sa production au cours des étapes d'extraction est nécessaire.



### IV.2.2.3. Réseau moléculaire (Mzmine 3, GNPS, Cytoscape et Sirius)

L'ensemble des standards ont pu être élués et séparés correctement afin de pouvoir les identifier à l'aide de leurs standards et  $m/z$  respectifs. Cinq extraits différents de cannabis ont été analysés. Les chromatogrammes obtenus sont présentés ci-dessous.

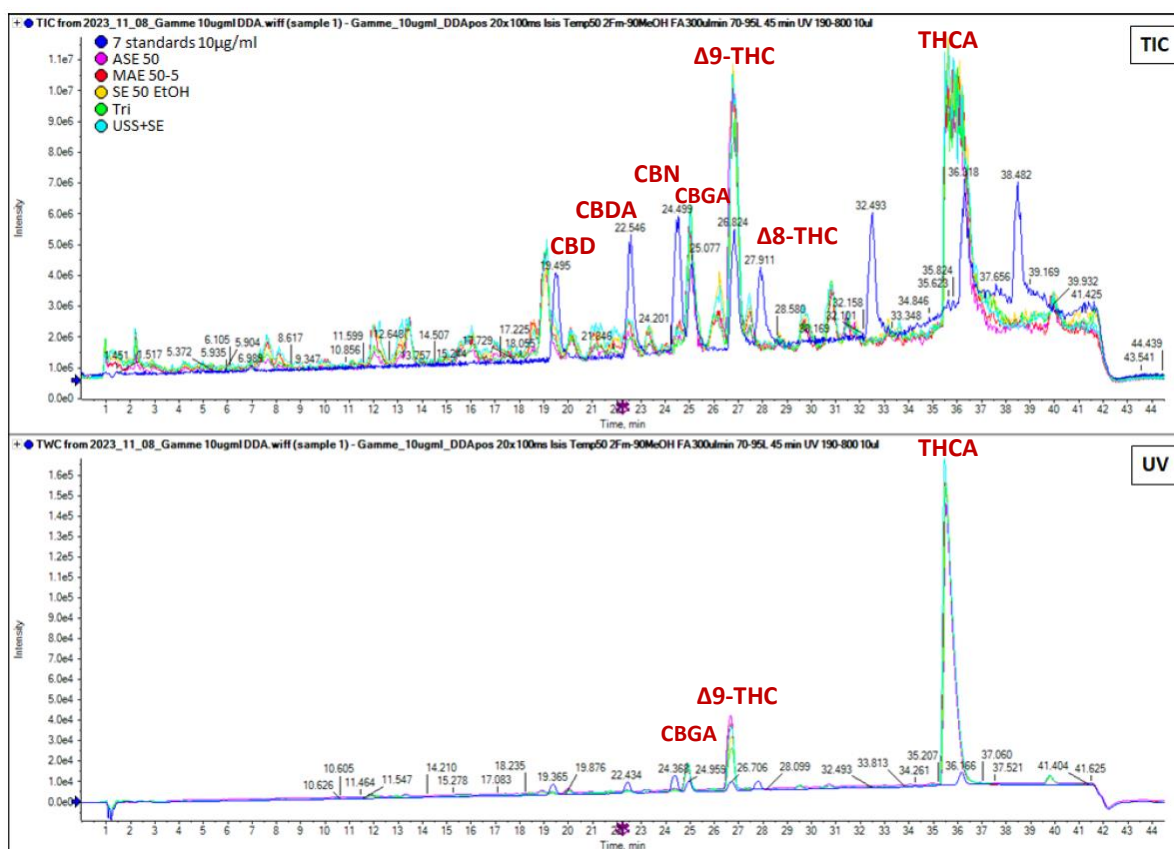


Figure 86 : Chromatogrammes LC-UV de l'analyse des standards et des cinq extraits issus des fleurs de cannabis : le mix de standards (bleu foncé), PLE50 (violet), MAE50(5) (rouge), SE 50 EtOH (jaune), Trisphasique SE (vert) et USS+SE (bleu clair)

Sur les chromatogrammes présentés, les standards ont été élués au temps de rétention suivants : le CBD à 19.456 min, le CBDA à 22.546 min, le CBN à 24.499 min, le CBGA à 25.100 min, le  $\Delta^9$ -THC à 26.824 min, le  $\Delta^8$ -THC à 27.911 min et le THCA à 36.318 min.

Le chromatogramme UV a permis de déduire rapidement la présence de trois cannabinoïdes majoritaires présent le CBGA, le  $\Delta^9$ -THC et le THCA en accord avec la variété de fleur analysée « THC dominant » et avec les analyses de quantifications réalisées précédemment.

Les spectres  $MS^1$ ,  $MS^2$  de l'ensembles des analyses ainsi que leurs intensités ont été traitées dans la section Feature-Based Molecular Networks (FBNM) de GNPS. L'ensemble des résultats de comparaisons de ces ions aux banques de données sont recueillis d'après leurs  $m/z$  respectifs en LC-QTOF mode positif.

Le nombre total d'ions détectés était de 254 ions après le traitement par MZmine3 et l'analyse sur GNPS.

- Analyses des données avec GNPS et SIRIUS

La comparaison aux banques de données de GNPS a permis d'annoter essentiellement des cannabinoïdes et des sesquiterpènes. Trois molécules ont été proposées à  $m/z$  221.1891, 205.1942 et 205.1943 correspondants à de l'alismol ( $R_t = 15.8601$  min,  $C_{15}H_{25}O^+$ , MQScore = 0.74), du trans-Nerolidol ( $R_t = 17.9817$  min,  $C_{15}H_{27}O^+$ , MQScore = 0.74) et de l'alpha-Bisabol ( $R_t = 19.9775$  min,  $C_{15}H_{27}O^+$ , MQScore = 0.87).

Lors de l'annotation des différentes molécules, un problème spécifique aux cannabinoïdes a été constaté.

Malgré tous les avantages que proposent les partages de banques de données, celles-ci possèdent plusieurs limites. La première est que ces données de spectres  $MS^2$  sont fournies par les utilisateurs et donc moins des extraits variés sont étudiés (mode positif et/ou négatif) et moins d'informations pour les annotations sont disponibles. La seconde est que la comparaison est réalisée sur les fragmentations des ions de la molécule. Or si des molécules possèdent la même masse molaire (et une structure très proche), l'ionisation pourrait entraîner la formation de fragments à  $m/z$  identiques. Ce deuxième frein a été constaté dans notre cas, entre le CBD et le THC, et aussi entre le CBDA et THCA qui possèdent la même masse molaire et qui en mode positif s'ionisent et se fragmentent de manière identique.

Après des recherches plus approfondies, très peu d'analyses par LC-MS/MS et déréplication sur des extraits bruts ont été publiées sur cette variété de plante, étant donné sa catégorie de stupéfiant. Il semblerait qu'en mode négatif, les pics des ions fils produits (spectre  $MS^2$ ) entre le CBD et le THC soient identiques mais d'intensité légèrement différentes (Citti et al., 2019). Leur identification en mode positif a été effectuée par comparaison de leurs temps de rétention qui sont largement différents et dont nous avons l'information grâce aux standards.

Les données proposées de GNPS ont été ainsi corrigées manuellement en validant le THC à la place du CBD (26.8 et 19.4 min) et THCA à celle du CBDA (36.3 et 22.5 min). Le THC ionisé a été détecté en mode positif à  $m/z$  315.2291,  $R_t=26.8667$  et 26.7442 min et de formule  $C_{21}H_{31}O_2^+$ ; le THCA est quant à lui à  $m/z$  359.2182 et 359.2185,  $R_t=35.8246$  et 35.6325 min et de formule  $C_{22}H_{31}O_4^+$ .

Les molécules correspondantes aux standards (CBN détecté à 24.499 min, CBGA à 25.100 min) ont bien été retrouvés sous GNPS. La validation par standards a ajouté un poids supplémentaire aux annotations de ces composés. Les ions en mode positif pour ces molécules étaient : à  $m/z$  311.1989  $m/z$ , le CBN ( $R_t=24.4853$  min,  $C_{21}H_{27}O_2^+$ , MQScore = 0,76) et à  $m/z$  361.235, le CBGA ( $R_t = 25.0399$  min,  $C_{22}H_{33}O_4^+$ , MQScore = 0.85).

L'annotation de ces cannabinoïdes majoritaires a également été complétée par d'autres cannabinoïdes et validée à l'aide d'autres travaux. (Leonard et al., 2021; Padilla-González et al., 2023). Les cannabinoïdes suivants ont ainsi pu être proposés : THCV, THCA-C1, THCVA, THCA-C4, CBT, CBTA, CBR, 6-7-epoxy-CBG, 6-7-epoxy-CBGA.

Le tableau des récapitulatif du traitement des données avec GNPS est présenté en annexe 4.

L'analyse effectuée sur GNPS a été complétée par l'appui de SIRIUS et de ses autres logiciels tels que CSI:FingerID et CANOPUS. Ceci a permis d'obtenir des annotations complémentaires ou identiques à GNPS et qui sont dites *De Novo* (ou *In silico*) liées à des prédictions de structures.

Deux exemples de cannabinoïdes (THC et CBN) annotés à l'aide de SIRIUS ont été entièrement développés ci-dessous. L'annotation des autres molécules sous ce logiciel a été effectuée de la même façon.

Concernant l'ion détecté à 26.7442 min et  $m/z$  315.2291, l'analyse à l'aide de SIRIUS a permis de déduire une formule moléculaire suivante  $C_{21}H_{30}O_2$  ainsi que son type d'ionisation  $[M+H]^+$ . L'arbre de fragmentation suivant en mode positif est ainsi proposé et vérifié par le logiciel.

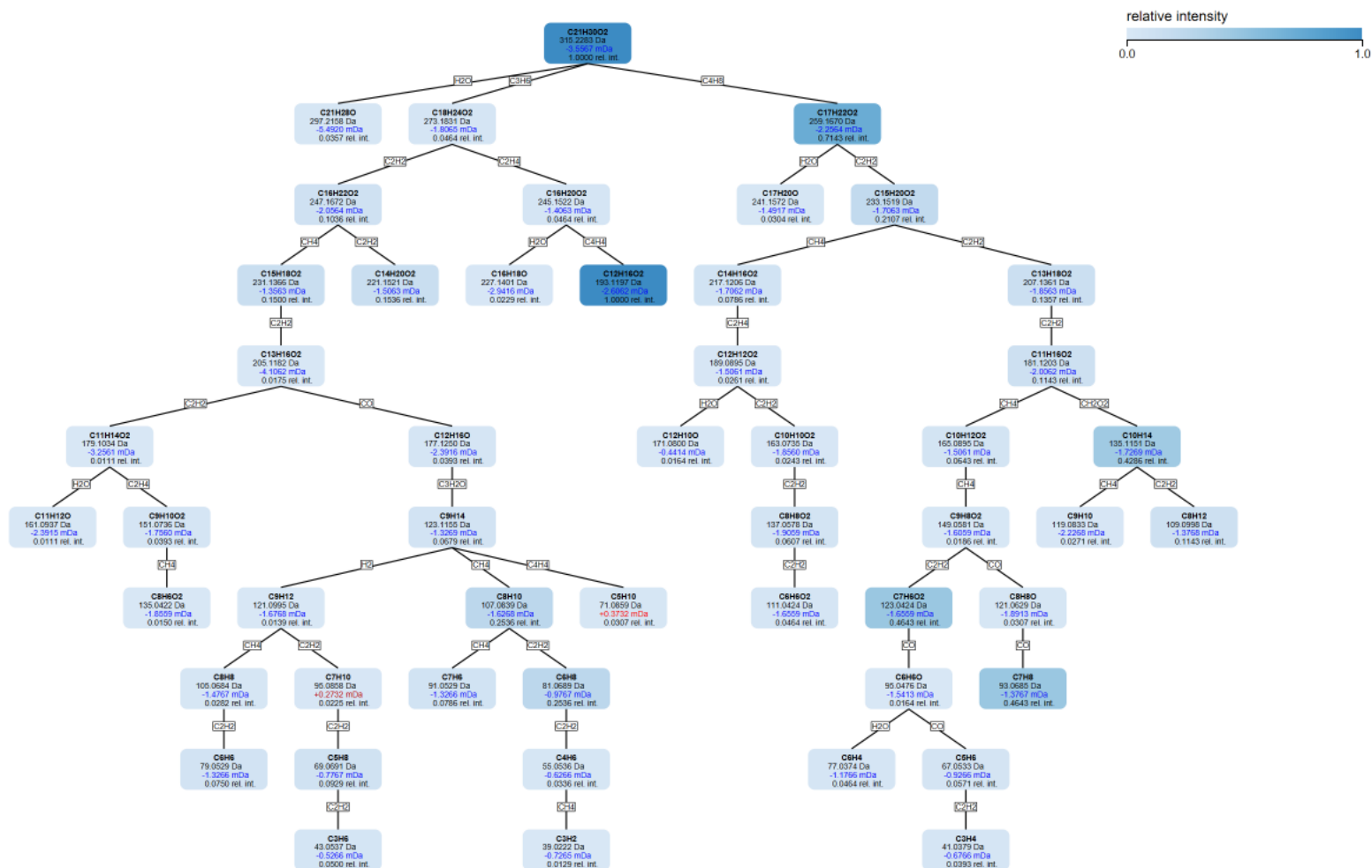


Figure 87 : Arbre de fragmentation du d9-THC obtenu avec SIRIUS

L'analyse a été poursuivie avec CSI:fingerID. Les suggestions de fragmentations ont été comparées au spectre MS<sup>2</sup> et leurs faisabilités ont été vérifiées par rapport aux banques de données et molécules existantes. Pour cet ion, la molécule commerciale du THC (le marincap) a été proposée avec un pourcentage de 94.61% d'indice de Tanimoto et un XlogP = 6.077. Presque la totalité des fragments du spectre ont pu être prédits et potentiellement expliqués (en violet sur le spectre MS<sup>2</sup>) à l'aide de SIRIUS et CSI:fingerID ci-dessous.

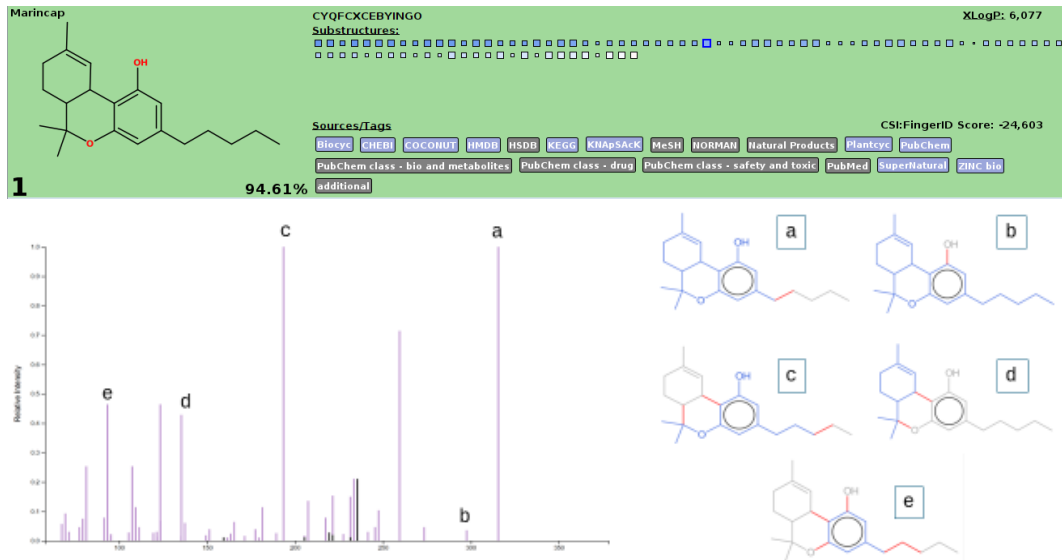


Figure 88 : Explications des fragmentations de la structure et sous-structures (a, b, c, d et e) du d9-THC avec CSI:FingerID

Concernant l'ion détecté à 24.4853 min et m/z 311.1989, son traitement a permis de déduire une formule moléculaire suivante  $C_{19}H_{28}O_2$  ainsi qu'une ionisation  $[M+H]^+$  à l'aide de SIRIUS. L'arbre de fragmentation suivant en mode positif a ainsi été proposé et vérifié par le logiciel.

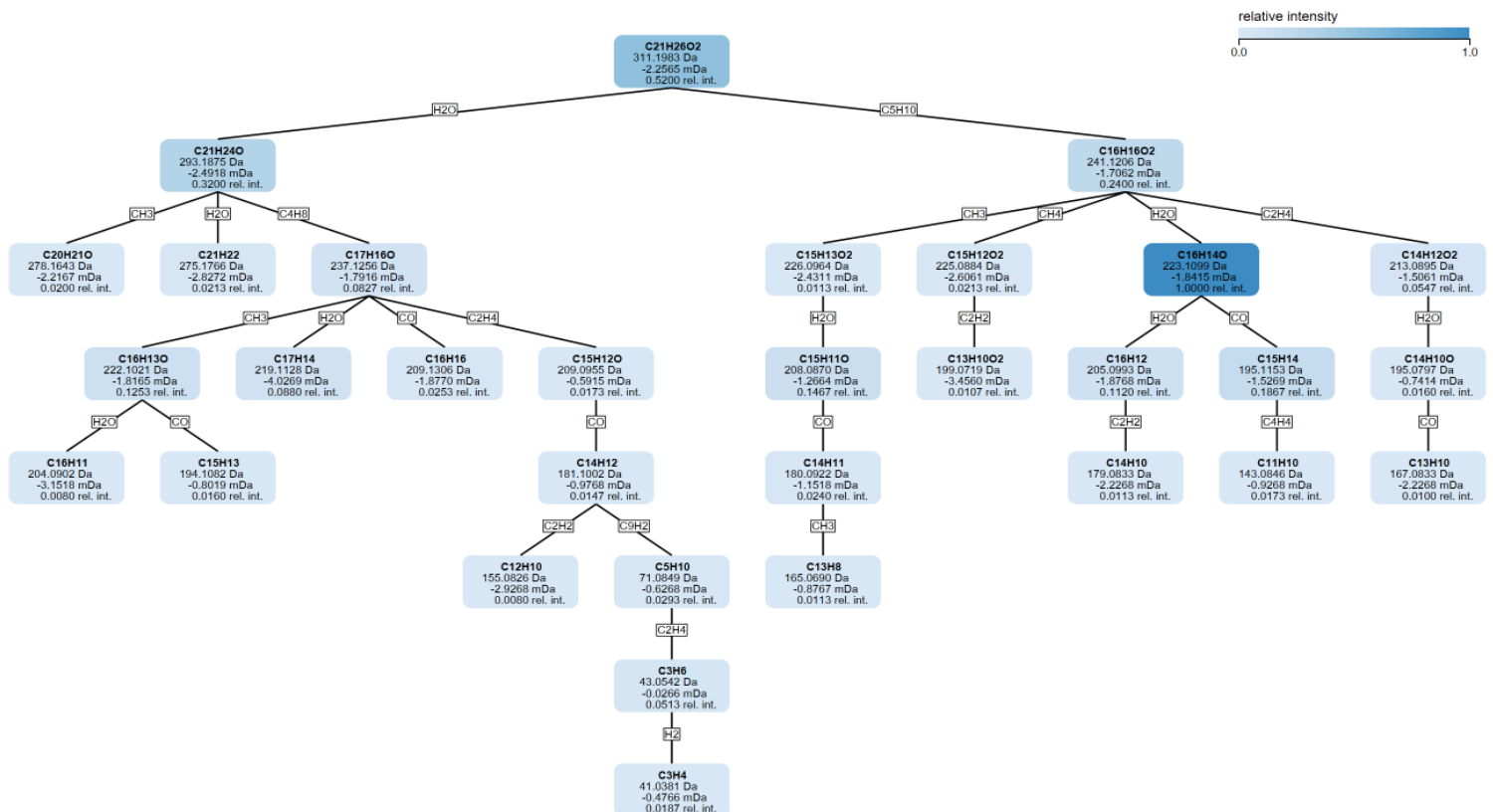


Figure 89 : Arbre de fragmentation du CBN obtenu avec SIRIUS

Pour cet ion, la structure du CBN a été proposée avec un pourcentage de 96.70% d'indice de Tanimoto et un  $XlogP=6.100$ . Tout comme pour le THC annoté précédemment, la majorité des fragmentations ont été expliqués à l'aide de ces analyses.

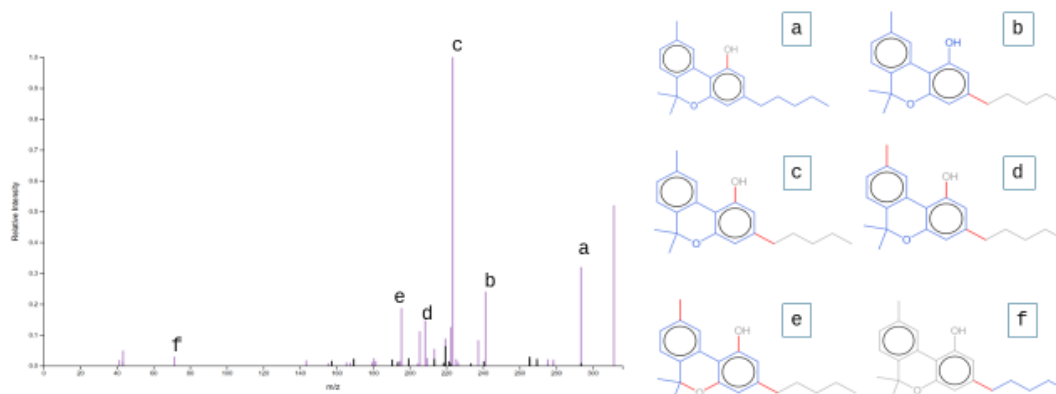
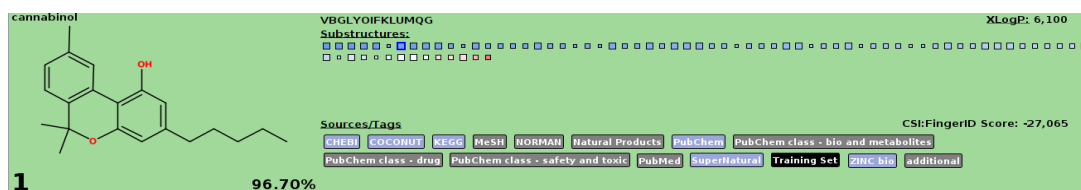


Figure 90 : Explications des fragmentations de la structure et sous-structures (a, b, c, d, e et f) du CBN avec CSI:FingerID

L'ensemble des résultats de structures obtenues et de molécules annotées provenaient de banques de données telles que : HMDB / PubChem / COCONUT / MeSH / Supernatural / Norman / PUBMED / ZINC BIO.

Seulement les propositions de molécules possédant un pourcentage de similarité de Tanimoto supérieur à 70%, un CSIFingerIDscore aux plus proches de zéro, ainsi que les SIRIUSscore et ZODIACscore les plus élevés ont été retenues. Des vérifications manuelles des arbres de fragmentations et des fragmentations potentielles spécifiques aux ions produits ont ensuite été réalisées.

Tableau 34 : Résultats des annotations de molécules après analyses par SIRIUS, ZODIAC et CSI:FingerID

Cluster id	m/z (+)	Confidence Score	Zodiac Score	SiriusScore (arbre)	CSI:FingerID Score	XlogP	Similarité de Tanimoto	Formule	Adduits	Nom (anglais)
2	144.1012	0.344	100.0%	17.13	-49.849	0.801	87.5%	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Ethyl L-prolinate
5	136.0611	0.499	9.1%	18.64	-5.960	-0.420	100.0%	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	adenine
7	138.054	0.291	74.8%	50.61	-15.919	0.500	96.6%	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Trigonelline
8	158.0806	0.308	99.9%	20.36	-24.144	-0.100	97.1%	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Ethyl pyroglutamate
43	399.212	0.142	2.5%	20.50	-92.655	-3.330	74.2%	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	[M+K] <sup>+</sup>	5-amino-2-[[5-amino-2-(2,5-diaminopentanoylamino)pentanoyl]amino]pentanoic acid
60	363.2147	0.122	100.0%	65.41	-97.533	2.500	70.8%	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	5-[3-hydroxy-5-oxo-2-(3-oxooctyl)cyclopentyl]-3-methylpentanoic acid
72	375.2147	0.086	100.0%	30.92	-47.658	2.600	82.7%	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	prostaglandine D2
80	287.199	0.195	42.7%	41.14	-43.710	5.179	89.2%	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	THCV
105	317.2457	0.455	99.9%	28.58	-10.937	7.400	98.9%	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	CBG
108	375.2139	0.091	100.0%	32.42	-40.092	2.600	87.4%	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	prostaglandine D2
132	333.2403	0.153	100.0%	58.59	-57.680	6.500	84.3%	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	[M+H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	CBD ?
134	311.1989	0.278	11.2%	70.77	-27.065	6.100	96.7%	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	CBN
161	373.1988	0.074	100.0%	27.88	-68.637	2.000	76.3%	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	Prostaglandin D3
163	373.1998	0.073	100.0%	24.93	-77.780	3.067	70.4%	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	delta(17)-PGE1
188	315.2291	0.253	100.0%	134.50	-24.603	6.077	94.6%	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	d9-THC
203	315.2291	0.213	100.0%	121.64	-35.212	6.077	88.9%	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	d9-THC
208	347.2587	0.088	99.9%	32.68	-60.737	6.527	81.9%	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	[M+H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	THCH
240	467.3473	0.148	99.2%	15.95	-85.254	8.400	71.2%	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	b-hydroxy-4b-methyl-5a-cholest-7-ene-4a-carboxylate
257	355.1885	0.122	99.3%	57.29	-66.064	3.100	78.1%	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	Prostaglandin A3
314	391.2815	0.108	12.8%	8.19	-64.266	3.600	70.6%	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>	[M-H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	Cholalin

En plus de ces prédictions de structures de molécules, l'analyse de CANOPUS a complété ces dernières, permettant d'établir les classes des formules moléculaires déduites par SIRIUS et confirmer leurs annotations.

Tableau 35 : Résultats des classes proposées pour les formules annotées par CANOPUS

Cluster id	Formule chimique	<i>m/z</i> (+)	#Voies	Probabilité	#Classes	Probabilité
2	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	144.1012	Acides aminés Peptides	79.2%	Dipeptides	25.1%
5	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	136.0611	Alcaloïdes	95.0%	Purine	60.3%
7	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	138.054	Alcaloïdes	99.9%	Pyridine	91.0%
8	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	158.0806	Acides aminés Peptides	69.3%	Acides aminés	20.6%
43	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	399.212	Acides aminés Peptides	99.7%	Tripeptides	99.0%
60	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	363.2147	Acides gras	48.8%	Prostaglandines	54.8%
72	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	375.2147	Acides gras	58.0%	Prostaglandines	50.4%
80	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	287.199	Terpénoïdes	91.9%	Cannabinoïdes	97.9%
105	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	317.2457	Polycétides	93.6%	Cannabinoïdes	76.9%
108	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	375.2139	Acides gras	87.8%	Prostaglandines	74.0%
132	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	333.2403	Polycétides	90.5%	Catéchols	79.3%
134	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	311.1989	Terpénoïdes	98.1%	Cannabinoïdes	99.3%
161	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	373.1988	Acides gras	96.5%	Prostaglandines	91.6%
163	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	373.1998	Acides gras	80.8%	Prostaglandines	84.7%
188	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	315.2291	Terpénoïdes	99.1%	Cannabinoïdes	99.9%
203	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	315.2291	Terpénoïdes	98.9%	Cannabinoïdes	99.8%
208	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	347.2587	Terpénoïdes	98.0%	Cannabinoïdes	99.8%
240	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	467.3473	Terpénoïdes	91.9%	Triterpénoïdes acyclique	35.9%
257	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	355.1885	Acides gras	89.9%	Prostaglandines	95.2%
314	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>	391.2815	Acides gras	96.9%	Ester d'acide gras	23.9%

Ainsi, Sirius permet d'obtenir une proposition d'annotations de 19 structures et formules moléculaires pour ces ions analysés en mode positif. Sept acides gras, deux alcaloïdes, trois acides aminés/peptides sont trouvés et le reste est identifié en tant que terpénoïdes et plus précisément en cannabinoïdes et un triterpénoïdes acyclique.

A l'aide des *m/z* et des temps de rétention, ces résultats sont ensuite entrecroisés avec ceux de GNPS afin de récupérer leurs fragments spécifiques du spectre MS<sup>2</sup>.

Les ions appartenant aux alcaloïdes à *m/z* 136.0611 et 138.054 sont annotés comme étant l'adénine ( $R_t=1.0936\text{min}$ , C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub><sup>+</sup>), la trigonelline ( $R_t=17.9817\text{min}$ , C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup>).

Les ions des acides aminés et peptides sont l'éthyl L-prolinate (*m/z* 144.1012, à 0.9331 min, C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup>), l'éthyl pyroglutamate (*m/z* 158.0806, à 1.3988min, C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup>) et le 5-amino-2-[[5-amino-2-(2,5-diaminopentanylamino)pentanoyl]amino]pentanoic acid (*m/z* 399.212, à 12.0006 min, C<sub>13</sub>H<sub>28</sub>N<sub>8</sub>O<sub>5</sub>+Na<sup>+</sup>).

L'ion à *m/z* 347.2587 est annoté comme un cannabinoïde, le THCH (ou THC-C6) à 26.9386 min et de formule C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>+H<sub>2</sub>O.

Des ions spécifiques aux cannabinoïdes déjà prédits à l'aide de GNPS sont retrouvés sous SIRIUS comme le CBN à *m/z* 311.1989, le Δ<sup>9</sup>-THC à *m/z* 315.2291, le THCV à *m/z* 287.199 et le CBG à *m/z* 317.2457.

Un tableau récapitulatif de l'ensemble des annotations de SIRIUS est présenté en annexe 5.

- Limites de GNPS et SIRIUS

La majorité des acides gras sont annotés comme des prostaglandines (PG). Ces molécules sont normalement produites dans nos cellules à la suite de réactions entre des cyclo-oxygénases et des acides gras essentiels (ex : acide arachidonique). Les prédictions sur plusieurs PG se situent entre 70 et 85 % de similarité de Tanimoto. L'ion à 355.1885 m/z est pris comme exemple. Il possède un pourcentage à 78.1% pour une structure moléculaire  $C_{20}H_{28}O_4$  et d'ionisation  $[M+Na]^+$  qui serait admis pour la PG A3. Sirius nous affiche un message d'avertissement concernant les structures proposées : “*DG(9 :0\_8 :2) El gordo classified this compound as diradylglycerol (the exact chain locations or stereochemistry and the double bond locations can be determined by MS/MS)*”.

Nous nous intéressons donc précisément aux prédictions comparées aux pics des ions du spectre MS2 à l'aide de CSI:FingerID et de EPIMETHEUS . On constate qu'une partie de la structure de la molécule est explicable à plus de 90% (en vert) mais une autre partie reste inexpliquée (en rouge), ne nous permettant pas de valider l'annotation de la PGA2.

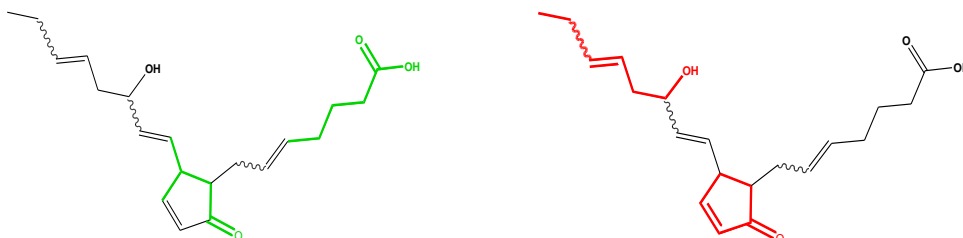


Figure 91 : Représentations de la PGA2 et des sous-structures valides (vert) et invalides (rouge) par CSI:FingerID

On sait peut donc supposer sans craintes la présence de longues chaînes aliphatiques avec la présence de fonctions acides et ainsi que d'insaturations qui sont représentatives d'acides gras. Cependant, on ne pourra pas annotés spécifiquement ces molécules.

Tout comme pour GNPS, Sirius a également des propositions incertaines de structures pour les ions des cannabinoïdes en raison de leurs masses molaires et de leurs fragmentations identiques, et sans compter le manque de données de LC-MS/MS sur les structures minoritaires. Pour cet exemple d'ion à 333.2403 m/z et 23.8919min, la structure serait celle du CBD de formule  $C_{21}H_{31}O_2^+ + H_2O$  (à 85% de similarité). Cependant lorsque l'on se penche sur son spectre MS2 et l'explication des fragments, on remarque de nombreux pics inexpliqués.

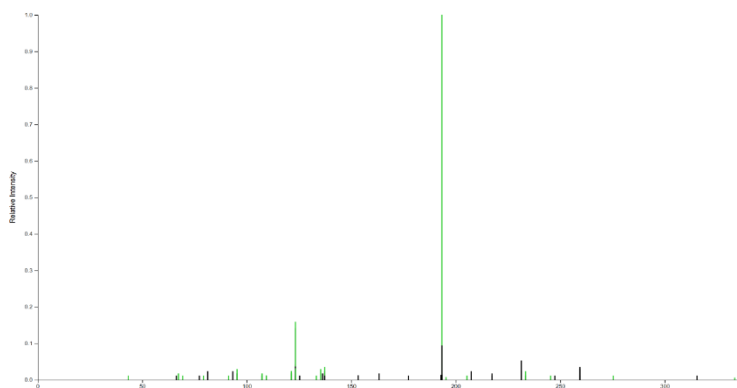


Figure 92 : Spectre MS2 de l'ion à  $m/z$  333.2403 (vert) comparé à celui de la molécule proposée de CBD (noir)



En ne regardant que le spectre MS2 traité pour la proposition de formule brute, on remarque deux types de signaux : les verts représentent les ions communs et expliqués et les noirs représentent les pics des ions fils manquants. On peut, dès à présent, s'interroger sur la formule avancée par SIRIUS. Les prédictions de CSI:FingerID complètent cette remise en question du CBD à ce m/z précis. Tout comme pour les prostaglandines, une partie de la structure est présente de manière certaine et une autre manquante.

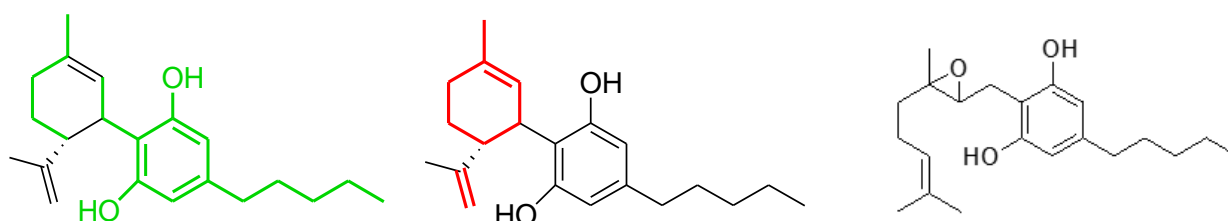


Figure 93 : Représentation de la structure du CBD et des sous-structures valides (vert) et invalides (rouge) par CSI:FingerID (à gauche) avec la molécule du 6,7 Epoxy-CBG (à droite)

Le cycle A portant les deux fonctions alcool avec la chaîne alcane en C5 et une partie du cycle C sont assurés (en vert). Néanmoins, la présence le cycle C complet est jugé absent dans les fragments détectés ainsi que la double liaison terminale spécifique au CBD (en rouge). Ceci nous amène à la conclusion que ce spectre correspond à un cannabinoïdes avec un unique cycle (A) et une chaîne en C5, et valide l'annotation du 6,7 Epoxy-CBG avec une formule de  $C_{21}H_{33}O_3^+$ . Ceci est attesté en croisant ces prédictions et son spectre MS2 avec l'analyse GNPS, le mix des standards et les précédentes analyses en LC-MS/MS sur les extraits cannabinoïdes par Citti et al., 2019.

#### - Visualisation cytoscape :

Le réseau obtenu sur GNPS à l'aide des données .mgf et .quant est exporté sous Cytoscape. Ceci nous permet de visualiser l'ensemble de nos données sous forme d'une figure reliant plus ou moins entre elles l'ensembles des molécules de nos extraits. Deux types de visuels sont proposés : le premier en triant les molécules annotées du réseau par classe et le second en faisant apparaître leurs *m/z* et leurs proportions respectives détectés dans chaque extrait.

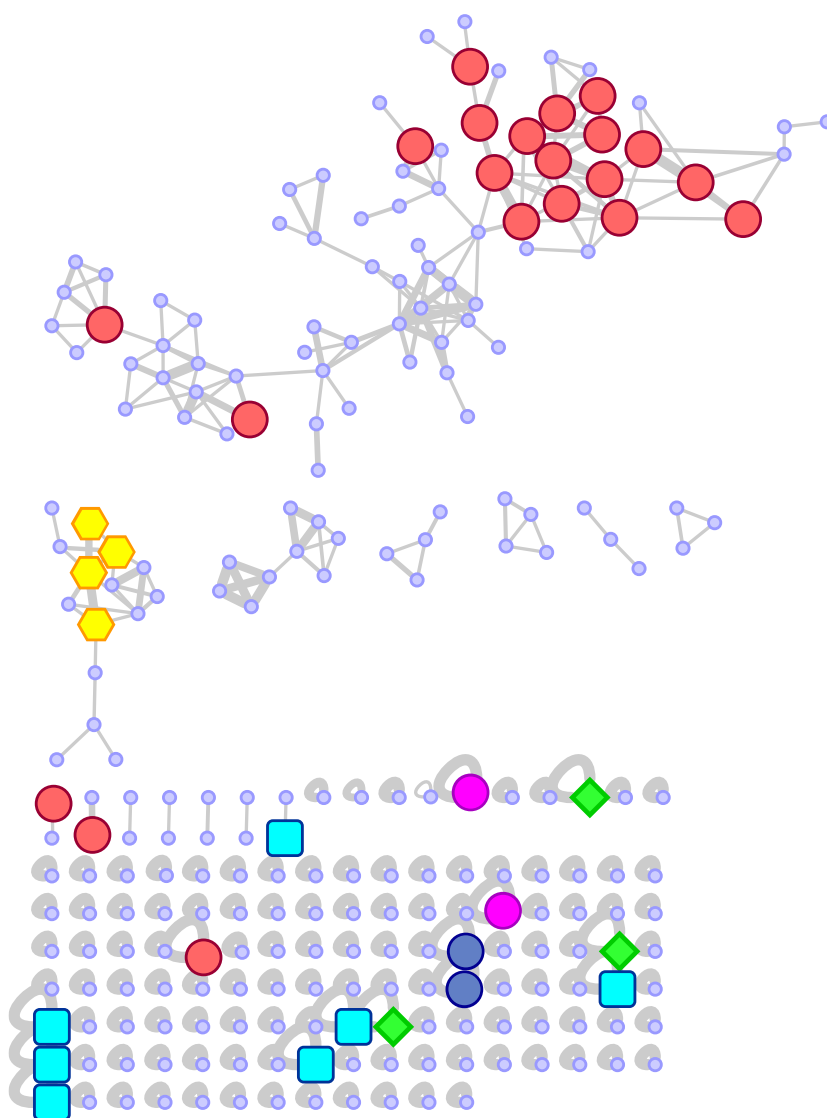


Figure 94 : Réseaux moléculaires des classes de molécules constituant les extraits de cannabis analysés.

Sur ce premier réseau moléculaire, plusieurs classe caractéristiques peuvent être différenciées après avoir annotées les molécules parmi les suivantes : des cannabinoïdes (en rouge), des sesquiterpènes (en jaune), des alcaloïdes (en rose), des acides aminés et peptides (en vert) et des acides gras (en bleu). Seuls les acides gras comme expliqué précédemment n'ont pas pu être annotés entièrement.

Hormis le CBN, le THCH et le CBR qui sont isolés, tous les cannabinoïdes sont regroupés dans le même cluster de la partie supérieur du réseau. Ceci permet de prouver que les paramètres utilisés lors du traitements des données sur MZmine et GNPS sont plutôt corrects. Les sesquiterpènes (comprenant l'alisamol, l'alpha-bisabol et le trans-nerolidol) sont dans un cluster plus petit de 11 ions. Le reste des molécules annotées se trouvent dans la partie inférieure du réseau, celle où les ions sont isolés et non connectés entre eux. Les molécules sont ensuite assignées sur ce réseau.

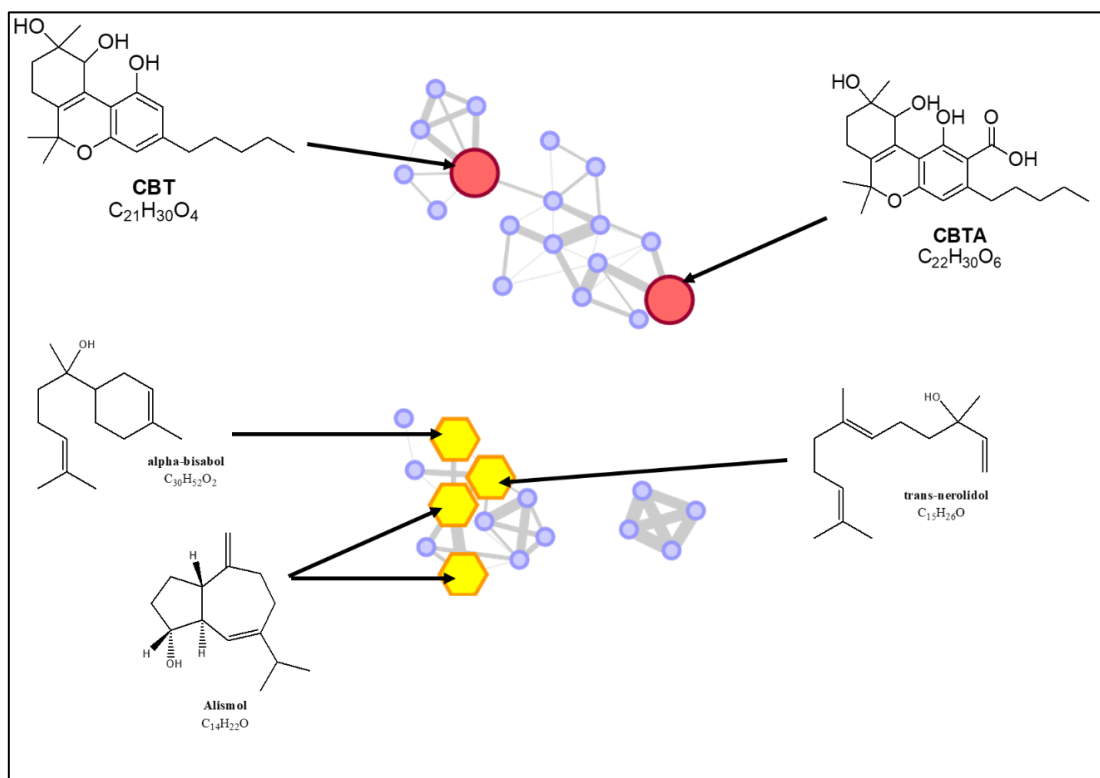
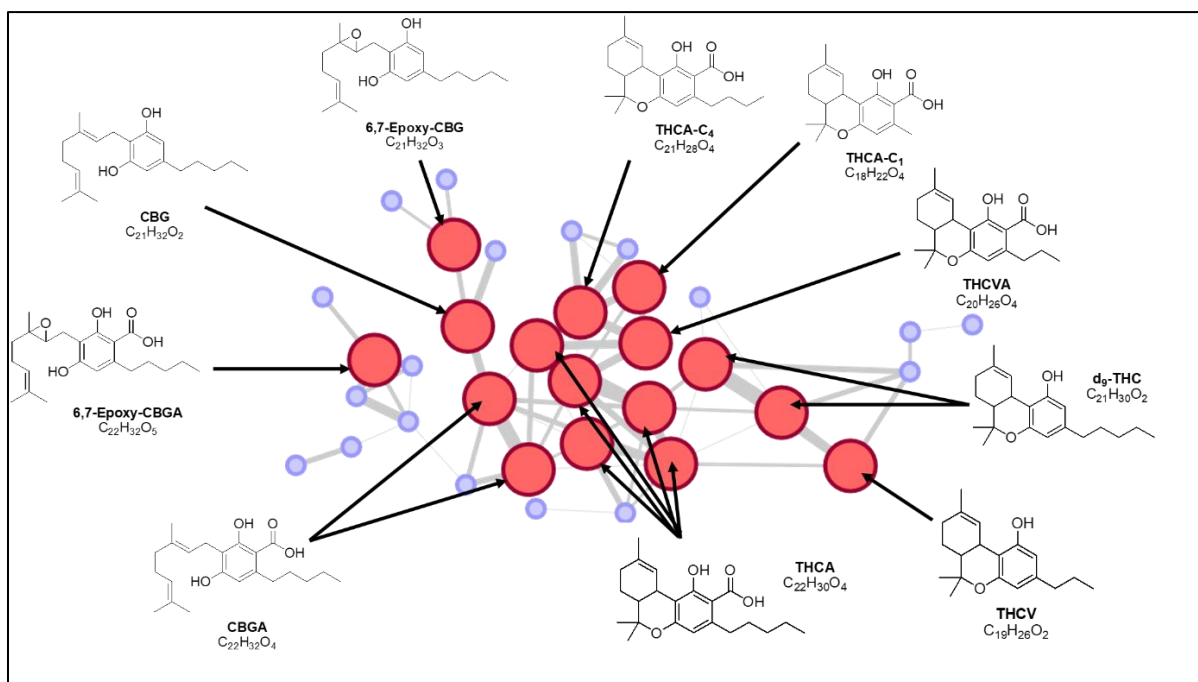


Figure 95 : Affiliations des structures de l'ensemble des molécules annotées par GNPS et SIRIUS (partie 1)

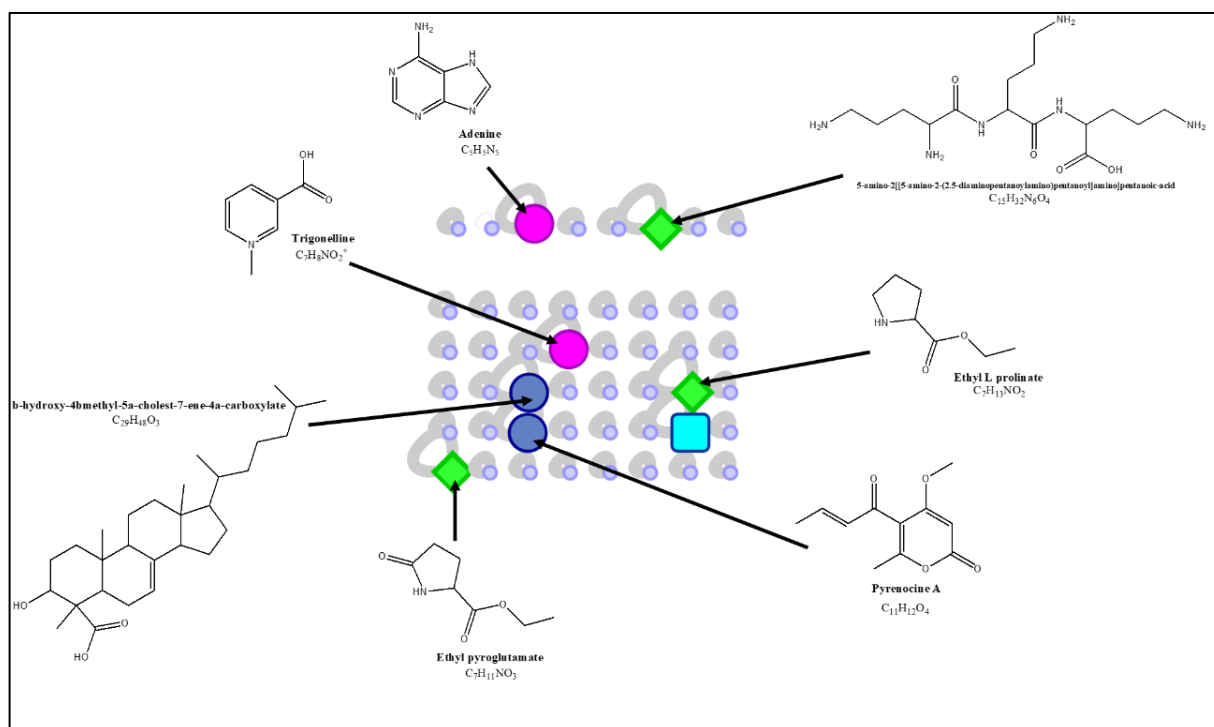
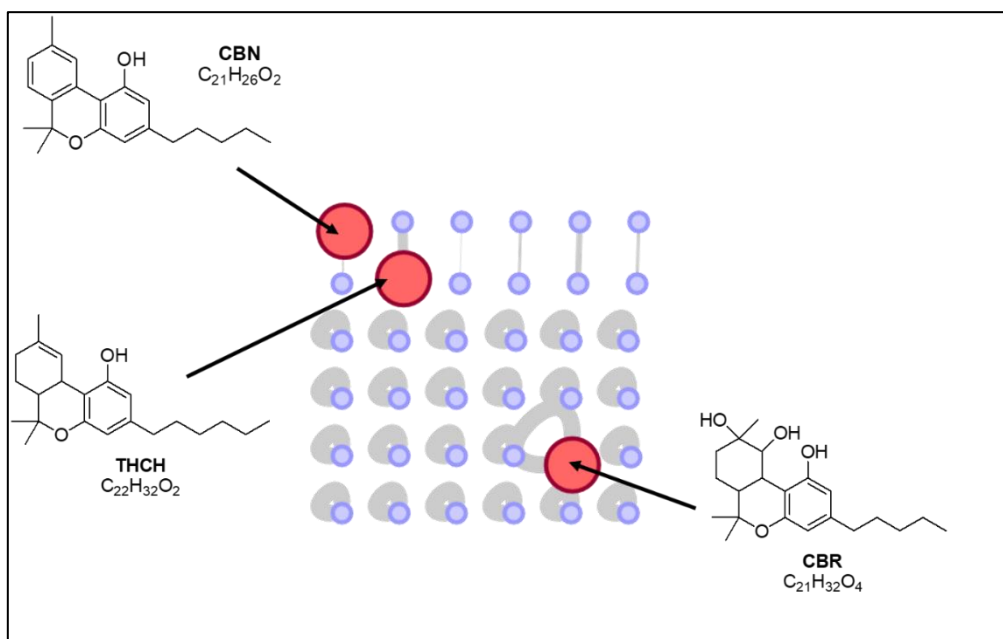


Figure 96 : Affiliations des structures de l'ensemble des molécules annotées par GNPS et SIRIUS (partie 2)

A la suite de ce réseau présent par classes de molécules, on s'intéresse à la répartition de chacun des 5 extraits dans ce réseau. Les remarques que l'on va faire ne sont que qualitatives (en proportions relatives) et seront complétées par la quantification précises à l'aide des standards pour connaître la concentration exacte des molécules d'intérêts.

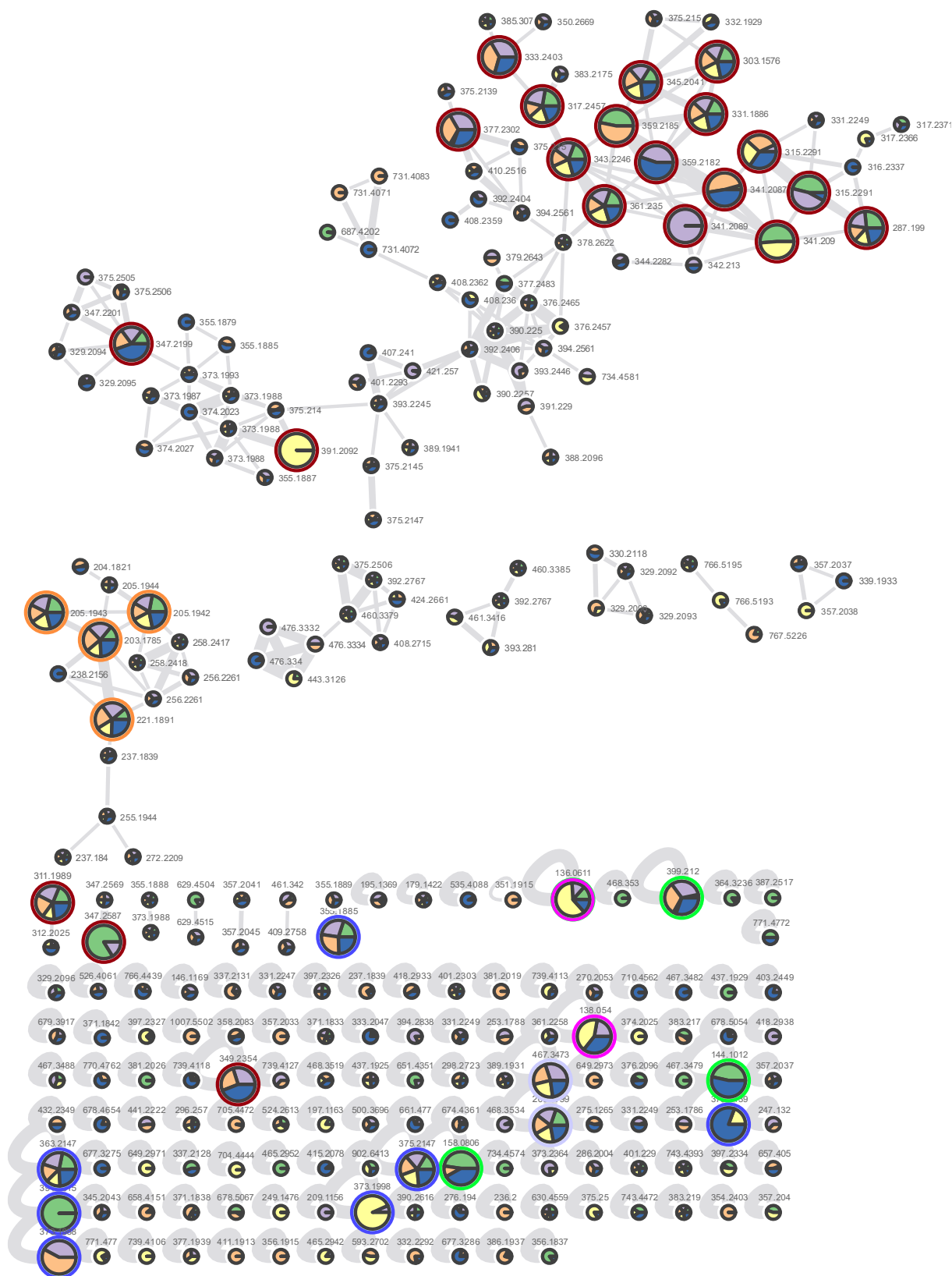


Figure 97 : Réseaux moléculaires obtenus après GNPS et SIRIUS

On rappelle brièvement les colorations spécifiques aux extraits : PLE50 en vert, MAE50 (5) en violet, SE50 EtOH en orange, Triphasic SE en jaune et UAE-P+SE en bleu. Des cannabinoïdes minoritaires semblent spécifiques et présents dans un certain type d'extraction.

Le CBTA ( $m/z$  349.2354) est annotée uniquement dans SE triphasique. Hors cette technique d'extraction est une macération utilisant un mélange de 4 solvants différents : Cyclohexane, AcOEt, EtOH et Eau. Cela permet de conclure que cette molécule ne pourrait être extraite qu'avec l'utilisation de solvant plus apolaires que l'éthanol.

Le THCH ( $m/z$  347.2587) est retrouvé exclusivement par PLE et micro-ondes. L'utilisation de différents solvants, ou bien d'agitation et d'ultrasons ne semblent donc pas favoriser son obtention, à l'inverse de l'utilisation d'une pression élevée (100 bars) et d'un chauffage par agitation moléculaire.

Après des molécules comme le CBR, le 6,7-Epoxy-CBG et le 6,7-Epoxy-CBGA semblent être obtenus qu'avec les micro-ondes, la macération classique et la macération couplée à l'utilisation des ultrasons.

Par rapport au THCA, est présent en très grandes quantités quelques soit la méthode extractive utilisée. Il est même identifié dans 5 nœuds différents : trois sous la forme  $[M+H]^+$  à  $m/z$  341.2090, 341.2087, 341.2089 et 2 sous forme  $[M+H_2O+H]^+$  à  $m/z$  359.2185 et 359.2182.

Les sesquiterpènes semblent être en proportion équivalentes quelques soit les extractions. Les alcaloïdes seraient favorisés par une extraction triphasique. Et en ce qui concerne les proportions des acides aminées, peptides et acides gras, elles seraient dépendantes de l'extraction réalisée.

#### IV.2.2.4. Analyses HS-SPME-GC-MS

L'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a permis d'étudier les molécules volatiles présentes au sein de la fleur de cannabis, que ce soit de la fleur à THC dominant ou bien à CBD dominant. Ces molécules qui ont été vaporisées à haute température appartiennent aux terpènes. L'identification des molécules a été faite par comparaison des spectres de masses obtenus par rapport à la banque de données du logiciel.

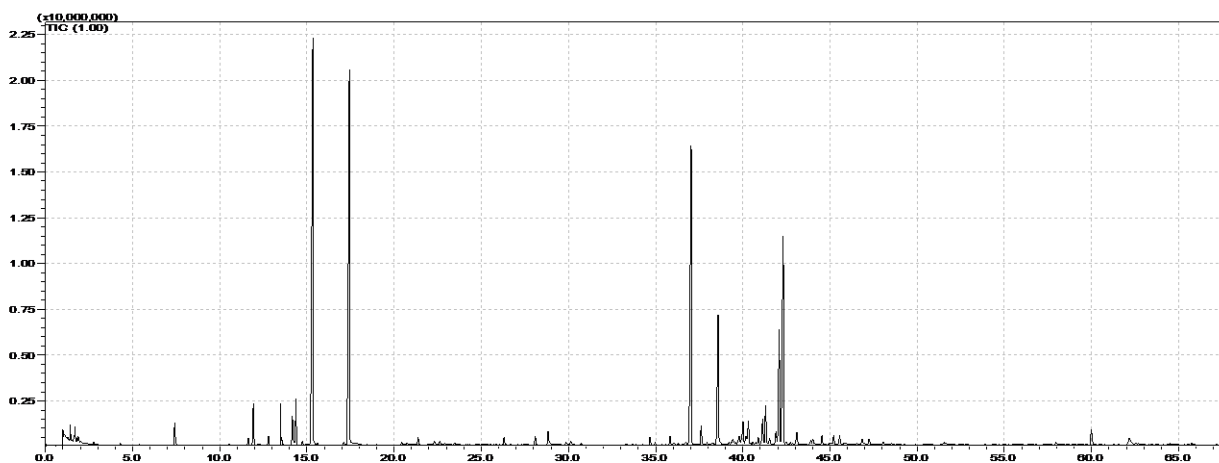


Figure 98 : Chromatogramme GC de l'analyse de fleurs THC dominant

Chaque pic était représentatif d'une molécule avec un spectre de masse spécifique. Après comparaison à la banque de données, elles ont été déterminées et regroupées dans le tableau qui suit.

Plus d'une trentaine de molécules volatiles ont ainsi été retrouvées au sein de la fleur de THC dominante. Les cinq molécules majoritaires étaient le bêta-myrcène, le D-limonène, le caryophyllène, l'humulène et le selina-3,7(11)-diène.

Même si ces molécules sont majoritaires, de nombreuses autres ont été détectées et identifiées. Des monoterpènes très volatils ont été élués en début de chromatographie comme l'alpha-pinène jusqu'à des chaînes d'acides gras ou de triglycérides vaporisés en fin de cycle, aux environs des 60 min.

Tableau 36 : Molécules identifiées par spectrométrie de masse couplée à la GC pour la fleur THC dominant

=

Rt (min)	Nom (anglais)
11.629	Ethyl dimethylacrylate
11.927	1S- $\alpha$ -Pinene
12.795	Camphene
13.543	Benzaldehyde
14.363	$\beta$ -Pinene
15.333	$\beta$ -Myrcene
17.432	D-Limonene
21.375	Linalool
22.305	Fenchol
22.626	trans-2-Pinanol
26.310	Terpineol
28.097	Isothiocyanocyclohexane
28.831	Dimethyl carbitol
34.678	Ylangene
35.829	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-1,4a-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, (1S,4aR,7R)-
37.037	Caryophyllene
37.611	Trans- $\alpha$ -Bergamotene

Rt (min)	Nom (anglais)
38.582	Humulene
39.410	$\gamma$ -Amorphene
39.792	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-4a,8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-
40.013	7-Isopropenyl-1-methyl-4-methylenedecaazulene
40.175	Eremophilene
40.319	$\alpha$ -Selinene
40.888	$\beta$ -Bisabolene
41.310	$\alpha$ -Gurjunene
41.531	(-)-Aristolene
41.907	1H-Cyclopropa[a]naphthalene, 1a.alpha.,2,3,3a,4,5,6,7b.alpha.-octahydro-1,1,3a.alpha.,7-tetramethyl-
42.089	Naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethylidene)-, trans-
42.314	Selina-3,7(11)-diene
44.015	3,5,11-Eudesmatriene
45.553	2-(4a,8-Dimethyl-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1H-naphthalen-2-yl)propan-2-ol
46.853	2-(4a,8-Dimethyl-2,3,4,5,6,8a-hexahydro-1H-naphthalen-2-yl)propan-2-ol
59.991	Heptadecanal
62.166	Cyclotetracosane

La seconde analyse GC-MS a permis d'obtenir le chromatogramme spécifique au lot de fleurs CBD dominant ainsi qu'à ces molécules analysées par spectrométrie de masse.

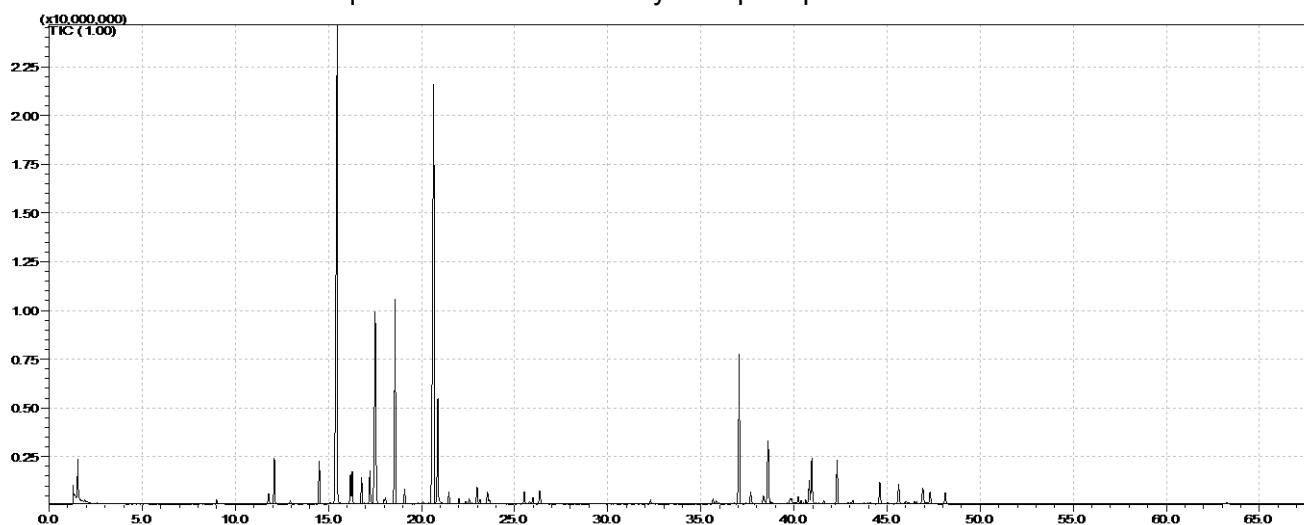


Figure 99 : Chromatogramme GC de l'analyse de fleurs CBD dominant

Tableau 37 : Molécules identifiées par spectrométrie de masse couplée à la GC pour la fleur CBD dominant

Rt (min)	Nom (anglais)
8.983	1-Hexanol
12.091	1S- $\alpha$ -Pinene
14.501	(-)- $\beta$ -Pinene
15.467	$\beta$ -Myrcene
16.178	$\alpha$ -Thujene
16.279	Cyclopentene, 3-isopropenyl-5,5-dimethyl
16.775	(+)-4-Carene
17.220	$\beta$ -Cymene
17.505	D-Limonene
17.975	1R- $\alpha$ -Pinene
18.586	$\beta$ -Ocimene
19.090	$\gamma$ -Terpinene
20.658	Isoterpinolene
20.870	p-Cymenene
21.468	Linalool
22.020	1,3,8-p-Menthatriene
22.375	Fenchol
22.556	Cosmene
23.135	p-Mentha-1,5,8-triene

Rt (min)	Nom (anglais)
23.543	4-trans,6-cis-Allocimene
25.982	p-Cymen-8-ol
26.342	Butanoic acid, hexyl ester
35.656	Hexanoic acid, hexyl ester
35.824	Butanoic acid, octyl ester
37.062	Caryophyllene
37.674	Trans- $\alpha$ -Bergamotene
38.610	Humulene
39.865	B-Chamigrene
40.233	Eremophilene
40.828	$\alpha$ -Farnesene
40.959	$\beta$ -Bisabolene
41.610	$\beta$ -Sesquiphellandrene
42.319	trans- $\alpha$ -Bisabolene
45.630	2-(4a,8-Dimethyl-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1H-naphthalen-2-yl)propan-2-ol
46.924	2-(4a,8-Dimethyl-2,3,4,5,6,8a-hexahydro-1H-naphthalen-2-yl)propan-2-ol
47.309	Bulnesol
48.125	$\alpha$ -Bisabolol



Tout comme pour la fleur de THC, les molécules présentes majoritairement au sein de cette fleur de CBD dominante ont été retrouvées tout comme dans le lot THC. Parmi elles étaient présentes : le bêta-myrcène, le D-limonène, le caryophyllène et l'humulène comme molécules majoritaires mais également le bêta-ocimène et l'isoterpinolène qui n'étaient pas présents dans la fleur de THC.

Les deux lots de fleurs (THC et CBD dominants) ont ainsi été comparés de manière qualitative (pourcentage d'aire relative) par rapport à leurs profils obtenus en chromatographie gazeuse. Les molécules majoritaires et communes aux deux types de fleurs ont été regroupées dans le tableau et graphique suivants.

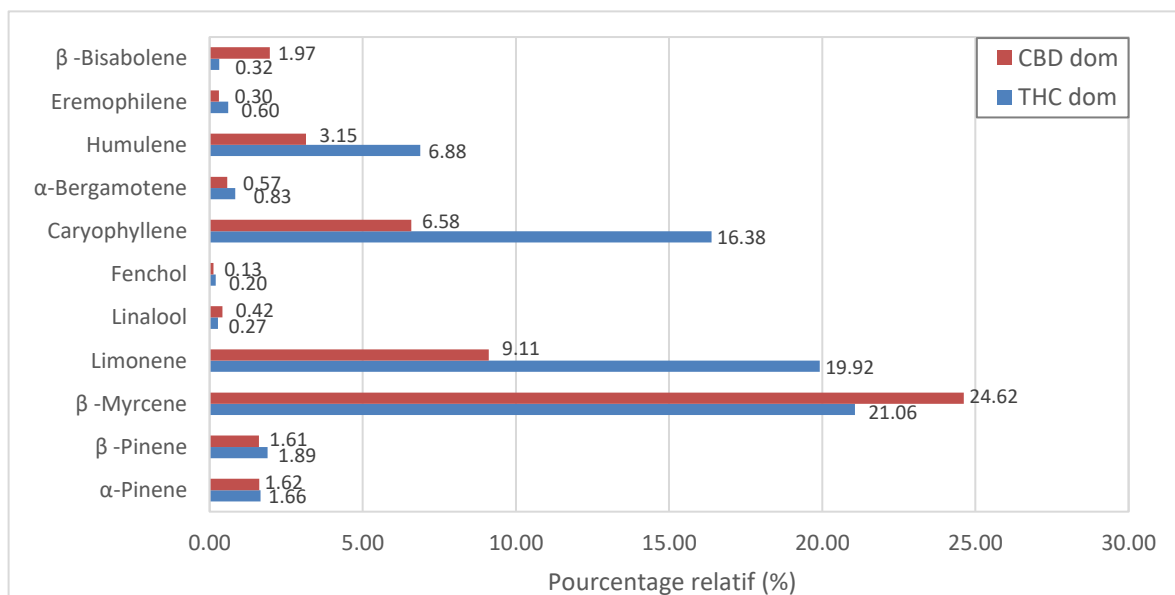


Figure 100 : Comparaisons des molécules principales détectées dans les échantillons de fleurs THC (bleu) et CBD (rouge) en GC-MS

Le lot de fleurs de THC analysées possédait ainsi naturellement plus de limonène (+10.8 %), caryophyllène (+9.8 %) et humulène (+3.73 %) que la fleur de CBD. A l'inverse, le lot de fleurs de CBD possédait plus de bêta-myrcène (+3.56 %) que la variété de THC.

Ils sont essentiellement retrouvés dans les huiles essentielles et leurs propriétés sont diverses et variées et. Ainsi des propriétés antioxydantes, sédatives, antiinflammatoires, anticancéreuses ou même myorelaxantes ont été attribués au myrcène (Surendran et al., 2021), au caryophyllène (Francomano et al., 2019), à l'humulène (Jang et al., 2020) et au limonène (Anandakumar et al., 2021).

## IV.2.3. Séparations et Purifications

### IV.2.3.1. Révélateurs et phases d'éluions

Le choix du système éluant a été une étape déterminante pour assurer le suivi par CCM de l'ensemble des expériences et analyses réalisées sur les extraits de cannabis.

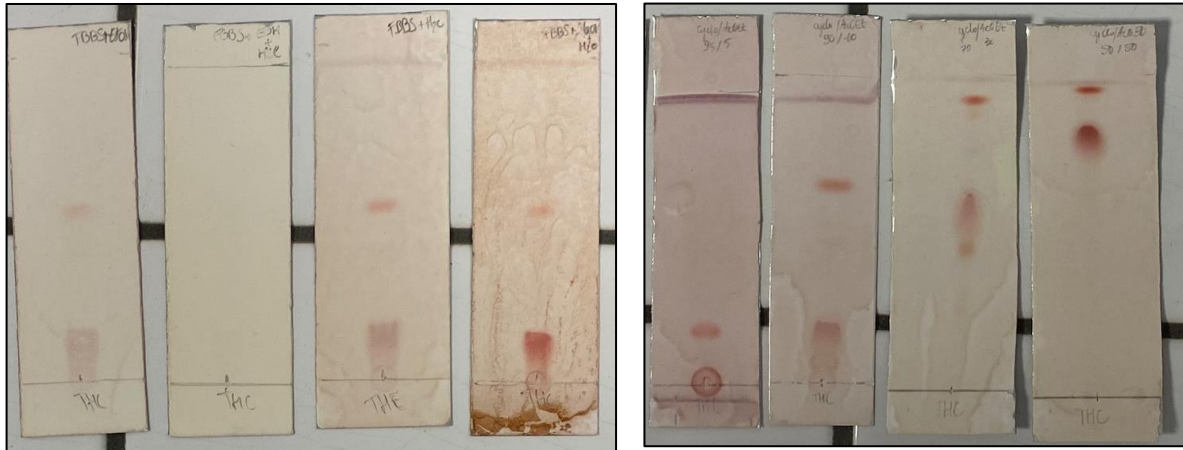


Figure 101 : Plaques CCM de tests de révélateurs FBBS (à gauche) et de phase mobile de C/A 95/5 à 50/50 (à droite)

Le test des révélateurs a montré que la solution de FBBS la plus efficace est celle préparée dans NaOH 0,1M qui toutefois est peu soluble. Ce qui rend la lecture de la plaque CCM difficile. La meilleure solution est celle préparée dans H<sub>2</sub>O distillée in situ avant utilisation et qui ne peut être stockée sur plusieurs jours puisqu'elle se dégrade.

Par rapport au FBBS, la révélation à l'ANS est tout aussi efficace pour l'observation avec une solution stockable beaucoup plus stable dans le temps.

En ce qui concerne les différentes phases mobiles, une migration optimale a été observée par le système éluant C/A 90/10.

Des CCM récapitulatives par révélateur FBBS et ANS avec tous les standards de cannabinoïdes que nous possédons et l'extrait de macération à 0°C ont été réalisées.

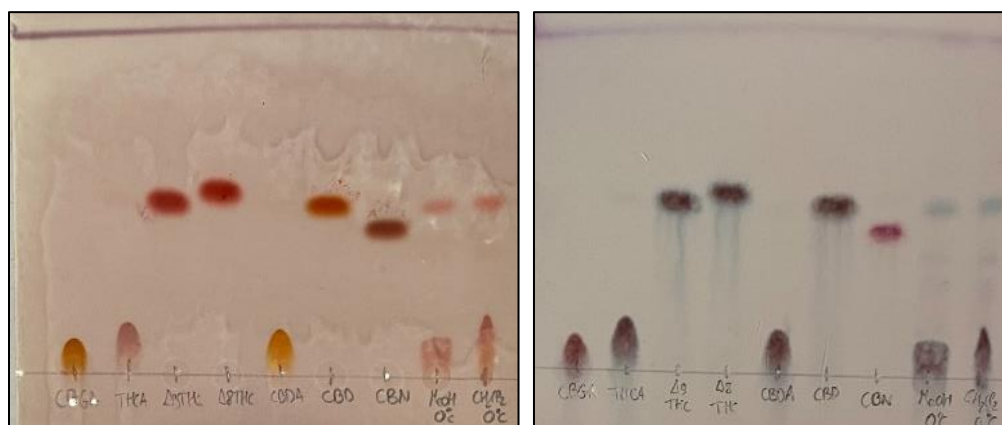


Figure 102 : Plaques CCM de comparaison de révélateur FBBS (à gauche) et ANS (à droite) de phase mobile de C/A 90/10

Ces CCM ont permis de comprendre l'élution et la coloration des cannabinoïdes caractéristiques que nous pourrions potentiellement retrouver dans l'extrait. Les formes acides (THCA, CBDA, CBGA) plus polaires ont très peu migrées et entraînées la formation d'une tâche plus ou moins étalée suivant les concentrations. Le d9-THC et le CBD ont un même Rf, ce qui risque de poser des problèmes lors des séparations sur des variétés riches à la fois en THC et en CBD.

Les fleurs étudiées au cours de ce projet de thèse étaient des variétés « THC dominante » ne possédant pas de CBD ni de CBDA. Ceci a fortement facilité les interprétations et suivis par CCM. L'isomère de position, le d8-THC a migré légèrement plus haut que le d9-THC. Enfin le CBN, molécule de dégradation du THC présente un Rf inférieur au THC avec une coloration plus claire à l'ANS.

#### IV.2.3.2. Schéma de purification

Les résultats de l'ensemble des fractions obtenues à la suite des cinq séparations réalisées (VP1, VP2, VP3, VP4 et VP5) ont été présentées ci-dessous dans un diagramme récapitulatif des résultats. Les molécules déterminées par RMN sur certaines fractions sont coloriées sur ce schéma et ont entièrement expliquées dans la partie dédiée aux analyses par RMN.

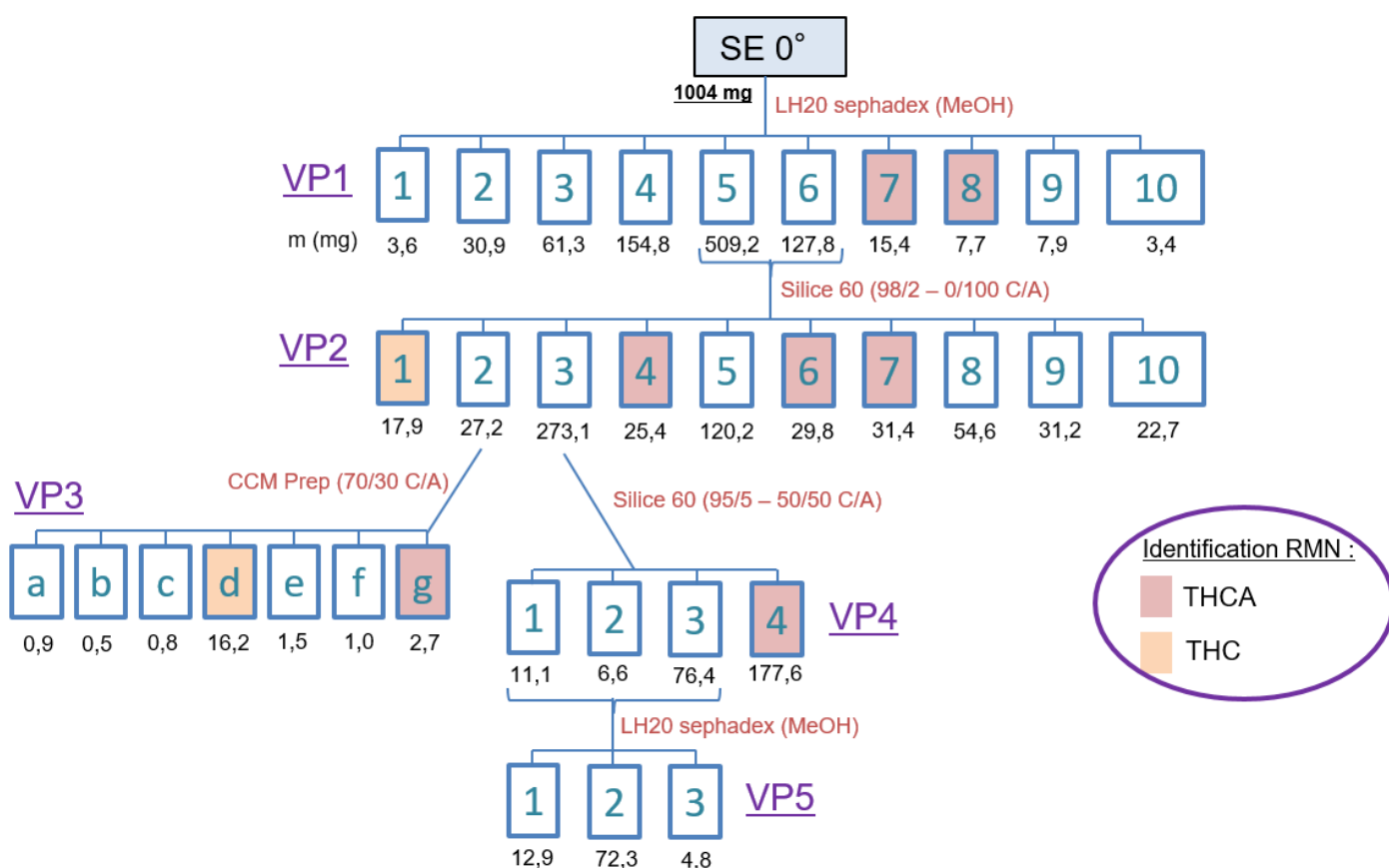


Figure 103 : Schéma récapitulatifs de l'ensemble des cinq étapes de séparation sur l'extrait SE0°C EtOH

Le fractionnement de l'extrait brut (1 g) a été effectué par exclusion stérique sur colonne LH20 élué par le MeOH (VP1). Dix fractions ont été obtenues (tableau 7).

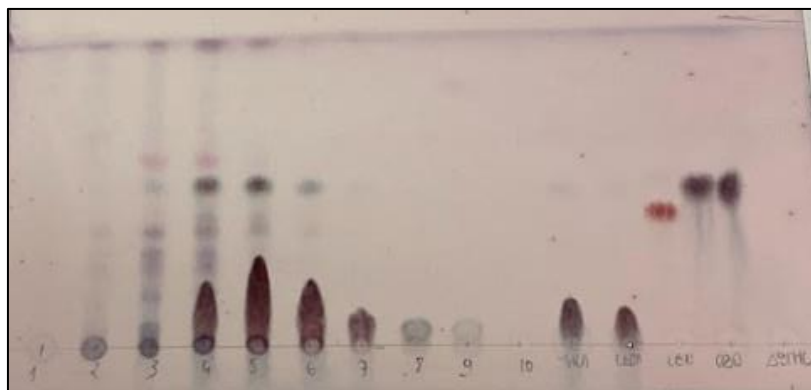


Figure 104 : Plaque CCM des fractions de VP1 éluées avec C/A 90/10

Les fractions 7 à 10 présentaient un profil chromatographique simple, ne semblant contenir qu'un seul composé majoritaire. Elles ont été analysées en RMN  $^1\text{H}$  et le THCA a été identifiée dans les fractions 7 et 8.

Les fractions 5 et 6 ont quant à elle représentées 63 % de l'extrait total récupéré. Du fait de leur profil CCM similaire, elles ont été regroupées et purifiées par colonne ouverte de gel Silice 60 (VP2). Dix sous fractions (VP2-1 à 10) ont été obtenues (tableau 8).

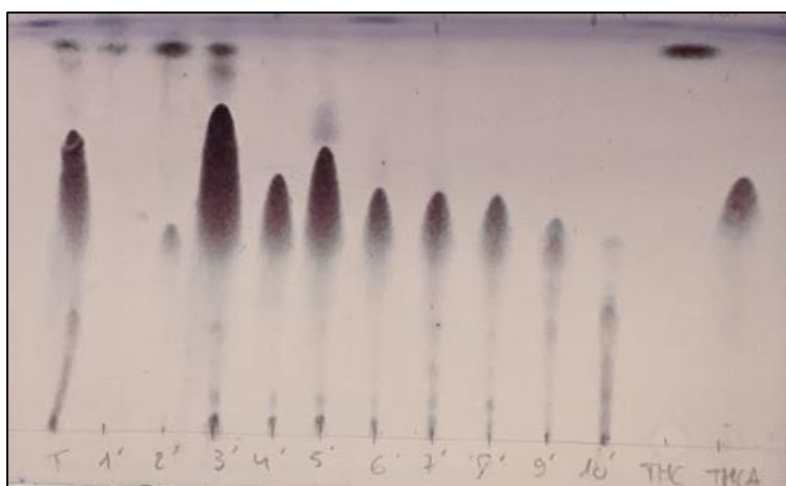


Figure 105 : Plaque CCM des fractions de VP2 éluées avec C/A 70/30

D'après le profil CCM, VP2-1 correspond à une unique tâche au niveau front du solvant, ce qui suppose la présence d'une seule molécule majoritaire dans celle-ci. Après analyses RMN, il s'agissait bien du d9-THC. Les fractions 4, 6 et 7 ont également été analysées en RMN, il s'agit ici du THCA avec la fraction 4 à 90-95 % de pureté. Les fractions VP2-3 à VP2-10 sont très riches en THCA. De plus, la forme neutre (THC) et acide (THCA) n'ont pas pu être séparés totalement, ils ont été co-élués dans la fraction VP2-3.

La fraction VP2-2 semblait posséder uniquement deux composés majoritaires d'après la CCM avec une masse de fraction faible à 27.2mg (supposition du d9-THC et THCA). Elle a été purifiée par CCM préparative (VP3) fournissant ainsi 7 sous fractions de VP3-2a à VP3-2g (tableau 9).

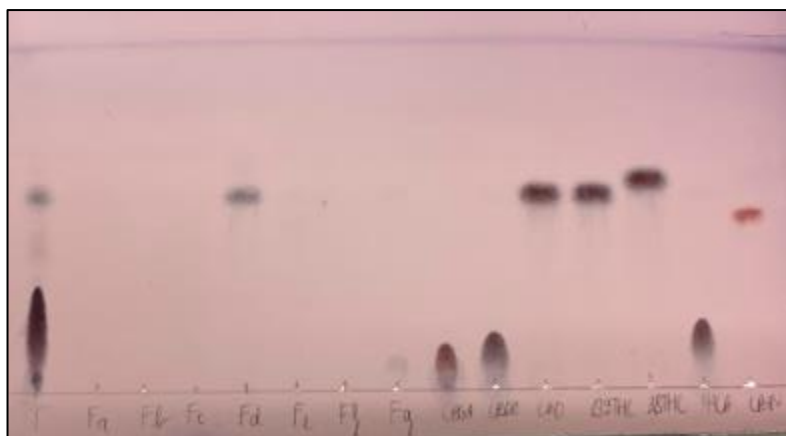


Figure 106 : Plaques CCM des fractions de VP3 éluées avec C/A 90/10

La fraction d correspondait au  $\Delta^9$ -THC et la fraction g correspondait à la forme acide du THC (après analyses RMN). Cette technique de séparation par CCM préparative semble adéquate pour le traitement de faibles quantités d'extraits.

Une séparation supplémentaire (VP4) par Gel Silice 60 en phase normale a été réalisée sur la fraction VP2-3 de 273 mg.

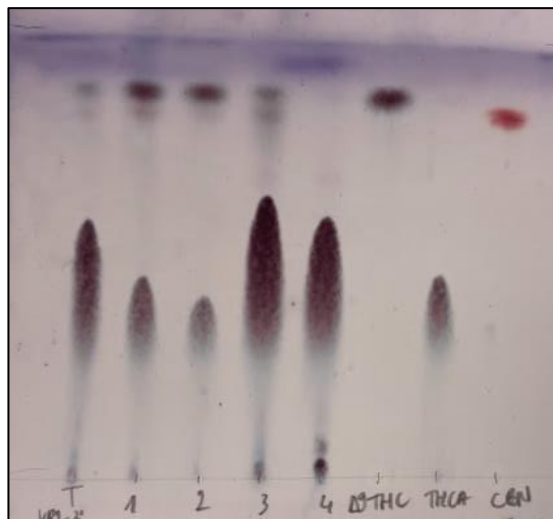


Figure 107 : Plaques CCM des fractions de VP4 éluées avec C/A 70/30

Toutes les sous fractions obtenues (tableau 10) semblaient contenir à minima deux tâches majoritaires, le d9-THC, le THCA et même quelques traces de CBN. Seule la fraction 4 contient un produit presque pur.

Cette fraction VP4-4 apparaît sous la forme d'un solide amorphe légèrement jaunâtre après évaporation et concentration. Elle a été caractérisée par RMN dans la suite du rapport. Elle a également été définie comme la forme la plus pur de THCA obtenue parmi toutes les séparations réalisées jusqu'à présent dans ce travail.

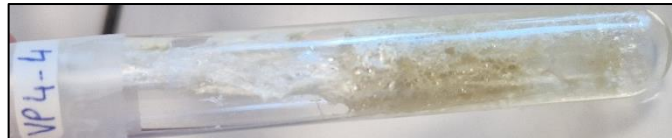


Figure 108 : Photographie du tube VP4-4 contenant le THCA

Les trois fractions restantes de VP4 de profils similaires ont été regroupées et traitées avec la séparation VP5 en colonne LH20 Sephadex. La longueur de la colonne a été augmentée (multipliée par 2) afin d'influer les éluions des composés. A l'issue de la séparation, trois fractions (VP5-1, 2 et 3) ont été obtenues (tableau 11). Cette séparation n'a pas fonctionné et n'a permis d'isoler que potentiellement 4.8 mg de THCA (VP4-3) sur un extrait de 94.1 mg.

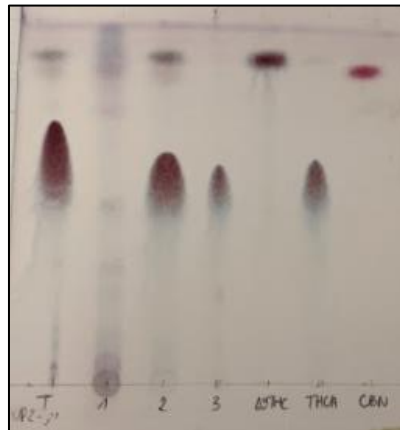


Figure 109 : Plaque CCM des fractions de VP5 éluées avec C/A 70/30

Plusieurs conclusions sur le comportement de la résine de cannabis au sien des étapes de séparations.

Le FBBS et l'ANS réalise un marquage et donc un visuel identique des cannabinoïdes (uniquement une différence de coloration) en système d'éluion C/A (de 98/2 à 50/50).

L'utilisation de l'exclusion stérique avec la LH20 permet un fractionnement grossier primaire de l'extrait brut, et quelques mg THC /THCA peuvent être récupérés directement. L'utilisation de la phase inverse (RP18) devrait être utilisée en priorité, en amont sur un extrait brut car elle permettrait de séparer les cannabinoïdes du reste des autres molécules dans le cas d'extractions avec des contraintes physiques sur la matrice végétale élevées (à haute températures, applications d'ultrasons etc.).

Les formes acides et neutres de chaque cannabinoïde sont très difficiles à séparer en phase normale (colonne de silice ouverte) si leurs concentrations sont importantes, entrainant une co-éluion de ces derniers dans les fractions. Si l'objectif est d'obtenir uniquement du THC ou une autre forme neutre de cannabinoïdes, une étape de décarboxylation sera nécessaire (que ce soit sur les fleurs ou les extraits obtenus).

La plaque CCM Préparative permet une séparation simple en pratique et directe des formes neutres/acides avec le système de phase mobile suivant C/A (70/30). L'inconvénient de cette technique c'est qu'elle ne peut être réalisée que sur de faibles quantités de fractions (quelques dizaines de mg).

Enfin, les pertes estimées après sorties de colonnes ou de plaques au sein des fractions sont très faibles : de l'ordre de 1 à 5% environ.



### IV.2.3.3. Déterminations structurales par RMN

Les molécules de cannabinoïdes ainsi que leurs déplacements chimiques sont largement étudiées et ceci depuis le début du 21<sup>ème</sup> siècle (Choi et al., 2004) .

L'ensemble des spectres utilisés pour la détermination structurale sont disponibles en annexes.

<sup>2</sup>Les molécules de THCA, d9-THC, d8-THC et CBN ont été numérotées en tant que dibenzopyrane. Leurs noms complets IUPAC sont : l'acide (6aR,10aR) -1- hydroxy-6,6,9-triméthyl-3-pentyl-6a,7,8,10-tetrahydro-6H-dibenzo[b,d]pyran-2- carboxylique pour le THCA ; le (6aR,10aR)-6,6,9- triméthyl-3-pentyl-6a,7,8,10-tetrahydro-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol pour le THC et le 6,6,9-triméthyl-3- pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1- ol pour le CBN.

#### - Structure de l'acide tétrahydrocannabinolique (THCA)

A la suite de l'analyse des spectres <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC et HMBC, la numérotation suivante a été proposée avec l'identification de la molécule d'acide tétrahydrocannabinolique (THCA).

Le produit a été isolé sous forme de solide amorphe. Une formule brute C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub> a été déduite à partir de l'ion pseudo-moléculaire à *m/z* 359.2217 [M+H]<sup>+</sup> observé sur son spectre de masse à haute résolution.

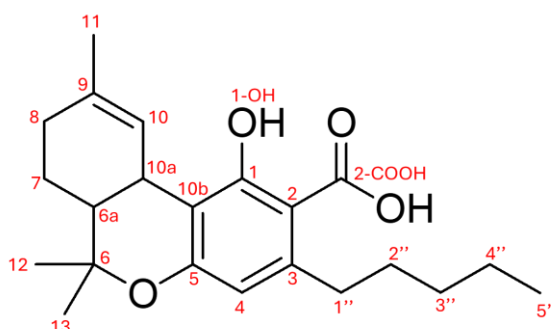


Figure 110 : Structure numérotée de la molécule de THCA

Le spectre RMN <sup>1</sup>H (500.1525 MHz) n'a permis de comptabiliser que 29 des 30 hydrogènes de la molécule. Il est caractérisé par la présence des singulets à 12.19 ppm, 6.37 et 6.23 intégrant chacun un proton, d'un quadruplet à 3.21 ppm et des plusieurs signaux dans la région des aliphatiques entre 2.92 et 0.88 ppm.

Le spectre RMN <sup>13</sup>C a quant met en évidence la totalité des 22 carbones de la molécule. Le spectre HSQC a permis de déduire l'existence de 8 carbones quaternaires qui résonnent à 176.1, 164.9, 159.9, 147.1, 134.1, 110.1, 102.5, 79.5 ppm.

Chacun des protons a pu être assigné à son carbone respectif grâce aux corrélations H et C à longue distance observées sur le spectre HMBC.

Les protons du groupement méthyle à 1.66 ppm porté par le carbone à 23.5 ppm corrèle avec les carbones à 134.1 (C9), 123.8 (C10), 31.4 (C8) et 25.2 (C7) ppm tandis que le proton à 1.09 corrèle avec les carbones à 19.7 (C13), 45.8 (C6a) et 79.1 (C6) ppm. Les corrélations du

proton à 3.21 ppm avec C6a, C7, C9, C10 et C10b permettent de construire le premier cycle portant la double liaison éthylénique.

Le proton à 12.19 ppm très déblindé corrèle avec les carbones à 164.9 (C1), 110.1 (C10b), 102.5 (C2) et 159.9 (C5). Les corrélations du proton à 6.23 ppm en particulier avec les carbones à 176.1 (2-COOH), 36.7 (C1'') permettent de relier C6 et C5 formant le noyau B avec le noyau aromatique.

Les corrélations du proton H-2'' à 1.55 ppm avec C3, C1'', C3'', C4'' et celles de H-5'' avec C3'', C4'' relient la chaîne pentyl au noyau aromatique conduisant à la structure de l'acide tétrahydrocannabinolique.

Tableau 38 : Déplacements chimiques permettant la détermination structurale du THCA

Position	$\delta H$ (J en Hz)	$\delta C$ (ppm)	HMBC
1		164.9	
2		102.5	
3		147.1	
4	6.23 (1H, s)	112.8	C2 ; 2-COOH ; C5 ; C10b; C1''
5		159.9	
6		79.1	
6a	1.69 (1H, m)	45.8	C6 ; C7 ; C10a ; C12 ; C13
7	1.89 (1H, m) et 1.41 (1H, s)	25.2	C6 ; C6a ; C8 ; C9 ; C10a ; C12
8	2.15 (2H, m)	31.4	C6a ; C7 ; C9 ; C10
9		134.1	
10	6.37 (1H, q, 1.5)	123.8	C6a ; C8 ; C9 ; C10a ; C10b
10a	3.21 (1H, dq, 11.0 et 1.9)	33.7	C6a ; C7 ; C9 ; C10 ; C10b
10b		110.1	
11	1.66 (3H, m)	23.5	C7 ; C8 ; C9 ; C10
12	1.42 (3H, s)	27.6	C6 ; C6a ; C13
13	1.09 (3H, s)	19.7	C6 ; C6a ; C12
1''	2.92 (1H, m) et 2.76 (1H, m)	36.7	C2 ; C3 ; C4 ; C2''
2''	1.55 (2H, m)	31.5	C3 ; C1'' ; C3'' ; C4''
3''	1.32 (2H, m)	33.2	C4''
4''	1.32 (2H, m)	22.7	C3''
5''	0.88 (3H, t, 7.1)	14.2	C3'' , C4''
1-OH	12.19 (1H, s)		C1 ; C2 ; C5 ; C10b
2-COOH		176.1	



- Structure du delta9-tétrahydrocannabinol (d9-THC)

Avec l'identification de la molécule de delta9-tétrahydrocannabinol (d9-THC) de formule brute  $C_{21}H_{30}O_2$  déduite à partir de l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  315.2319  $[M+H]^+$  par spectrométrie de masse.

Trente atomes d'hydrogène ont été retrouvés avec le spectre RMN du proton et 21 atomes de carbone avec le spectre RMN  $^{13}C$ .

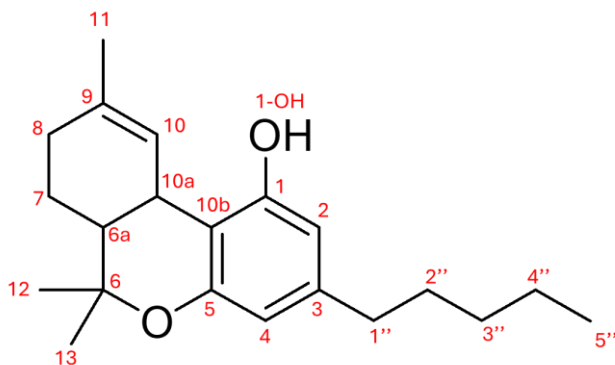


Figure 111 : Structure numérotée de la molécule de d9-THC

La majorité des déplacements chimiques des protons étaient très similaires entre le THCA et le THC. Une comparaison de leur spectre  $^1H$  montre la disparition du proton à 12.19 ppm et l'apparition d'un singulet à 4.74 ppm et d'un doublet à 6.11 ppm. Le spectre  $^{13}C$  montre l'absence du carbonyle à  $\delta$  176.1 ppm, des carbones à 164.9, 159.9 et l'apparition des carbones à  $\delta$  107.8, 154.4 et 155.1 ppm.

La principale différence a été retrouvée en C2, où le THC possède un proton à la place de la fonction acide carboxylique du THCA. Ce proton résonne à 6.11 ppm en raison de sa proximité de la fonction hydroxyle en C1 sur le même cycle aromatique. D'ailleurs, le proton cet hydroxyle (1-OH) a également été retrouvé et il résonne à 4.74 ppm. Et les protons du C1'' étaient moins déblindés (à 2.41 ppm) en l'absence du -COOH (contre 2.92 ppm pour le même proton du THCA). Ces attributions ont été confirmés par les corrélations observées sur le spectre HMBC.

Tableau 39 : Déplacements chimiques permettant la détermination structurale du d9-THC

Position	$\delta H$ (J en Hz)	$\delta C$ (ppm)	HMBC
1		155.0	
2	6.11 (1H, d, 1.6)	107.8	C3 ; C4 ; C5 ; C1''
3		143.0	
4	6.24 (1H, d, 1.5)	110.3	C1 ; C2 ; C1''
5		154.4	
6		77.4	
6a	1.69 (1H, m)	46.0	C6 ; C7 ; C8 ; C9 ; C10a ; C13
7	1.89 (1H, m) et 1.39 (1H, m)	25.2	C6a ; C9 ; C10 ; C11
8	2.14 (2H, m)	31.4	C6a ; C7 ; C9 ; C10
9		134.6	
10	6.27 (1H, q, 1.6)	123.9	C6a ; C8 ; C9
10a	3.18 (1H, dm, 10.9)	33.8	C6a ; C7 ; C9 ; C10 ; C10b
10b		109.5	
11	1.66 (3H, m)	23.5	C6a ; C7 ; C8 ; C9 ; C10
12	1.39 (3H, s)	27.8	C6 ; C6a ; C10a ; C13
13	1.07 (3H, s)	19.4	C6 ; C6a ; C12
1''	2.41 (2H, td, 8.18 et 3)	35.6	C3 ; C2''
2''	1.55 (2H, m)	30.8	C3 ; C3''
3''	1.28 (2H, m)	31.5	C4''
4''	1.28 (2H, m)	22.7	C3''
5''	0.87 (3H, t, 7.0)	14.2	C3'' ; C4''
1-OH	4.74 (1H, s)		C1 ; C4 ; C5 ; C10b

- Structure du delta 8 – tétrahydrocannabinol (d8-THC)

La fraction DIF-112-d correspond à d8-THC de formule brute  $C_{21}H_{30}O_2$  et identifiée par spectrométrie de masse à  $m/z$  315.2319.

Trente atomes d'hydrogène ont été retrouvés avec le spectre RMN du proton et 21 atomes de carbone avec le spectre RMN  $^{13}C$  tout comme pour son isomère de position, le d9-THC.

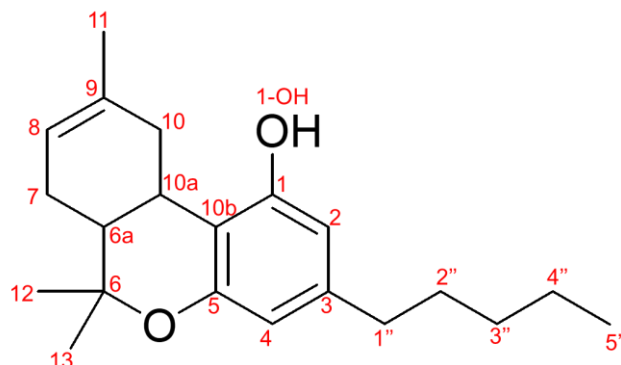


Figure 112 : Structure numérotée de la molécule de d8-THC

L'ensemble des déplacements des protons du cycle portant cette unique double liaison ont évolué par rapport à son isomère (d9-THC), tout comme leurs équivalences. Le d9-THC admettait un proton du C10a à 3.18 ppm, un proton du C10 à 6.27 ppm et deux protons du C8 à 2.14 ppm. L'analyse de cette molécule a présenté un proton du C10a à 2.70 ppm, deux protons du C10 à 3.17 et 1.82 ppm et un proton du C8 à 5.41 ppm. La position de ces protons a bien été vérifiée par HSQC et leurs corrélations  $^2J$  et  $^3J$  exprimées par l'HMBC dans le tableau dédié. De plus, les déplacements chimiques des carbones de la double liaison C=C devraient être aux environs de 110 à 140 ppm contre 20 et 40 ppm pour des carbones cycliques reliés par une simple liaison. Pour le d9-THC, les carbones C9 et C10 résonnent à 123.9 et 134.6 ppm. Pour le d8-THC, les carbones C8 et C9 résonnent à 134.9 et 119.5 ppm.

Tableau 40 : Déplacements chimiques permettant la détermination structurale du d8-THC

Position	$\delta\text{H}$ (J en Hz)	$\delta\text{C}$ (ppm)	HMBC
1		154.8	
2	6.08 (1H, d, 1.5)	107.8	C1 ; C10b ; C1''
3		142.9	
4	6.25 (1H, d, 1.5)	110.4	C2 ; C5 ; C10b ; C1''
5		155.1	
6		77.5	
6a	1.78 (m)	45.1	C6 ; C7 ; C8 ; C9 ; C12 ; C13
7	2.12 (1H, m) + 1.79 (m)	28.2	C6a ; C8 ; C9 ; C10a
8	5.41 (1H, broadd, 4.4)	119.5	C6a ; C7 ; C10
9		134.9	
10	3.17 (1H, dd, 16.5 et 4.5) + 1.82 (m)	36.2	C6a ; C8 ; C9
10a	2.70 (1H, td, 10.9 et 4.8)	31.8	C5 ; C6a ; C7 ; C10 ; C10b
10b		110.7	
11	1.68 (3H, s)	23.8	C8 ; C9 ; C10
12	1.35 (3H, s)	27.8	C5 ; C6a ; C6 ; C13
13	1.08 (3H, s)	18.7	C5 ; C6a ; C6 ; C12
1''	2.42 (2H, td, 7.6 et 4.1)	35.6	C2 ; C3 ; C2''
2''	1.54 (2H, q, 7.3)	30.8	C3 ; C3'' ; C4''
3''	1.29 (2H, m)	31.7	C4''
4''	1.29 (2H, m)	22.8	C3''
5''	0.86 (3H, t, 7.0)	14.2	C2'' ; C3'' ; C4''
1-OH	4.66 (1H, s)		C10b ; C4 ; C5

D'après la littérature (Choi et al., 2004), un signal sous la forme d'un multiplet à 1.80 ppm a été retrouvé équivalent à 3H. Grâce à l'analyse à 500 MHz et des grossissements de l'analyse HSQC, trois protons distincts portés par trois carbones différents ont pu être observés : un à 1.78 ppm sur le C6a, un à 1.79 ppm sur le C7 et un à 1.82 ppm sur le C10.

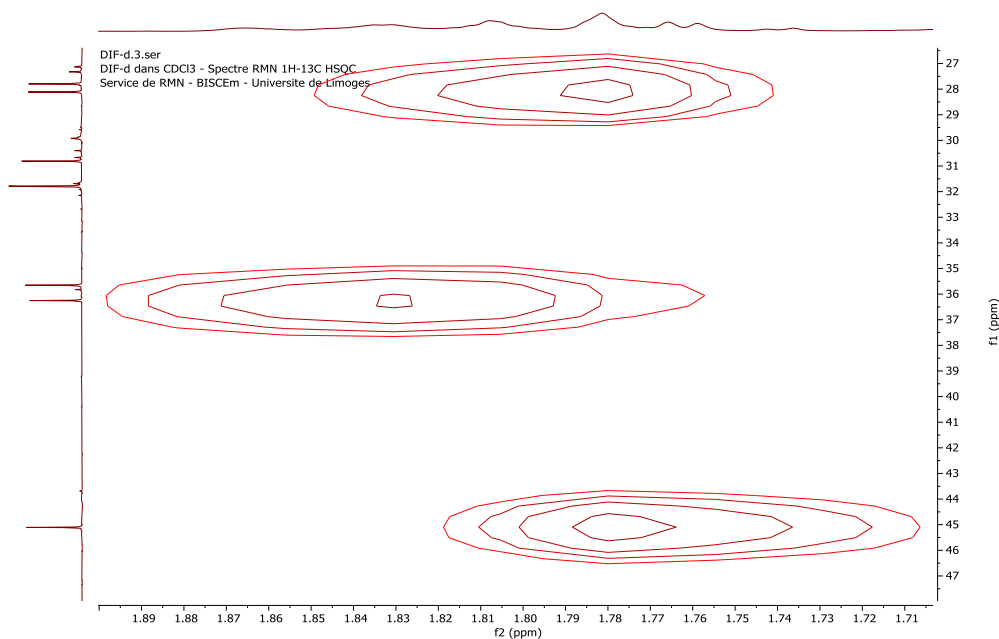


Figure 113 : Agrandissement du spectre RMN HSQC du d8-THC

Il en est de même pour la différenciation d'un signal non différencié des carbones C1 et C5 à 155 ppm. Le signal 154.8ppm a pu être attribué au C1 et celui à 155.1ppm au C5 à l'aide de l'HMBC. Le proton à 6.08 ppm (C2) montre une corrélation  $^2J$  avec un carbone à 154.8 ppm, donc le C1. Le carbone 5 a quant à lui été affilié à 155.1 ppm par déduction puisqu'il est en  $^2J$  du proton du C4 à 6.25 ppm.

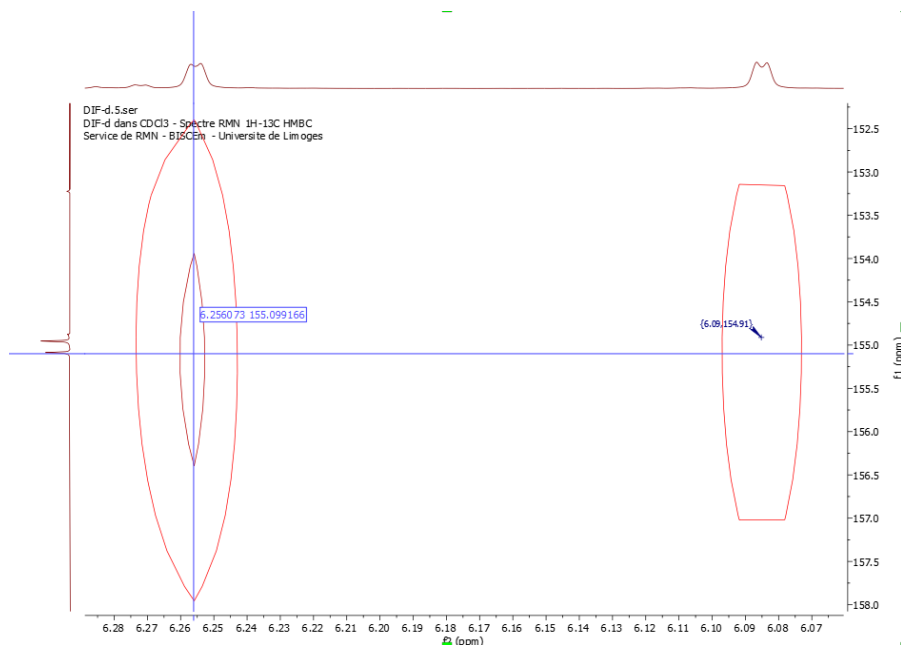


Figure 114 : Agrandissement du spectre RMN HMBC du d8-THC

Quelques impuretés sont observées sur les spectres de proton et carbone réalisés, ce qui se traduit par la présence de signaux de faibles intensités par rapport aux signaux la molécule étudiée.

- Structure du cannabinoïl (CBN)

Après l'analyse des spectres  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC et HMBC, cette molécule a été identifiée comme étant le cannabinoïl (CBN) dans la fraction DIF-I12-c. Une formule brute  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_2$  a été déduite à partir de l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  311.2006  $[\text{M}+\text{H}]^+$  observé sur son spectre de masse à haute résolution.

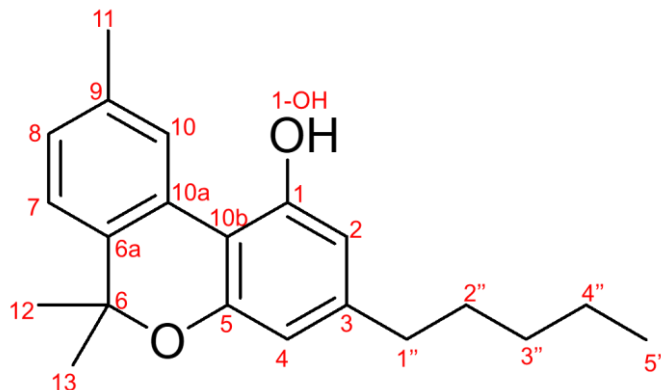


Figure 115 : Structure numérotée de la molécule de CBN

Vingt-six atomes d'hydrogène ont été retrouvés avec le spectre RMN  $^1\text{H}$  et 21 atomes de carbone avec le spectre RMN  $^{13}\text{C}$ .

Cette molécule possède deux cycles aromatiques qui ont pu être retrouvés à travers les déplacements chimiques obtenus. En RMN  $^{13}\text{C}$ , les carbones numérotés de 6a à 10a et de 1 à 10b se situent entre 110 et 140 ppm. Ces déplacements sont spécifiques à des doubles liaisons entre carbones. Le proton du 1-OH a été retrouvé plus déblindé à 5.35 ppm que précédemment au sein du d9-THC et d8-THC (respectivement 4.74 et 4.66 ppm) en raison de sa proximité avec deux cycles aromatiques conjugués.

Tableau 41 : Déplacements chimiques permettant la détermination structurale du d8-THC

Position	$\delta\text{H}$ (J en Hz)	$\delta\text{C}$ (ppm)	HMBC
1		154.8	
2	6.26 (1H, d, 1.5)	110.1	C1 ; C4 ; C5 ; C1''
3		144.7	
4	6.43 (1H, d, 1.5)	110.9	C2 ; C5 ; C1''
5		153.3	
6		77.5	
6a		137.0	
7	7.13 (1H, d, 7.8)	122.7	C6a ; C6 ; C8
8	7.06 (1H, dd, 1.0 et 7.8)	127.8	C9 ; C11
9		137.1	
10	8.17 (1H, s)	126.6	C9 ; C10a ; C10a ; C11
10a		108.9	
10b		127.7	

11	2.38 (3H, s)	21.7	C6a ; C7 ; C9 ; C10
12	1.61 (6H, m)	27.3	C6a ; C6 ; C7 ; C13
13	1.61 (6H, m)	27.3	C6a ; C6 ; C7 ; C12
1''	2.48 (2H, t, 7.9)	35.8	C2 ; C3 ; C2'' ; C3''
2''	1.59 (2H, m)	30.6	C3'' ; C4'' ; C5''
3''	1.31 (2H, m)	31.7	C4''
4''	1.31 (2H, m)	22.7	C3''
5''	0.88 (3H, t, 7.0)	14.2	C2'' ; C3'' ; C4''
1-OH	5.35 (1H, s)		C5 ; C10a ; C10b

Cependant, un signal sous la forme d'un multiplet à 1.60 ppm a été retrouvé équivalent à 8H et resté indifférencié dans la littérature. A l'aide de l'appareil de 500 MHz et de l'HSQC, deux différents signaux ont pu être distingués : un pic à 1.59 ppm équivalent aux deux protons du C2'' et un autre à 1.61 ppm de 6 protons pour les 3 protons équivalents du C12 et C13.

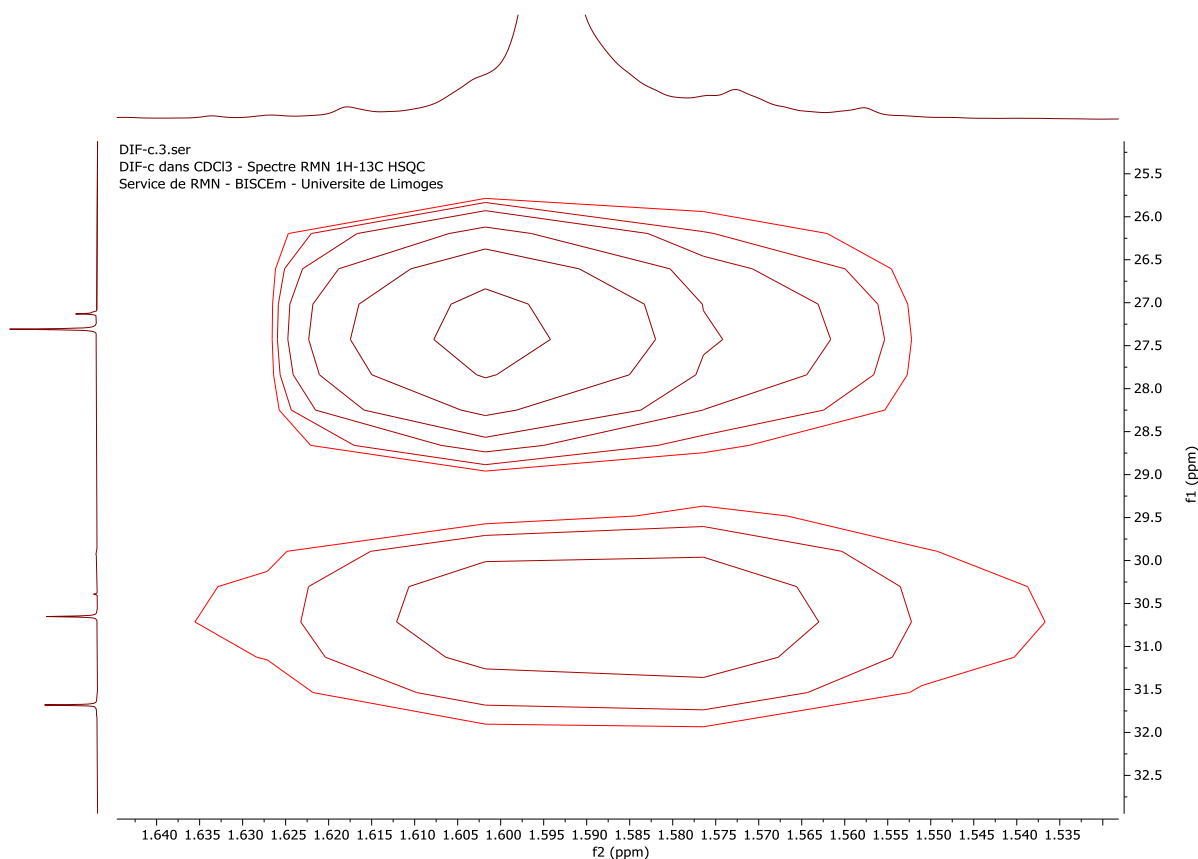
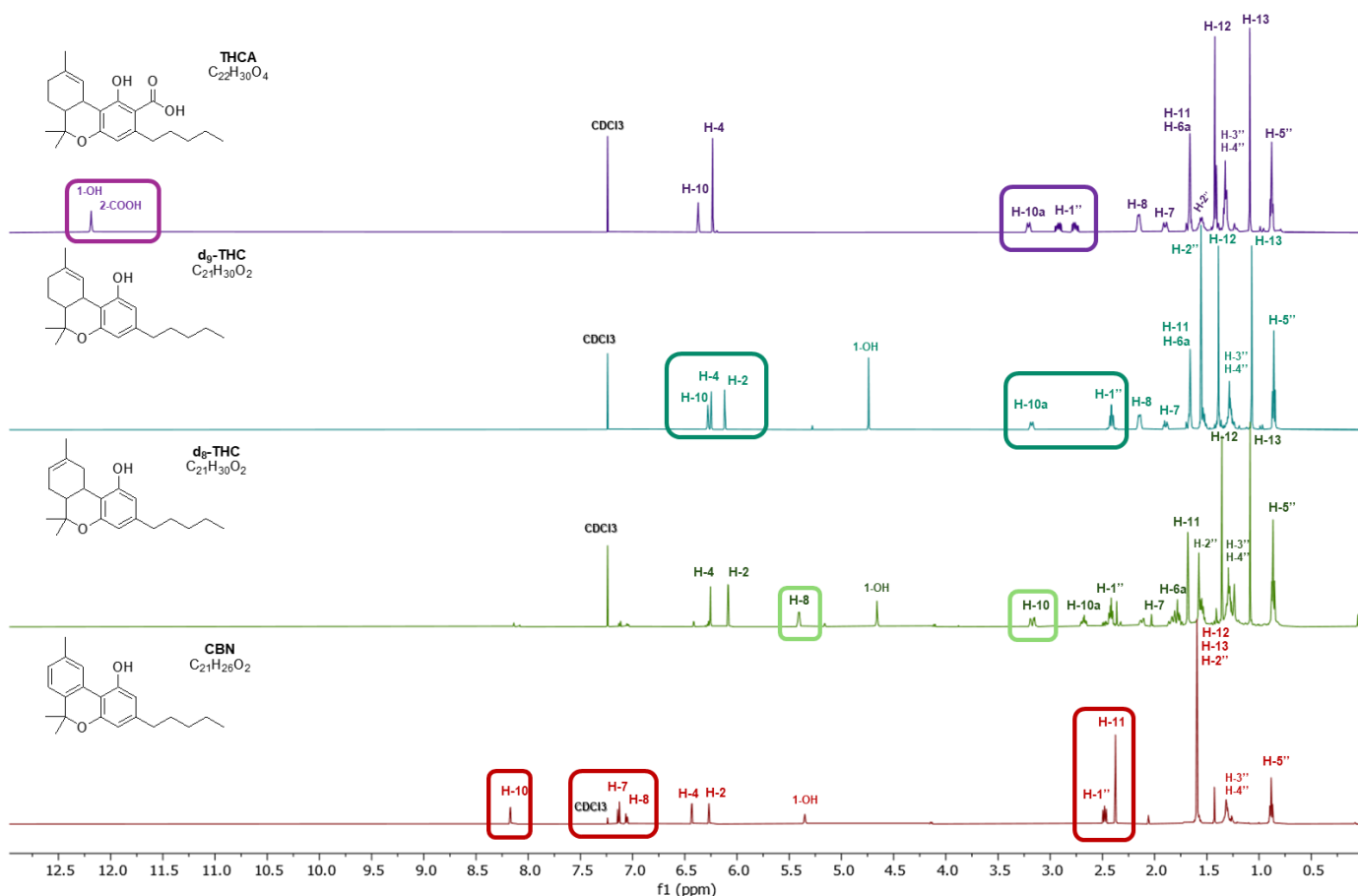


Figure 116 : Agrandissement du spectre RMN HSQC du CBN

Même si la molécule analysée CBN semble plus pure que le d8-THC, quelques impuretés (traces) ont été notées au sein des différents spectres RMN étudiés.

Après avoir déterminé la structure spécifique à chacun de ces cannabinoïdes, leurs spectres protons ont été comparés et superposés. Chacun des signaux a été identifié. Ces molécules ne diffèrent que par la présence d'un groupement acide ou de perte d'hydrogène, et des zones particulières sont ainsi observées. Ceci permettra de reconnaître plus rapidement les cannabinoïdes purifiés issus d'autres séparations et analysés par RMN sans avoir à réaliser des analyses plus poussées telles que l'HSQC, l'HMBC ou la COSY.



Le THCA possède une fonction acide carboxylique sur le C2 à proximité du OH en C1.

Figure 117 : Superposition des spectres RMN 1H des molécules de THCA, d9-THC, d8-THC et CBN identifiées

Cela se traduit par un signal déblindé à 12.19 ppm correspondant à une liaison H intramoléculaire entre la fonction alcool et le carbonyle de l'acide. Le signal du proton en C1'' est également plus déblindé (décalé vers la gauche) en raison de sa proximité avec le cycle aromatique et la liaison acide.

Le d9-THC possède un pic pour la présence d'un proton à 6.11 ppm sur le C2 en comparaison au THCA qui admet une fonction acide carboxylique à cette position.

Le d8-THC admet un signal du H en C10 à 3.17 ppm alors que c'est celui du C10a à cette même position pour le d9-THC. Et le H du C8 est également à 5.4 ppm contre 2.2 ppm dans le THC. On rappelle que le d8 et le d9-THC ne sont que des isomères de position. En effet, la double liaison se situe entre le C8 et le C9 pour le d8-THC et entre le C9 et C10 pour le d9-THC.



Le CBN quant à lui possède un deuxième cycle aromatique conjugué, ce qui réduit le nombre de signaux par rapport aux autres. Ainsi les signaux du H en C4 et en C2 sont plus élevés avec cette conjugaison (6.43 et 6.26 contre 6.25 et 6.08 ppm pour le d8-THC) ainsi que ceux des protons du C7, C8 et C10 ( $\geq 7$ ppm).

Le pic du solvant pour le spectre du CBN semble plus faible (à 7.24 ppm). Son intensité n'a pas changé et seule la concentration analysée de CBN est plus importante que les trois autres cannabinoïdes. Ceci traduit un spectre  $^1\text{H}$  à une échelle différente en intensité de signaux.

Cette comparaison permet ainsi de connaître l'origine des impuretés présentes dans nos échantillons analysés de d8-THC et CBN. Il est important de noter une difficulté à l'obtention des composés purs et d'autres méthodes que la LC, la MPLC ou que les plaques préparatives seraient à envisager (chromatographie semi-préparative ou CPC). Les impuretés dans le spectre  $^1\text{H}$  du D8-THC sont issues de la présence de traces de CBN car le pic du proton du méthyle en C9 et du H en C8 et C7 caractéristiques du CBN sont retrouvés respectivement à 2.38, 7.06 et 7.13 ppm.

Même si le CBN semble plus propre, de légères traces de d8-THC sont retrouvés dans son spectre  $^1\text{H}$ . Cette conclusion provient de l'observation des traces des signaux des protons du C7 et du C12 (à 2.12 et 1.35 ppm) présent uniquement dans le spectre du d8-THC.

## IV.2.4. Décarboxylations et réactions d'aromatisation oxydative

### IV.2.4.1. Cinétique de décarboxylation

Des essais préliminaires ont été réalisés afin de déterminer la température de décarboxylation des expériences. Les travaux de Moreno ont proposé des températures adéquates aux environs de 140 et 160°C (Moreno et al., 2020).

Cette étude a été réalisée sur un temps de 0 à 120 min et des températures comprises entre 80 et 160°C. Les réactions ont été programmées pour aller au-delà de 120 min et plus précisément jusqu'à 180 min de chauffage.

La réaction de décarboxylation induit par ce chauffage est présentée dans la figure 118 ci-dessous.

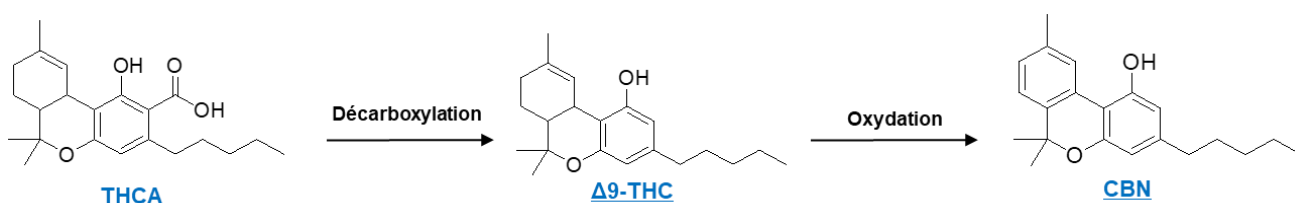


Figure 118 : Réaction de formation du CBN à partir du THCA

Un suivi de l'avancement de la réaction a été réalisé par prélèvement toutes les 30 min et dépôt sur plaque CCM.

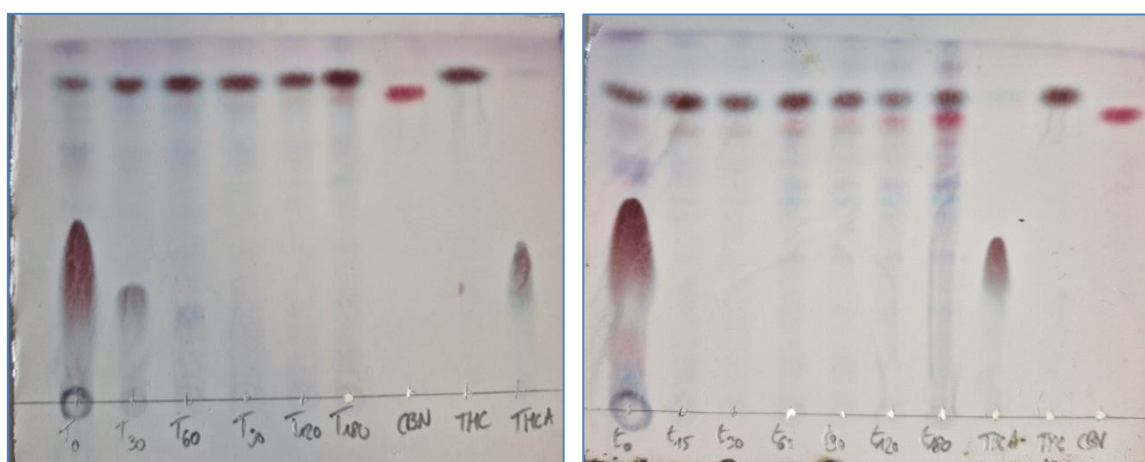


Figure 119 : Suivi par CCM de réactions de décarboxylation et formations de CBN et THC à 100°C (à gauche) et 150°C (à droite) éluées dans C/A 70/30

Ce contrôle a permis de constater la disparition totale de la forme acide (THCA) après un temps de réaction compris entre 60 et 90 min à 100°C. Pour une température de 150°C, le temps de réaction a été réduit à 15 min. Pendant cette décarboxylation, le THC a été formé. Il a aussi été observé une réaction d'oxydation du THC en CBN. Sur la plaque CCM, le cannabinoïde est révélé en couleur rosé et avec un R<sub>f</sub> plus faible que le THC. Plus la température et le temps de chauffage ont été élevés et plus la tâche observée et donc sa concentration étaient intenses. D'autres composés minoritaires ont également été formés après 180 min de réaction à 150°C (observation d'autres tâches violacées et verdâtres).

Un changement de texture de la résine a été observé avant et après son passage à l'étuve. La texture à l'origine résineuse/collante est devenue fluide et la coloration est passée de vert foncé à marron ambré.



Figure 120 : Observation de résines avant (gauche) et après (droite) passage à l'étuve à 150°C

Après ces premières observations, une quantification par LC-DAD pour les différentes températures a été effectuée et les résultats obtenus ont été analysés. Des prélèvements à  $t = 0, 15, 30, 60, 90, 120$  et  $180$  min de décarboxylation pour chacune des températures étudiées ont été réalisés. Le tableau de quantification (tableau 18) est présenté sous la forme de graphique où l'évolution de la concentration des quatre cannabinoïdes étudiés ont été exprimés en fonction du temps pour chacune des températures. Les molécules de CBD, CBDA et d8-THC n'ont pas pu être quantifiées en raison de concentrations trop faibles pour être suivies (quelques soit les températures ou le temps de décarboxylation appliqués).

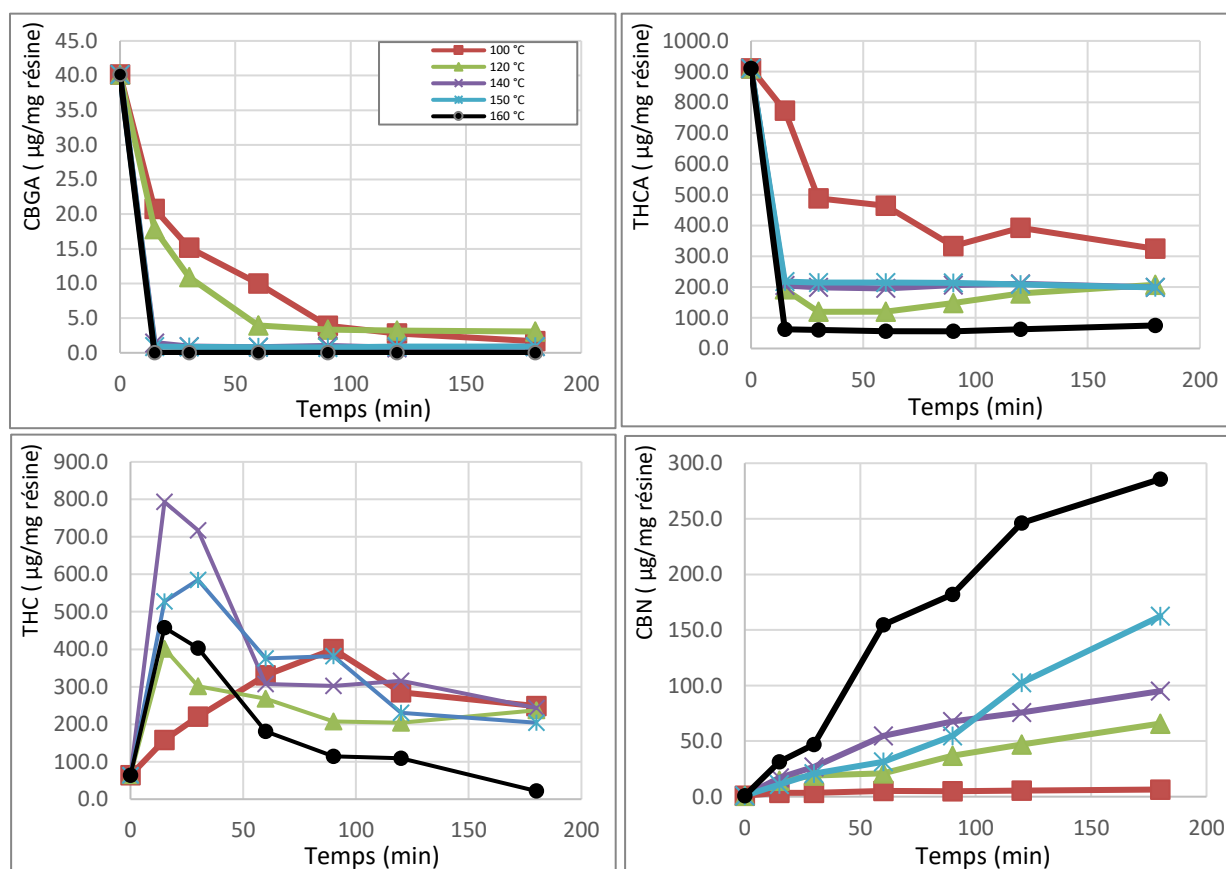


Figure 121 : Graphiques des suivis de décarboxylation des résines exprimant la concentration en métabolites en fonction du temps sur les différentes températures appliquées de 100 °C (rouge), 120 °C (vert), 140 °C (violet), 150 °C (bleu) et 160 °C (noir).

La concentration de CBGA est décroissante en fonction du temps en raison d'une décarboxylation en CBG avec la température. Le CBGA a été totalement transformé après 30 min pour des températures supérieures à 140°C. Beaucoup plus de temps a été nécessaire pour obtenir ces résultats à 100 et 120°C.

La concentration en THCA a également été réduite rapidement jusqu'à certains seuils suivants les températures. Plus la température est élevée et plus la décarboxylation en THC est conséquente et rapide. Trois paliers différents ont été observés après 180 min de décarboxylation : le premier à 324.1 µg THCA/mg d'extrait à 100°C, le deuxième à 198.6 µg THCA/mg d'extrait à 120, 140 et 150°C et un troisième inférieur à 75 µg THCA/mg d'extrait à 160°C.

Les courbes de concentrations en d9-THC se décomposent en deux parties distinctes quel que soit les températures appliquées. Une partie croissante due à la formation du THC par décarboxylation du THCA avec la température a été observée ainsi qu'une partie décroissante due à l'oxydation du THC présent initialement et/ou formé en CBN.

L'augmentation de la température a impacté de manière positive les pentes de ces deux parties et le temps de transformation du THCA au CBN est également réduit. C'est pour ces raisons qu'au temps de 15 min, 793 µg THCA/mg d'extrait à 140°C ont été retrouvés et seulement 457 µg THCA/mg d'extrait à 160°C.

Enfin, les concentrations en CBN ont évoluées proportionnellement à l'élévation de température et de temps de chauffage. Une température de 100°C n'a affecté que très légèrement cette concentration après 3 h (+ 5.5µg/mg). La température nécessaire à la réaction d'oxydation du THC en CBN était donc supérieur à ce point. Au contraire, en appliquant une température de 160°C, la formation a été plus conséquente sur une même durée (+274 mg).

Ces explications ont été vérifiées par le graphique suivant nous permettant d'observer la constante de cinétique de cette réaction (k) à l'aide du modèle simplifié de Moreno et al., 2020.

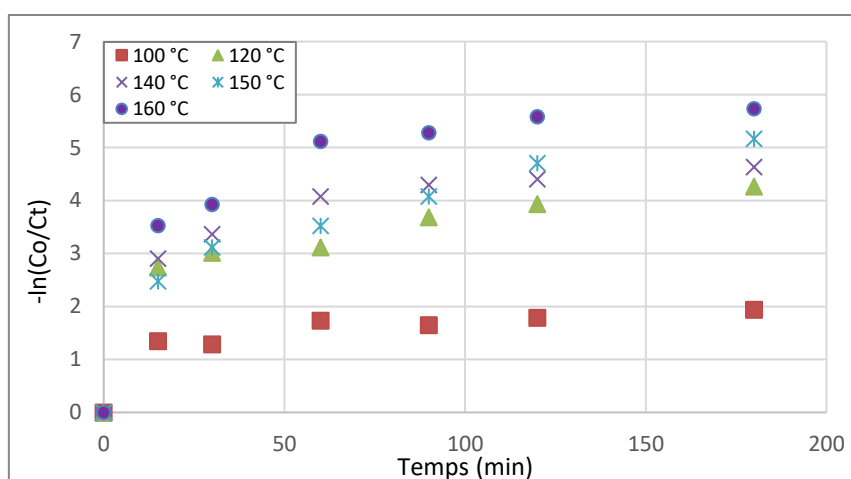


Figure 122 : Graphique de l'évolution de la constante de cinétique de la concentration en CBN au cours de la décarboxylation en exprimant  $-\ln(Co/Ct)$  en fonction du temps

Les trois paliers observés précédemment ont été retrouvés à travers cette représentation graphique de la cinétique : le premier à 100°C, le second de 120 à 150°C et le troisième à 160°C. La température de 100°C a admis la plus faible constante de formation du CBN au cours du temps alors que la température de 160°C a obtenu la plus forte. La pente

étudiée entre les différents points était la plus élevée entre 0 et 15 min, puis a été réduite progressivement entre 15 et 30 min et a été stabilisée après 60 et 90 min.

La conclusion de cette expérience a donc été le choix d'une température de décarboxylation à 160°C pour la suite du travail afin de maximiser la concentration en CBN accessible sans avoir le besoin de réaliser d'autres réactions ou manipulations.

#### IV.2.4.2. Réactions de décarboxylation oxydative (du THCA en CBN)

Pour obtenir du cannabinoïde, deux méthodes différentes ont été comparées : la décarboxylation oxydative sur une durée de 3 h à 160°C à l'étuve et l'hémi-synthèse du THC en CBN par l'utilisation de I<sub>2</sub> avec un prétraitement de 30 min à l'étuve à 160°C.

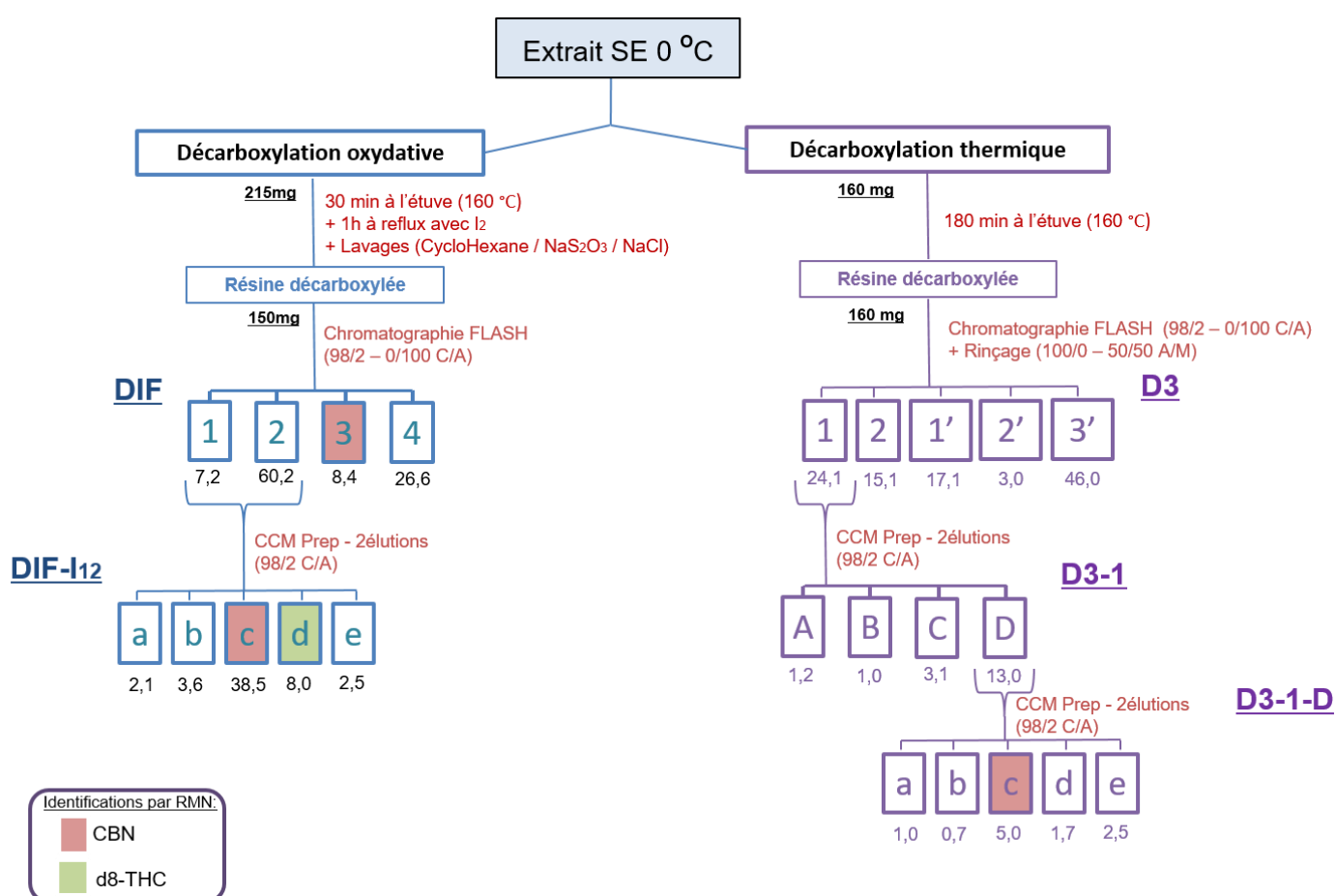


Figure 123 : Schéma récapitulatif général des étapes de décarboxylations et séparations à partir d'un extrait de cannabis.

Pour la décarboxylation de la résine concentrée par chauffage à l'étuve pendant une durée 3 h, des prélèvements ont été réalisés afin de vérifier la formation de cannabinoïde et la disparition totale de THCA ou THC.

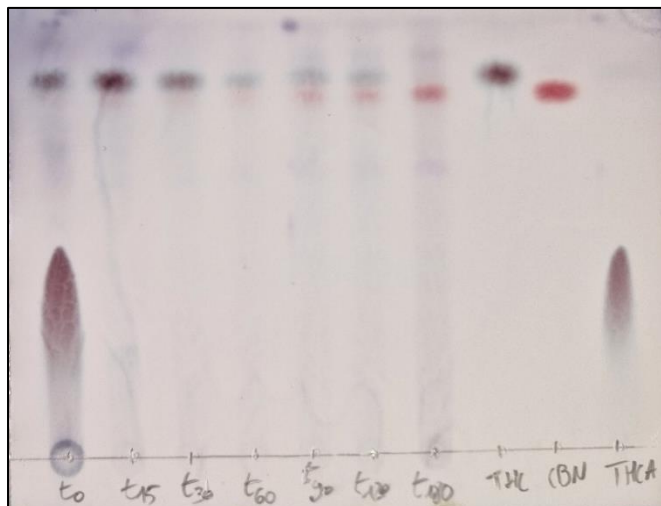


Figure 124 : CCM Suivi de la décarboxylation à 160 °C dans C/A 70/30

Le suivi de l'avancement de la réaction montre la transformation rapide de THCA et celle progressive THC ainsi que l'apparition du CBN. Il a été observé la formation de plusieurs autres composés minoritaires. Une trainée s'étalant jusqu'au front de migration depuis le point de dépôt a été constaté à t=180 min.

Une purification de 160 mg par chromatographie flash (MPLC) a ensuite été réalisée et deux fractions D3-1 et 2 ont été obtenues. Cependant cette étape a été rallongée en augmentant la polarité la phase mobile (avec MeOH) pour éluer la résine résiduelle dans la colonne. Ainsi, 3 fractions supplémentaires notées D3-1' ; 2' et 3' sont obtenues (tableau 15). La CCM ci-dessous a permis de constater que la majorité du cannabinoïde est retrouvée dans la première fraction de de 24.1 mg.

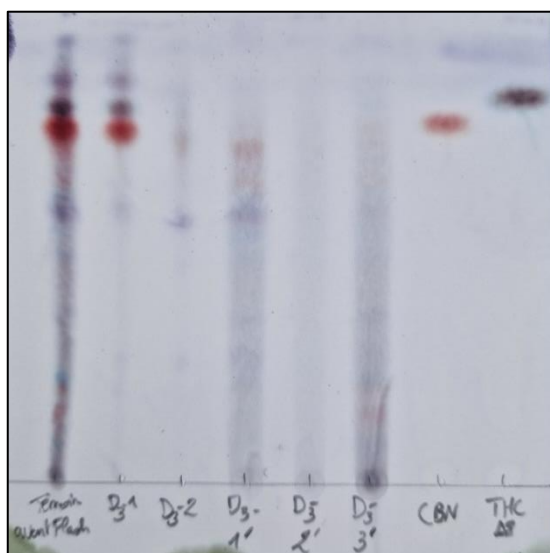


Figure 125 : CCM récapitulative dans C/A 70/30 après obtention des fractions D3-1 à D3-3' par chromatographie flash

Les autres fractions contenaient des produits de dégradations qui pourront être déterminés dans les perspectives de cette étude.

Une purification par CCM préparative (24.1 mg) nous a semblé plus efficace pour séparer ces produits ayant des Rf proches. Une double élution a permis d'augmenter la distance de migration et donc d'écarter des composés. Quatre fractions issues de la plaque ont récupérées et déposées sur CCM (tableau 16).

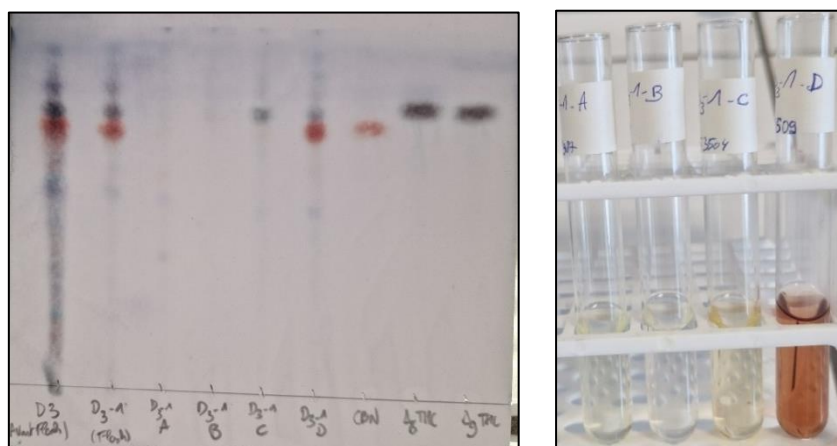


Figure 126 : CCM des fractions issues de la séparation de D3-1 sur plaque préparative et éluées dans C/A 70/30 (gauche) et photographies des fractions en solution (droite)

Le CBN a été coélué dans la fraction D3-1-D avec un autre cannabinoïde de couleur bleu-vert malgré l'utilisation de la plaque préparative et d'une double élution. On peut supposer que ce composé possède une structure proche du d8-THC ou d9-THC avec le Rf et une coloration similaire.

La fraction D3-1-D de masse 13 mg a de nouveau été déposée sur une plaque préparative et le même protocole a été appliqué. L'objectif a été d'obtenir un produit pur et vérifier sa structure en RMN.

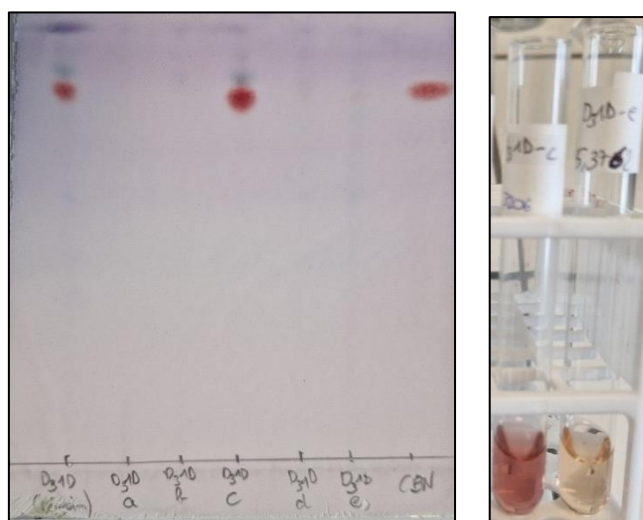


Figure 127 : CCM des fractions issues de la séparation de D3-1-D sur plaque préparative et éluées dans 70/30 C/A (gauche) et photographies des fractions D3-1-D-c et D3-1-D-e en solution

Parmi les cinq sous-fractions obtenues (tableau 17), seule la fraction « c » avec une masse de 5 mg contenait la tâche spécifique du CBN.

En conclusion, pour une masse de résine concentrée de 160 mg, une faible quantité de cannabinoïde (5 mg) a été obtenu.



La deuxième décarboxylation oxydative constituait en une réaction d'hémisynthèse par I<sub>2</sub> selon Pollastro. Le choix a été de se diriger vers une réaction avec un halogène afin de tenter d'augmenter les rendements en cannabinoï. (Pollastro et al., 2018)

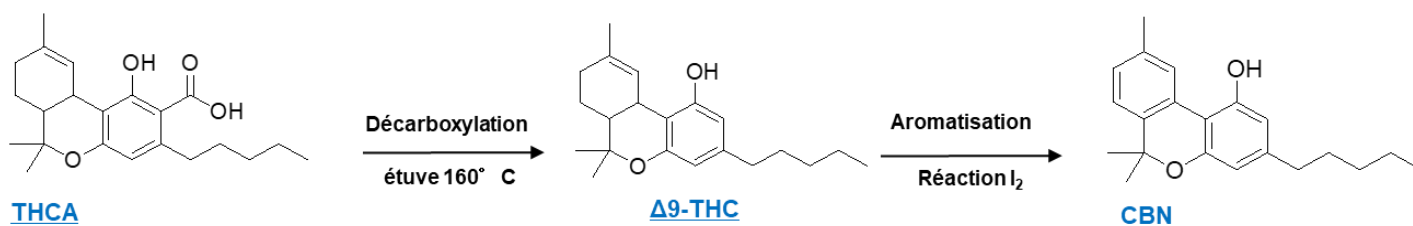


Figure 128 : Réaction d'hémisynthèse du CBN à partir du THCA

Après le prétraitement de 30 min à 160°C en étuve, la résine (215 mg) traitée à l'iode dans du toluène. Un suivi de la réaction sur plaque CCM avec un prélèvement toutes les 10 min a été réalisé.

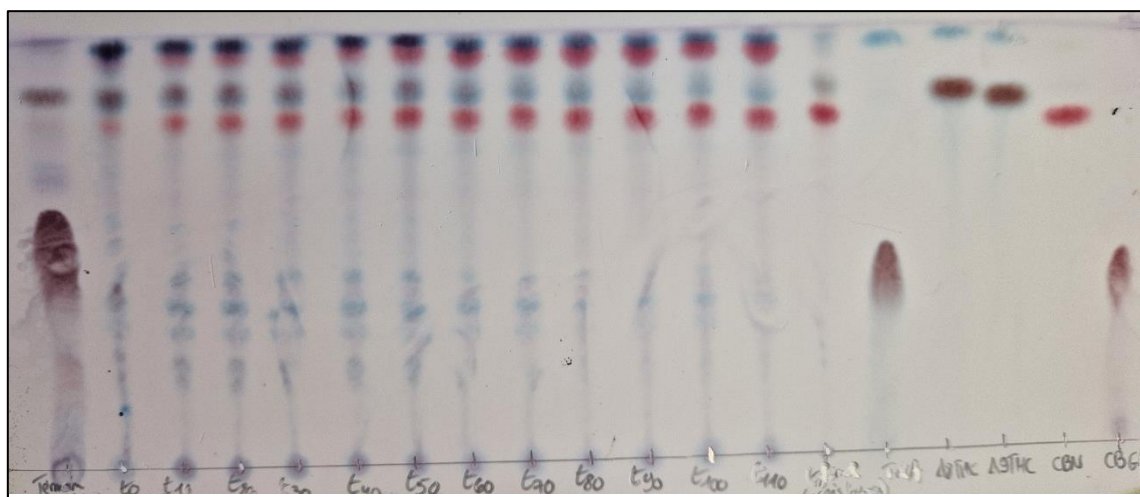


Figure 129 : CCM du suivi de la réaction de décarboxylation oxydative avec I<sub>2</sub> dans C/A 70/30

Au temps t<sub>0</sub>, à la sortie de 30 min à l'étuve, la totalité du THCA a été transformé en THC et en CBN. La réaction a été réalisée pendant 110 minutes jusqu'à la disparition de la tâche de THC (brun-vert foncé sur cette plaque).

Quatre tâches distinctes ont été observées : celle du CBN, celle du THC (d8 ou d9) mais également deux autres tâches de la même coloration avec un R<sub>f</sub> plus élevé. Elles pourraient correspondre à des intermédiaires de la réaction de décarboxylation oxydative ou bien à des composés secondaires de dégradations non attendus. Le spot situé après t= 110 min provenait de la solution obtenue après les trois extractions liquide-liquide de lavages. Seulement deux tâches ont été conservées : celle du CBN et du THC. Les autres ont été éliminées lors des lavages successifs.



Une purification par MPLC sur 150 mg de mélange a été effectuée en une seule étape avec une phase mobile de C/A (de 95/5 à 0/100). Quatre fractions ont été obtenues notées DIF-1 à DIF-4 (tableau 13). La fraction DIF-3 (8.4 mg) étant pure a été analysée directement en RMN. La structure du cannabinoïde a été ainsi validée.

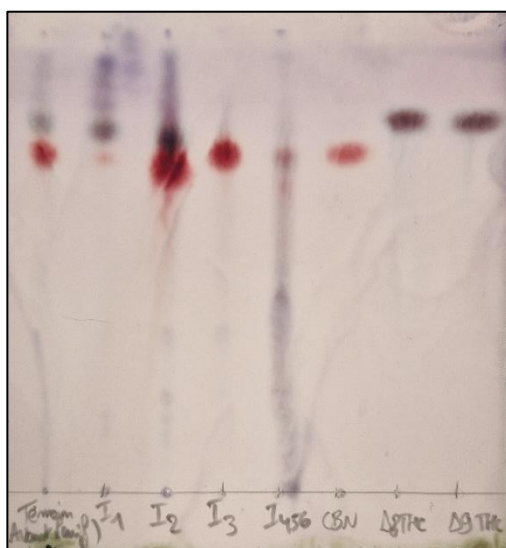


Figure 130 : CCM des fractions issues de la séparation de DIF par chromatographie flash et élué dans C/A 70/30

Les fractions DIF-1 et 2 ont été regroupées (67.4 mg) (notée DIF-12) puis purifiées par CCM préparative (tableau 14). Le profil de migration a été présenté sur les photographies de plaques ci-dessous. Le CBN est visible sous UV à 254 nm grâce à la conjugaison entre ces deux cycles aromatiques, contrairement au THC et THCA.

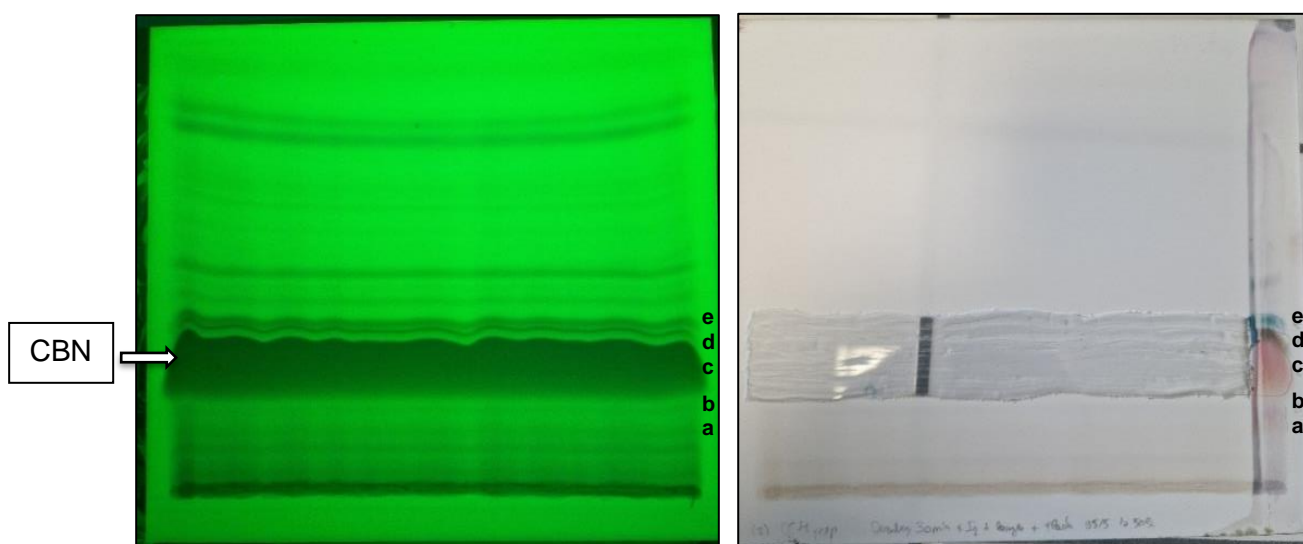


Figure 131 : Plaque préparative de DIF-12 après double élution 95/5 C/A et révélations sous UV à 254nm (gauche) et à l'ANS (droite)

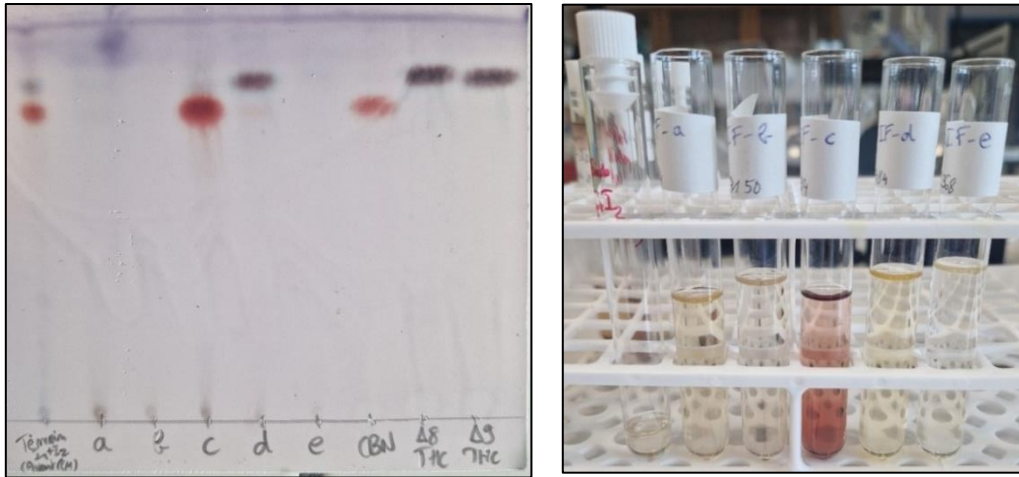


Figure 132 : CCM des fractions issues de la séparation de DIF-12 sur plaque préparative et éluées dans C/A 70/30 (gauche) et photographies des fractions en solution (droite)

Le CBN a été identifié dans la fraction DIF-1<sub>2</sub>-c (38.5 mg) et sa structure confirmée par RMN. La fraction DIF-1<sub>2</sub>-d (8.0 mg) a été identifiée comme le d8-THC après analyses RMN. La fraction DIF-1<sub>2</sub>-e (2.5mg) est un mélange contenant du CBN, du d8-THC et d'autres cannabinoïdes non déterminés.

Le rendement de l'hémisynthèse par I<sub>2</sub> est de 43 % avec 46.9 mg de CBN obtenus contre une masse théorique de 85.3 mg.

En conclusion de ce choix de décarboxylation (30 min prétraitement étuve + 110 min de réaction avec diiode) a permis d'obtenir une masse finale de cannabinoïde d'une pureté supérieure à la technique utilisant seulement l'étuve (de 180 min). En effet, 46.5 mg ont été récupéré par hémisynthèse contre 5 mg par chauffage prolongé soit un rendement de transformation de résine de 21.8% contre 3.1%.

## IV.2.5. Optimisation et études statistiques

### IV.2.5.1. Désirabilité

Afin d'obtenir la désirabilité globale, il a été choisi une importance et une note à chacun des paramètres suivant nos désirs. Une importance forte (note=3) a été appliquée pour les valeurs à maximiser de TPC et rendements massiques, ainsi que pour la valeur à minimiser de TCC.

Une importance moyenne (note=2) a été choisie pour la TFC jugée secondaire par rapport aux autres. Enfin, toutes les autres valeurs comme les écart-types ont été plus faiblement (note=1). Ce choix était purement arbitraire et pourrait changer à tout moment, impactant évidemment tous les résultats statistiques présentés.

Ces notes ont été traduites en un poids avant de réaliser le calcul de désirabilité pondérée (tableau 28), de désirabilité globale et du classement par probabilité (tableau 29).

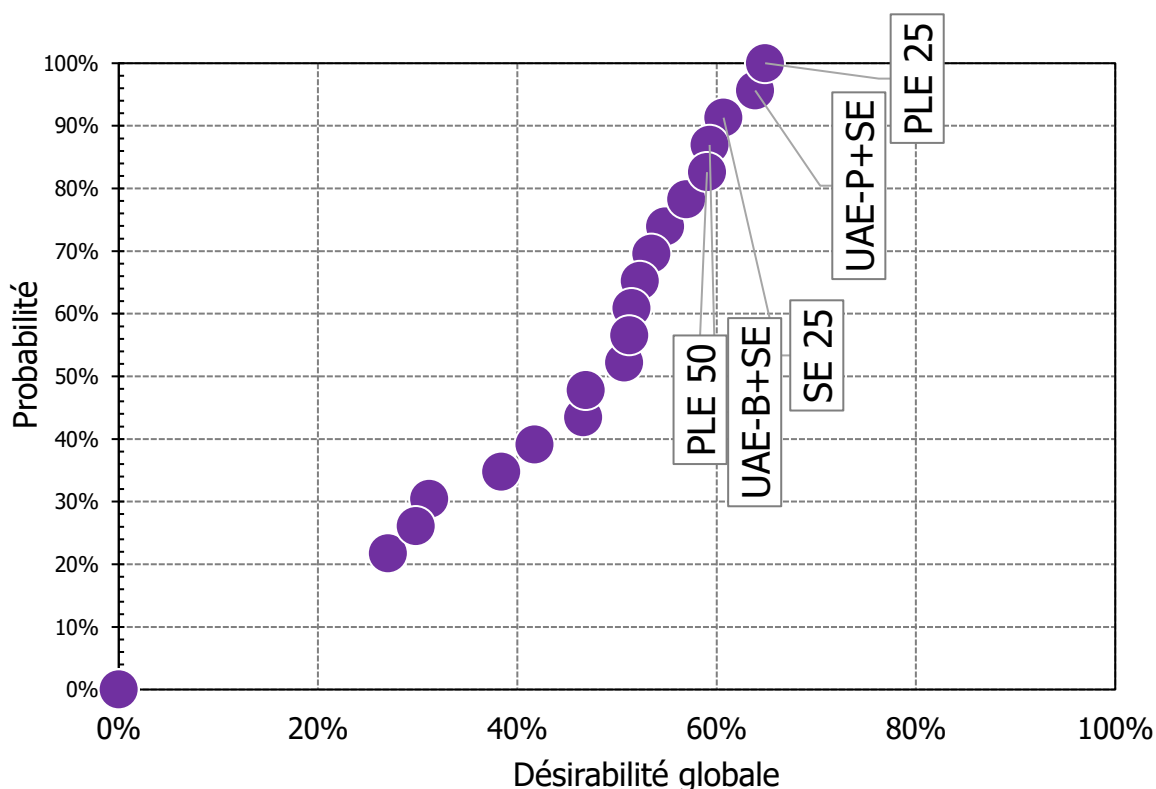


Figure 133 : Comparaison des traitements expérimentaux d'après leurs désirabilités globales obtenus pour les extraits de fleurs de THC

Les 24 extraits ont été ainsi classés sur le critère de la désirabilité globale et de leurs probabilités. Les cinq meilleures extractions ont été obtenus sur le critère des TPC, TFC, TCC, pouvoir antioxydant et les rendements massiques.

La meilleure technique d'après ces critères était ainsi PLE25 avec 64.9% de DG, suivi par UAE-P+SE (15 min) à 63.9%, SE25 EtOH à 60.7%, 15 min UAE-B+SE à 59.3% et PLE50 à 59.0% de DG. L'effet de la pression (100bars) couplé à une température ambiante au sein de l'appareil ASE Dionex semblait être la meilleure solution.

Les extractions qui ont admis 0% de désirabilité globale (SE25 H<sub>2</sub>O, SE50 H<sub>2</sub>O, Successive, Soxhlet et MAE75-15 min) n'ont pas été forcément inefficaces. Cela est dû aux paramètres qui ont été imposés (de maximiser ou minimiser) et avec leurs valeurs extrêmes (des minimums ou maximums), le calcul de leurs désirabilités a donné la valeur zéro et donc le produit des désirabilités a également donné une valeur nulle.

L'UAE-P+SE (15 min) présente une désirabilité globale équivalente à PLE à 25°C, cette technique s'avère plus simple à transférer à l'échelle industrielle. Suivant les quantités à traiter et la situation financière de l'industrie, le choix s'orientera vers PLE (avec EtOH).

#### IV.2.5.2. Méthode TOPSIS

Tenant compte de ce résultat, un plan d'expérience a été proposé. L'UAE-P+SE a été réalisé en réacteur double enveloppe, pour une durée comprise entre 60 et 120 min, un traitement aux ultrasons entre 0 et 30 min, d'une vitesse d'agitation entre 50 et 250 rpm (agitation faible à forte) et d'une température de milieu entre -30 et 30°C.

Tableau 42 : Matrice de 4 facteurs à 3 niveaux traduit avec nos paramètres à étudier

	Température (°C)	Vitesse agitation (rpm)	Temps Ultrasons (min)	Temps extraction (min)
T01	0	250	0	60
T02	0	50	30	120
T03	-30	150	0	120
T04	30	150	30	60
T05	-30	50	15	60
T06	30	250	15	120
T07	-30	250	30	90
T08	30	50	0	90
T09	0	150	15	90

La méthode TOPSIS de classement préliminaire a été utilisée avant de s'intéresser à l'étude des effets principaux du DSD. L'ensemble des neuf extractions imposées par la matrice du plan d'expérience (traitements T01 à T09) a été réalisé et les données obtenues sont présentées ci-dessous.

Celles-ci seront utilisées pour l'ensemble des analyses statistiques (méthode TOPSIS et DSD).

Tableau 43 : Résultats des neuf traitements expérimentaux réalisés en bioréacteur pour chacun des réponses étudiées

	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9
Traitements	Rendement massique (%)	TPC (mg GAE/g DM)	TFC (mg QuE/g DM)	TCC (mg /g MS)	DPPH (mg TE/g DM)	[THCA] (µg/mg)	[THC] (µg/mg)	[CBN] (µg/mg)	[CBD] (µg/mg)
T01	22.44	51.47	3.13	54.75	6.38	630.75	47.56	0.69	0.04
T02	19.42	41.64	3.12	81.50	5.45	572.00	55.40	0.79	0.05
T03	21.52	39.25	7.68	37.45	6.07	532.32	47.90	0.65	0.05
T04	23.31	60.95	9.79	221.51	7.27	486.35	61.85	0.78	0.06
T05	21.74	45.11	7.45	46.95	6.34	561.69	50.51	0.55	0.05
T06	22.94	52.37	8.51	210.71	6.82	429.67	60.58	0.90	0.06
T07	22.69	48.97	6.99	97.72	6.26	466.25	55.35	0.73	0.06
T08	23.50	57.38	5.59	131.78	6.97	457.11	52.11	0.79	0.05
T09	25.48	52.78	4.27	129.38	7.56	457.67	51.26	0.59	0.06

Il a été observé pour ces 9 traitements une variation des rendements massiques entre 19.4 et 25.5 %, des TPC entre 39.2 et 60.9 mg GAE/g DM, des TFC entre 3.1 et 9.8 mg QuE/g DM, des TCC entre 37.5 et 221.5 mg/g DM, le test DPPH entre 5.5 et 7.6 mg TE/g DM.

De plus la quantification en cannabinoïdes a montré une présence majoritaire de forme acide, THCA entre 42.9 et 63% (soit 429 à 630 mg/g MS) et une présence secondaire de THC à hauteur de 4.7 à 6.1% (47 à 61 mg/g ms). Les autres cannabinoïdes sont présents en très faibles quantités ou à l'état de « traces ».

L'importance des réponses ont été de cinq niveaux différents (Très faible, faible, moyenne, forte et très forte) avec leurs notes respectives (1, 3, 5, 7 et 9). Plus leurs importances et donc leurs notes sont élevées et plus leurs poids ont un impact sur la valeur de la réponse étudiée.

Les pondérations suivantes : le rendement massique d'extraction a le poids le plus important (note = 9), suivi par les concentrations en THCA, THC et CBN (note = 7), puis la TCC (note = 5), puis la concentration en CBD et le pouvoir antioxydant (note = 3) et enfin le TPC et TFC (note =1).

Cette pondération (coefficient) a été différencié des objectifs pour maximiser une valeur ou la minimiser. Seul le TCC était à minimiser pour éviter de compliquer les étapes de purification.

Les valeurs S+, S- (à partir de V+, V-) et leurs scores respectifs ont été calculés avant de déterminer les trois meilleurs scores obtenus parmi l'ensemble des traitements réalisés.

	Score
T01	65.1%
T02	63.8%
T03	61.9%
T04	36.7%
T05	58.4%
T06	40.9%
T07	55.9%
T08	48.8%
T09	42.4%

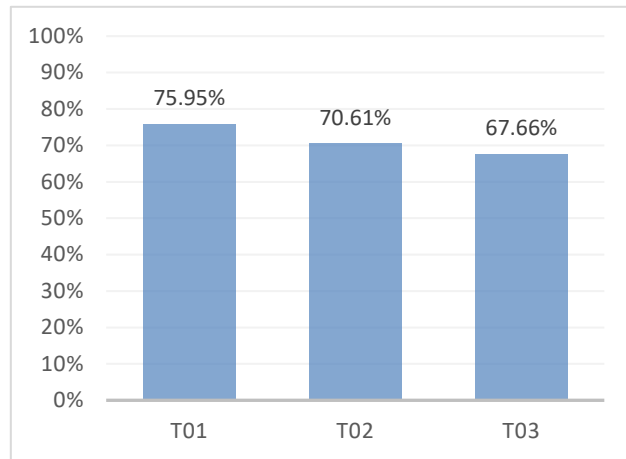


Figure 134 : Tableau et graphique des scores pour les données de traitements T01 à T09 pondérées issus d'extractions de cannabis en bioréacteur

A l'aide de la méthode TOPSIS réalisée, les trois meilleurs traitements parmi les 9 étaient : T01, T02 et T03 avec un score de 65.1, 63.8 et 61.9%, respectivement. T01 a été réalisé à 0°C, 60 min macération à 250 d'agitation ; T02 à 0°C, 30min US + 120min macération à 50 d'agitation ; et enfin T03 à -30°C, 120 min macération à 150 d'agitation.

En fonction de paramètres fixés, la température de 0°C s'avère un compromis pour extraire le plus de composés d'intérêts tout en ayant un minimum de chlorophylles.

Le score le plus faible est obtenu pour T04 avec 37%. Avec l'augmentation de la température, de l'agitation et du temps d'ultrasons et d'extraction, plus la TCC augmente dans l'extrait et plus son score sera faible.

Dans le cas hypothétique où aucune distinction particulière entre les différentes réponses aurait été appliqué (donc aucun poids), les scores obtenus seraient totalement différents.

	Score
T01	54.2%
T02	49.1%
T03	67.1%
T04	46.4%
T05	66.4%
T06	43.6%
T07	60.3%
T08	48.1%
T09	43.7%

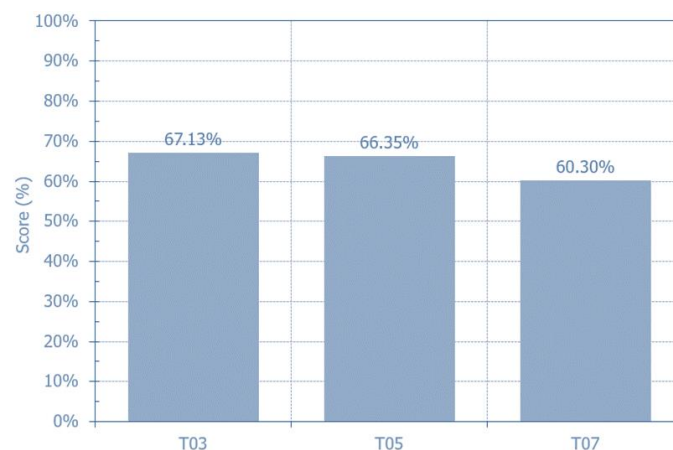


Figure 135 : Tableau et graphique des scores pour les données de traitements T01 à T09 non pondérées issus d'extractions de cannabis en bioréacteur

En appliquant la même importance, les trois meilleurs traitements ont été T03, T05 et T07 avec de score respectif de 67,1, 66.4 et 60.3%. Dans les 3 cas, l'extraction a été effectuée à -30 °C. Cette température négative a un impact non négligeable sur les molécules extraites et en particulier le THCA. Les rendements massiques de T03, 05 et 07 ont été influencé par leurs faibles concentrations en cannabinoïdes. Ce qui explique la raison pour laquelle ces trois traitements n'apparaissaient pas dans la première analyse TOPSIS avec pondérations.

Des échanges avec des ingénieurs spécialisés dans les extractions en industrie de chez LGP (entreprise pharmaceutique australienne fournissant les fleurs) préconisaient l'utilisation de -50 °C. A l'aide du bioréacteur double enveloppe et du réfrigérant disponible à l'échelle du laboratoire, seule la température de -30 °C a pu être atteinte.

La méthode TOPSIS permet de dégrossir les résultats obtenus sur les différents traitements et une température proche de zéro ou négative soit le facteur le plus impactant dans les réponses obtenues.

A la suite de toutes ces données obtenues et traitées, une synthèse a pu être réalisée.

Tableau 44 : Récapitulatif des objectifs, importances et des meilleurs et mauvais traitements pour chacun des réponses du DSD sur l'extraction en bioréacteur (ND = Non déterminé)

	<i>Objectif</i>	<i>Importance</i>	<i>Meilleur traitement</i>	<i>Mauvais traitement</i>
<i>Rendement massique (%)</i>	Max	5	T09	T02
<i>TPC (mg GAE/g DM)</i>	Max	1	T04	T03
<i>TFC (mg QuE/g DM)</i>	Max	1	T04	T02
<i>TCC (mg /g DM)</i>	Min	3	T03	T04
<i>Antioxydant (mg TE/ DM)</i>	Max	2	T09	T02
<i>[THCA] (µg/mg)</i>	Max	5	T01	T06
<i>[THC] (µg/mg)</i>	Max	5	T04	T03
<i>[CBN] (µg/mg)</i>	Max	5	T06	T05
<i>[CBD] (µg/mg)</i>	Min	2	T01	N.D.

Ce premier tableau a résumé les meilleurs et mauvais traitements après un simple classement par fonction de répartition. Il a permis de dégrossir les résultats et de constater s'il y a déjà des manipulations intéressants et identiques pour plusieurs réponses. T04 a été placé en tant que meilleur traitement sur 3 des 9 réponses (TPC, TFC et [THC]). Néanmoins, six autres réponses avec des traitements différents que T04 se sont aussi révélés comme étant parmi les meilleurs solutions et donc comme des extractions efficaces. Ce qui démontre qu'un classement seul pas n'est suffisant, l'étude des effets principaux s'est avérée nécessaire.

### IV.2.5.3. Plan d'expérience (DSD) et effets principaux

Les tracés d'effets principaux issus des neuf traitements ont été donc réalisés et analysés pour chaque réponse.

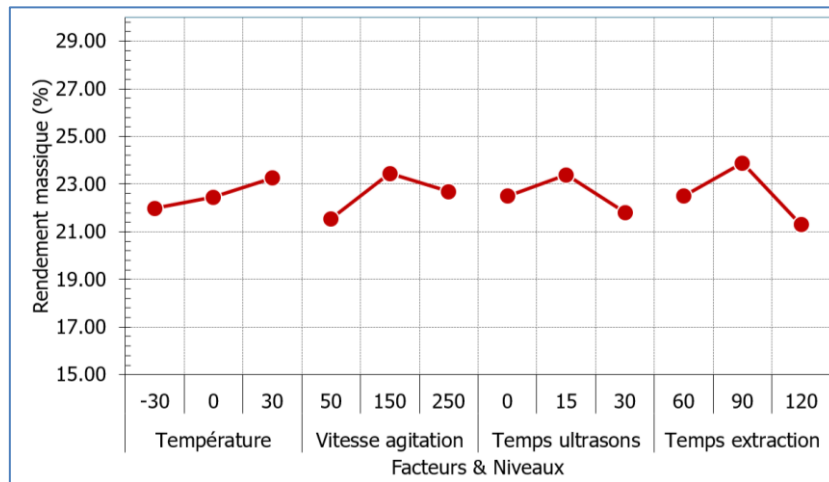


Figure 136 : Tracés des effets principaux du plan d'expérience exprimant les rendements massiques en fonction des différents facteurs et niveaux

Ce tracé a permis de déduire le traitement opératoire optimal à 30 °C, 15 min UAE-P+ 90 min SE et une agitation de 150 rpm pour la réponse de rendement massique.

La température a une influence positive sur le rendement massique. Les trois autres facteurs (vitesse, temps et ultrasons) ont semblé avoir un optimum au niveau 0 de chacun des facteurs. Autrement dit, un excès d'action mécanique et physique (agitation, ultrasons, temps de contact) sur la matrice végétale induit une baisse du rendement (potentielle dégradation des métabolites extraits).

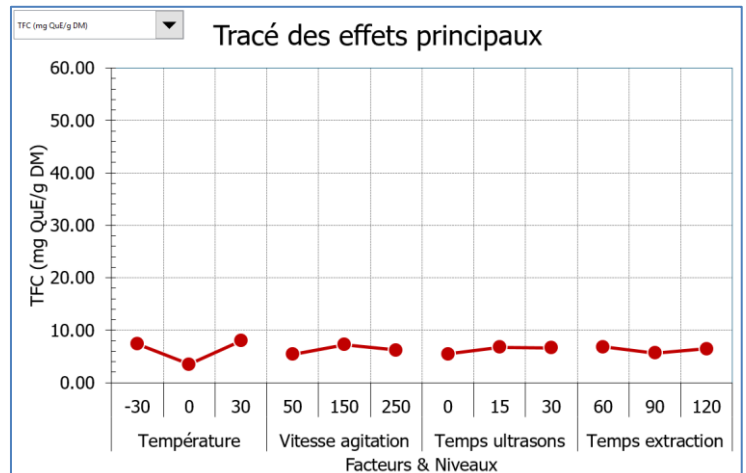
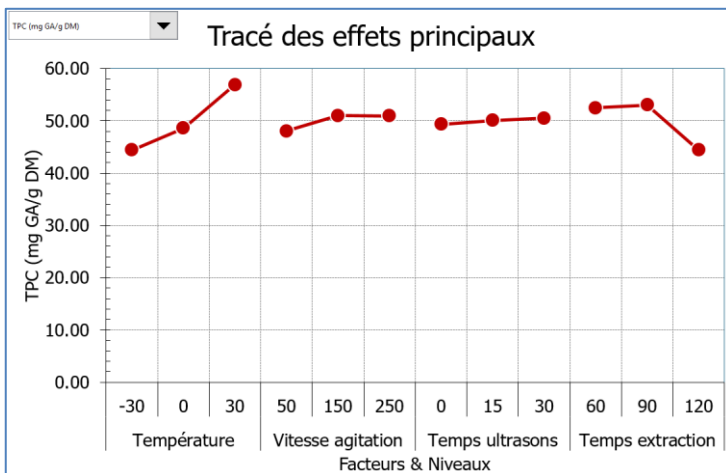


Figure 137 : Tracés des effets principaux du plan d'expérience exprimant TPC (à gauche) et TFC (à droite) en fonction des différents facteurs et niveaux

Pour la TPC maximale, les conditions optimales déduites sont: 30 °C, 30 min UAE-P + 90 min macération à 150 rpm. La température et le temps d'extraction s'avèrent être les deux facteurs les plus influents sur la TPC par rapport aux deux autres facteurs étudiés de ce DSD.



Pour la TFC maximale, le traitement optimal est le suivant : 30 °C, 15 min UAE-P + 60 min SE pour une agitation de 150 rpm. Hormis le point de température à 0°C semblant être particulier, l'ensemble des différents niveaux des facteurs n'ont pas eu d'effets sur cette teneur. Il a été estimé qu'une variation de 1 à 2 mg d'équivalents de quercétine n'est pas assez conséquente.

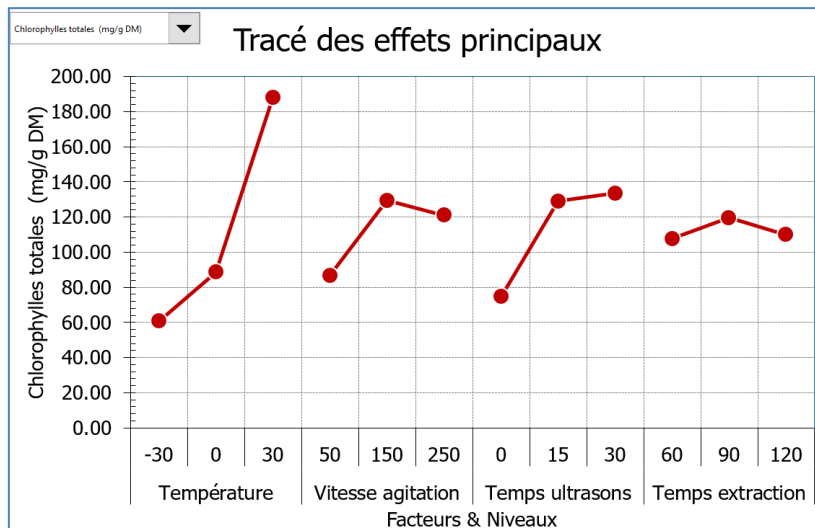


Figure 138 : Tracés des effets principaux du plan d'expérience exprimant la TCC en fonction des différents facteurs

Pour la TCC, l'objectif étant de minimiser sa quantité, le traitement minimal a été le plus intéressant avec comme paramètres : -30 °C, 30 min UAE-P + 60 min SE pour une agitation de 50 rpm. En dehors du temps d'extraction, chaque facteur étudié a un impact conséquent sur l'obtention de la chlorophylle, que ce soit, la température, l'agitation ou l'utilisation d'ultrasons. Une variation importante de la TCC est observée avec l'augmentation de la température (+128 mg/g DM entre -30 et +30°C).

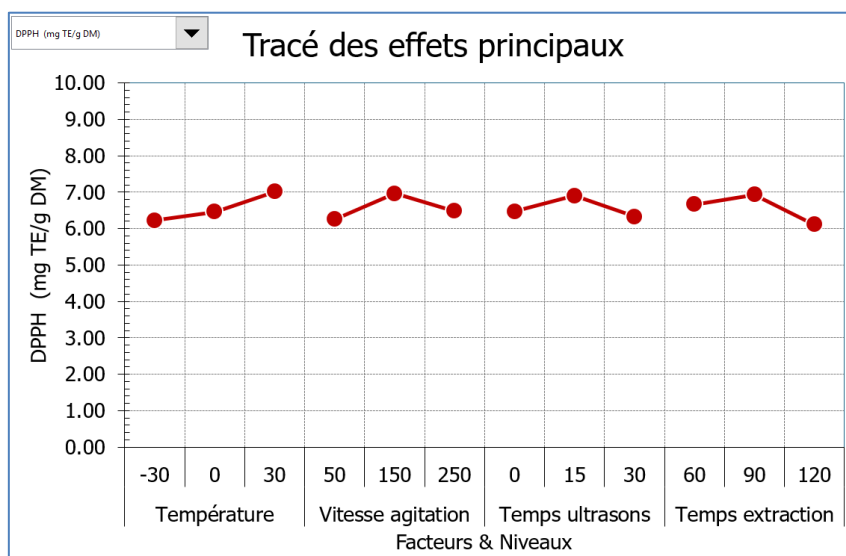


Figure 139 : Tracés des effets principaux du plan d'expérience exprimant le teneur antioxydant en fonction des différents facteurs

Le traitement optimal déduit pour la teneur en antioxydant est 30 °C, 15 min UAE-P + 90 min SE à 150 rpm. Un effet légèrement positif de la température a été constaté entre -30 et 30 °C. Néanmoins, la différence entre l'ensemble des moyennes de ces effets principaux n'était que très faible (inférieur à 1 mg TE/g DM). Tout comme les flavonoïdes totaux, cette réponse n'a pas été la plus déterminante sur le choix du traitement final qui sera développé par la suite.

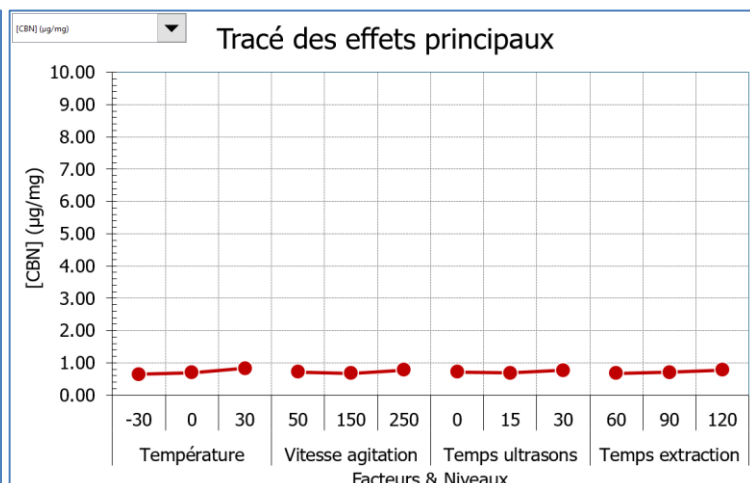
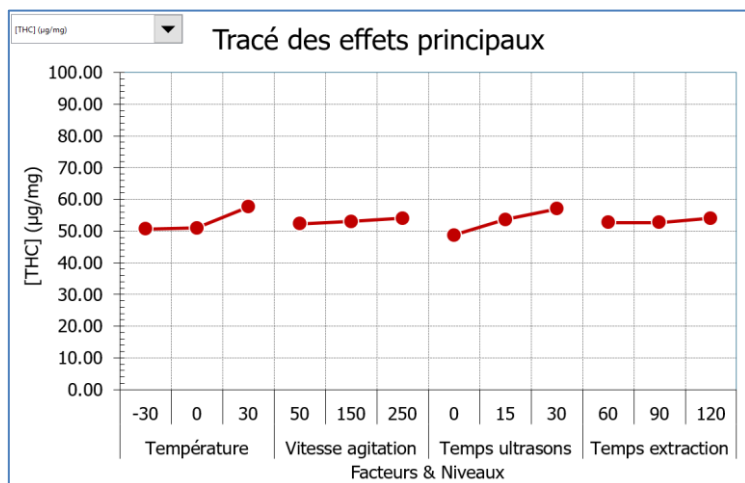
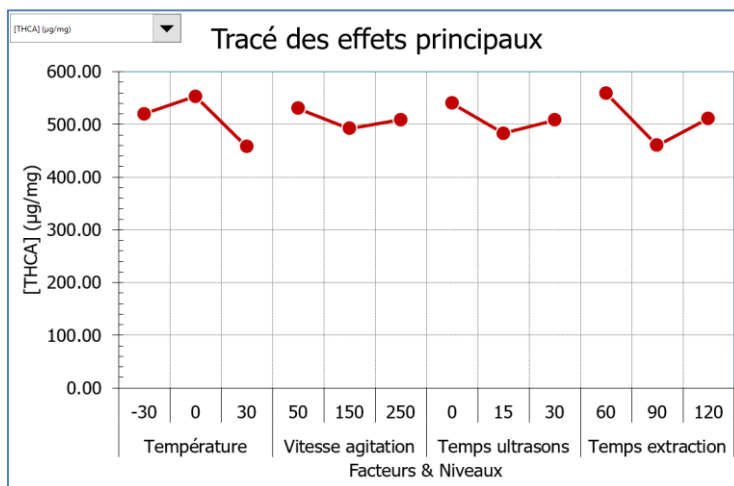


Figure 140 : Tracés des effets principaux du plan d'expérience exprimant les concentrations en THCA (en haut), en THC (en bas à gauche) et en CBN (en bas à droite) en fonction des différents facteurs et niveaux

Le traitement optimal concernant la concentration en THCA est : 0 °C, 60 min SE à 50 rpm. La différence pour le facteur de la température entre 0 et -30 °C était observable d'une concentration de plus de 30 mg/g. Une température proche de zéro ou négative est donc favorable à l'extraction d'un maximum de cannabinoïdes sous forme acide. Ceci est valide si chacun des autres paramètres mécaniques (agitation, ultrasons ou de temps de contact avec le solvant) sont minimisés.

L'étude de la concentration en THC a permis d'obtenir des conditions optimales avec 30 °C, 30 min UAE-P + 120 min SE à 250 rpm. Il a été constaté une augmentation de sa concentration avec celle des contraintes physiques (températures et temps d'ultrasons) dans ce plan d'expérience. En comparaison à ces deux facteurs, la vitesse d'agitation et le temps de contact avec le solvant ont peu d'influence sur la concentration en THC.

Pour la concentration en CBN, le traitement optimal comme se situe à tous les niveaux maximums des facteurs étudiés c'est à dire 30 °C, 30 min UAE-P + 120 min SE à 250 rpm. Comme le CBN est la molécule de dégradation du THCA et THC, cette transformation nécessite de l'énergie et des températures élevées (au-delà de 100°C). Ces conditions « optimales » sont tout de même à prendre avec un peu de recul car sur un extrait de résine de 1000 mg, seulement 0.6 à 0.8 mg en CBN (à peine 0.1% de d'extraits) a été extrait.

La quantification de CBD se situe dans la limite de quantification de l'appareil n'as pas permis d'analyser et d'interpréter les résultats d'effets principaux de manière statistiquement correcte. Ceci était dû à la variété spécifique de la plante utilisée (riche en THC et très faible en CBD) lors de l'expérience.

Les conditions optimales obtenues à la suite des tracés d'effets principaux ont pu être compilés dans le tableau suivant.

Tableau 45 : Synthèse des objectifs et traitements optimaux pour une réponse donnée d'après les tracés d'effets principaux

	<i>Objectif</i>	<i>Température</i>	<i>Vitesse agitation</i>	<i>Ultrasons</i>	<i>Temps extraction</i>
<i>Rendement massique (%)</i>	Max	30	150	15	90
<i>TPC (mg GAE/g DM)</i>	Max	30	150	30	90
<i>TFC (mg QuE/g DM)</i>	Max	30	150	15	60
<i>TCC (mg /g DM)</i>	Min	-30	50	0	60
<i>Antioxydants (mg TE/ DM)</i>	Max	30	150	15	90
<i>[THCA] (µg/mg)</i>	Max	0	50	0	60
<i>[THC] (µg/mg)</i>	Max	30	250	30	120
<i>[CBN] (µg/mg)</i>	Max	30	250	30	120

Seulement 9 des 81 traitements possibles ont été réalisés grâce au DSD. Il a permis, à l'aide des tracés, d'obtenir les valeurs optimales des quatre facteurs étudiés pour chaque réponse. Ces paramètres optimaux peuvent correspondre à l'un des neuf traitements (de T01 à T09) par hasard ou bien à l'un des 72 autres non réalisés. Et dans ce cas-là, il faudra reproduire les conditions optimisées afin de vérifier leurs valeurs et valider le plan d'expérience.

Les formes acides des cannabinoïdes (THCA) devraient être maximisées dans des conditions à 0°C avec très peu d'agitation, sans ultrasons et un temps minimal d'extraction (60 minutes).

Les formes neutres et de dégradation (THC et CBN) devraient être favorisés par des températures plus élevés, des dégradations mécaniques (agitation et temps d'ultrasons élevés) en plus d'un temps de macération conséquent (120 minutes).

A l'issu de l'analyse de tous les tracés d'effets principaux, deux réponses ont été choisies afin de vérifier le plan d'expérience. Deux nouveaux traitements ont ainsi été réalisés. Le premier (noté  $T_{\max\text{THC}}$ ) a été réalisé avec tous les paramètres au pas +1 (à 30°C, 30 min UAE-P + 120 min SE à 250 rpm) et le second (noté  $T_{\max\text{Rdt}}$ ) avec la majorité des paramètres au pas 0 (à 30°C, 15min UAE-P + 90 min SE à 150 d'agitation). Le  $T_{\max\text{THC}}$  a permis d'obtenir un maximum de THC (77.87 mg) par rapport au traitement T04 du plan d'expérience avec la plus haute concentration (61.85 mg). Quant au  $T_{\max\text{Rdt}}$ , ce traitement a également fonctionné et a obtenu un rendement massique plus élevé 25.95 % (contre 25.48 % avec T09). Les prédictions dans la zone d'étude du plan d'expérience ont donc bien fonctionné.

#### IV.2.6. Essais de formulations galéniques

Les essais de formulations ont tous suivi une même logique de fabrication et de contrôle. Chaque contrôle jugé non conforme peut permettre de connaître les défauts de notre formule à corriger.

Ainsi une étude complète a été réalisée pour un essai de formulation (excipient seul), puis les résultats et explications ont été simplifiées pour l'autre essai présenté (placebo).

L'ensemble des formulations a été discuté à travers une synthèse de tous les essais dans une dernière partie.

##### IV.2.6.1. Excipient seul (PROSOLV® EASYtab)

Après tamisage de l'excipient PROSOLV®, il n'a pas été observé de formation d'agglomérat dans le flacon et la compression a été effectuée, logiquement, sans problème du fait des caractéristiques adaptées de cet excipient de compression directe.

Le PROSOLV® est en effet un excipient obtenu par co-procédé qui associe un diluant (Cellulose microcristalline), un lubrifiant (fumarate de stéaryle de sodium), un désintégrant (glycolate d'amidon sodique) et un agent d'écoulement (dioxyde de silicium colloïdal).

###### - Formulation et essais

L'objectif fixé a été d'obtenir des comprimés d'une masse de 100 mg de manière reproductible manuellement avant de démarrer la production en mode automatique. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau suivant.

Tableau 46 : Récapitulatif des essais de compression réalisés manuellement pour le réglage de la machine

Essais	Masse Cps (mg)	Force à la rupture (kP = daN)	Aspect Cps après rupture	Réglage enfoncement poinçon supérieur
1	88.9			6
2	97.7			6
3	98.2			6.5
4	99.2			7.2
5	98.6			8.2
6	99.1			8.5
7	98.3	19.6	fissuré et écrasé	9
7bis	97.6	19.4	fissuré et écrasé	9

Le premier essai est un réglage de masse de l'appareil (remplissage de l'espace entre les deux poinçons). Les essais suivants (2 à 7) ont été effectués en augmentant au fur et à mesure la force appliquée afin d'augmenter la résistance du comprimé, ce qui réduit implicitement sa taille et permet d'obtenir un aspect brillant (Figure 141).

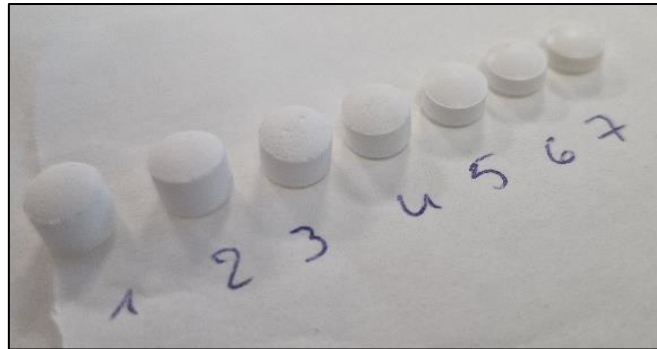


Figure 141 : Comprimés obtenus lors des essais de compression 1 à 7 pour le PROSOLV® seul

Après l'obtention du comprimé 7, un test de résistance à la rupture a été réalisé au duromètre. Ce dernier a été validé par une valeur plutôt haute (19.6 daN) sachant que l'appareil possède une échelle de 0 à 20 daN. De plus la fracture est unique et bien diamétrale. Ceci a permis de valider les réglages de la compression et de lancer la production d'un lot de 100 comprimés pour réaliser les tests prescrits par la pharmacopée.

- Uniformité de masse

Vingt comprimés ont été prélevés et pesés pour le test d'uniformité de masse imposé par la pharmacopée.

Tableau 47 : Relevé des masses des 20 comprimés PROSOLV®

Comprimé n°	Masse du comprimé (mg)	Comprimé n°	Masse du comprimé (mg)
1	102.1	11	102.3
2	102.1	12	102.4
3	102.8	13	102.5
4	102.9	14	104.0
5	102.7	15	102.5
6	102.6	16	103.1
7	103.1	17	102.7
8	102.9	18	103.3
9	102.8	19	102.9
10	103.0	20	102.9
<b>Moyenne</b>	102.77		
<b>Ecart-type</b>	0.44		

D'après la pharmacopée européenne, l'écart limite devait être de 7.5 % de la masse moyenne pour un comprimé de masse entre 80 et 250 mg, soit de 7.7 mg pour une moyenne de 102.77 mg.

Les bornes ont été calculées à plus ou moins un écart limite et deux écart-limites par rapport à la masse moyenne selon :

$$m_{\text{moyenne}} - EI < m_{\text{moyenne}} < m_{\text{moyenne}} + EI \text{ soit } 95.1 \text{ mg} < m_{\text{moyenne}} < 110.5 \text{ mg}.$$

$$m_{\text{moyenne}} - 2EI < m_{\text{moyenne}} < m_{\text{moyenne}} + 2EI \text{ soit } 87.4 \text{ mg} < m_{\text{moyenne}} < 118.2 \text{ mg}.$$

En regardant l'ensemble des valeurs parmi les 20 obtenues, la plus faible valeur était 102.1mg et la plus élevée 104.0 mg. Autrement dit toutes les masses de comprimés étaient comprises dans le 1<sup>er</sup> intervalle. Ainsi le lot de comprimés a été jugé conforme.

Après l'étude de masse selon la Pharmacopée, l'essai statistique a été réalisé à partir de la masse théorique et de l'écart-limite théorique. La  $m_{\text{théo}}$  était égale à 100 mg avec  $EI_{m_{\text{théo}}}$  égale à 7.5%.

$$m_{\text{théo}} - EI_{m_{\text{théo}}} < m_{\text{théo}} < m_{\text{théo}} + EI_{m_{\text{théo}}} \text{ soit } 92.5 \text{ mg} < m_{\text{théo}} < 107.5 \text{ mg}$$

L'intervalle expérimental de cet essai a été calculé à partir de la  $m_{\text{moyenne}}$ , du coefficient de Student ( $t=2.093$ ) et de  $S_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ .

$$m_{\text{moyenne}} - tS_m = 102.56 \text{ mg} \text{ et } m_{\text{moyenne}} + tS_m = 102.98 \text{ mg}$$

L'intervalle expérimental doit être intégré dans l'intervalle théorique pour assurer la conformité du lot.

$$m_{\text{théo}} - EI_{m_{\text{théo}}} < [m_{\text{moyenne}} - tS_m ; m_{\text{moyenne}} + tS_m] < m_{\text{théo}} + EI_{m_{\text{théo}}}$$

$$\text{soit } 92.5 \text{ mg} < [102.56 ; 102.98] < 107.5 \text{ mg}.$$

Le lot de comprimés réalisé a donc été jugé conforme par rapport à l'essai statistique.

#### - Désagrégation

L'ensemble des comprimés s'est désagrégé de la même façon en 2 min. Cette valeur était inférieure à la valeur arbitraire de 3 min de désagrégation fixée pour valider l'essai d'un comprimé sublingual.

Une faible proportion de particules, probablement de fines particules de cellulose, n'a pas été dissoute dans l'eau à 37 °C (Figure 142)

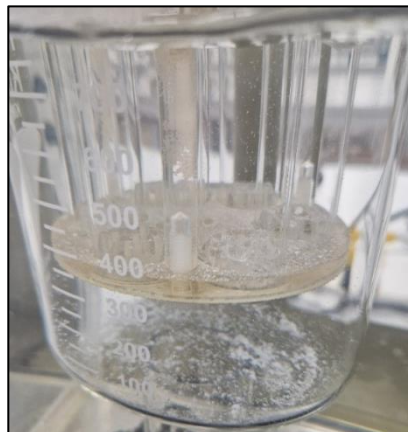


Figure 142 : Etat de désagrégation des comprimés PROSOLV® après 2 min

- Friabilité

Pour l'essai de friabilité, comme notre comprimé pesait moins de 650 mg, il a été nécessaire de prendre un nombre de comprimés correspondant à une masse totale initiale d'environ 6.5 g. Après 4 min dans l'appareil de friabilité, la masse totale finale et la perte de masse ont été calculées.

$$m_i = 6.4645 \text{ g} \quad m_f = 6.4644 \text{ g} \quad \text{PM} = 0 \%$$

La perte de masse était inférieure à 1%. Aucun éclat, aucune fissure ou cassures n'a été observé. Le test s'est révélé conforme.

- Résistance à la rupture

Tableau 48 : Valeurs de résistance obtenues en fonction des comprimés PROSOLV®

Comprimé n°	Force de rupture (daN)
1	19.2
2	20
3	19.8
4	20
5	20
6	19.5
7	19.3
8	19.2
9	19.3
10	19
<b>Moyenne :</b>	<b>19.53</b>
<b>Écart-type :</b>	<b>0.39</b>

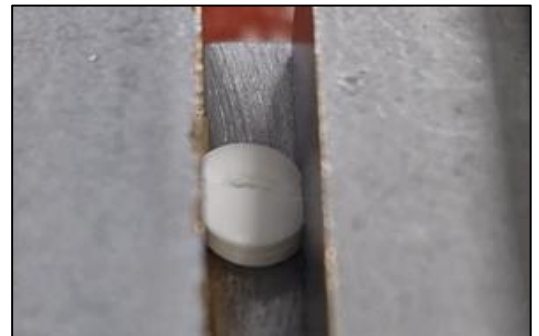


Figure 143 : Observation de la fracture diamétrale sur un des comprimés PROSOLV® dans le duromètre

Comme lors des essais préliminaires de compression manuelle, des valeurs entre 19 et 20 daN ont été obtenues à l'issue de la compression automatique avec une valeur moyenne de 19.53 daN. Les fractures étaient nettes et diamétrales sur chaque comprimé. L'essai de résistance est conforme.

Ces essais ont permis de comprendre le comportement du PROSOLV® en compression et d'établir les réglages de la machine pour fabriquer des comprimés conformes aux objectifs fixés.

#### IV.2.6.2. Amélioration de la désagrégation, de la saveur et ajout de terpènes

CentreLab a souhaité ajouter dans la formule des terpènes (à l'état pur) tel que le myrcène que l'on retrouve également dans la composition chimique de la plante de *Cannabis sativa* L. Ces terpènes ont pu être détectés à l'aide des analyses réalisées par HS-SPME-GC-MS.

Cette stratégie a été développée dans de nombreuses études qui évoquent un effet d'entourage non négligeable, une synergie entre les terpènes et les cannabinoïdes qui augmenterait la biodisponibilité de ces derniers lors de leur utilisation. (MacCallum and Russo, 2018; Russo, 2011).

De plus, le temps de désagrégation des essais précédents (2 min) a été jugé trop élevé pour des comprimés sublinguaux, cette durée devait donc également être réduite.

##### - Formulation et essais

Les essais sont réalisés avec les mêmes réglages de la machine de compression que ceux présentés dans la partie précédente.

Le mélange a été préparé dans les proportions suivantes : 97.44 % PROSOLV® + 0.50 % primellose 0.06 %, aspartame et 2 % terpènes. Le primellose a le rôle de désintégrant et l'aspartame d'édulcorant.

Un mélange de trois terpènes en ratio 1/1/1 sous leur forme liquide (myrcène, limonène et pinène), a été adsorbé sur de la silice colloïdale (4g terpènes/1g silice) afin de les intégrer dans le mélange (Figure 144). En raison de leur volatilité et des propriétés électrostatiques de la silice, la masse réelle de terpènes incorporés était différente de la masse supposée. La masse du mélange obtenu, à ajouter au mélange final de la formule, a donc été recalculée et ajustée pour obtenir les 2% attendus.



Figure 144 : Etat du mélange de terpènes + Aérosil 300 (silice colloïdale) après adsorption

Après réglage du volume de la chambre de compression et de la force de compression, quelques comprimés ont été fabriqués manuellement avec une masse correcte ( $\approx 100$  mg) et une force de rupture de 8.2 à 8.6 daN. Ils possèdent toujours un aspect brillant et forment une fracture nette diamétrale. Environ 90 comprimés ont ensuite été fabriqués en automatique





Figure 145 : Aspect des comprimés de PROSOLV®+ primellose + aspartame+ terpènes après sortie de machine de compression

- Uniformité de masse

Vingt comprimés ont été utilisés et pesés pour le test d'uniformité de masse.

Tableau 49 : Relevé des masses des 20 comprimés PROSOLV®+ Primellose + Aspartame+ Terpènes

Comprimé n°	Masse du comprimé (mg)	Comprimé n°	Masse du comprimé (mg)
1	101.8	11	101.1
2	102.1	12	101.7
3	101.3	13	101.5
4	101.2	14	102.1
5	101.5	15	102.0
6	102.3	16	101.8
7	101.3	17	101.9
8	101.9	18	101.5
9	101.5	19	101.2
10	101.2	20	100.7
<b>Moyenne</b>	101.58		
<b>Ecart-type</b>	0.41		

Les recommandations d'écart limites de la pharmacopée ont été appliquées :

$$m_{\text{moyenne}} - EI < m_{\text{exp}} < m_{\text{moyenne}} + EI \text{ soit } 93.9 < m_{\text{exp}} < 109.2 \text{ mg.}$$

$$m_{\text{moyenne}} - 2EI < m_{\text{exp}} < m_{\text{moyenne}} + 2EI \text{ soit } 86.3 < m_{\text{exp}} < 116.8 \text{ mg.}$$

Parmi les valeurs obtenues, la plus faible valeur était 100.7 mg et la plus haute 102.3 mg. Toutes les masses de comprimés sont comprises dans le premier intervalle donc l'essai est conforme.

Pour l'essai statistique, les intervalles sont les suivants :

$$m_{\text{théo}} - EI < m_{\text{théo}} < [m_{\text{moyenne}} - tS_m ; m_{\text{moyenne}} + tS_m] < m_{\text{théo}} + EI$$

Le lot de comprimés était donc conforme avec l'intervalle :  $92.5 < [101.39 ; 101.77] < 107.5$  mg.

- Désagrégation

L'ensemble des comprimés s'est désagrégé en 13 secondes. L'essai de désagrégation a été jugé conforme.

- Friabilité :

Après les 4 minutes de test dans l'appareil de friabilité, la perte de masse a été calculée.

$$m_i = 6.5079 \text{ g} \quad m_f = 6.5049 \text{ g} \quad PM = 0.05 \%$$

Aucun éclat, aucune fissure ou cassure n'a été observé et  $PM < 1 \%$  donc le test de friabilité est conforme.

- Résistance à la rupture

Tableau 50 : Valeurs de résistance obtenues pour les comprimés PROSOLV®+ primellose + aspartame+ terpènes

Comprimé n°	Valeur de résistance (daN)
1	9.0
2	9.2
3	9.0
4	9.0
5	9.3
6	9.2
7	9.1
8	9.4
9	9.3
10	9.4
<b>Moyenne :</b>	<b>9.19</b>
<b>Écart-type :</b>	<b>0.16</b>



Figure 146 : Observation de la fracture diamétrale sur un des comprimés PROSOLV®+ Primellose + Aspartame+ Terpènes dans le duromètre

Une valeur moyenne de 9.19 daN a été obtenue. Même si la résistance a diminué de 19.5 à 9.2 daN, cette dernière restait toujours assez élevée et ceci a été validé par le test de friabilité jugé conforme.

#### IV.2.6.3. Récapitulatif de l'ensemble des essais de mise au point des comprimés sublinguaux

Afin de mieux comparer l'ensemble des données, tous les essais de formulation à partir du PROSOLV ont été compilés dans le tableau suivant :

Tableau 51 : Comparaison de l'ensemble des comprimés sublinguaux réalisés

	Moyenne des masses (mg)	Moyenne résistance rupture (daN)	Temps désagrégation (s)	Perte de masse (%)	Force de compression (Réglage appareil, sans unité)
Cps PROSOLV	102.77 ± 0.44	19.53 ± 0.39	120	0.01	9
Cps PROSOLV + Primellose	104.11 ± 0.32	16.52 ± 0.32	65	0.03	8.7
Cps PROSOLV + primellose + aspartame	104.66 ± 0.4	16.75 ± 0.37	58	0.06	8.7
Cps PROSOLV + primellose + aspartame + myrcène	103.33 ± 0.43	12.04 ± 0.41	22	0.26	8.7
Cps PROSOLV + primellose + aspartame + terpène mix	101.58 ± 0.41	9.19 ± 0.16	13	0.05	8.3
Cps CBD + PROSOLV	100.48 ± 0.45	16.72 ± 0.34	120	0.04	9

Tous les lots de comprimés réalisés sont conformes aux spécifications de la pharmacopée européenne.

Les variations de masse et de résistance à la rupture étaient plutôt faibles, ce qui a permis d'admettre une certaine régularité des étapes de préparation et compression sur ces lots de 100 comprimés, ainsi que d'envisager de produire à plus grande échelle.

Dans ce cas précis particulier du mélange d'excipient étudié, il semblerait que la force de compression ait un impact sur la résistance à la rupture et la désagrégation, sans pour autant toucher à la friabilité du comprimé. En effet, il a été constaté que la diminution de compression de 8.7 à 8.3 (entre le mélange avec le myrcène et celui avec les terpènes) a induit une diminution de la résistance à la rupture de 12 à 9.2 daN et d'un temps de 22 à 13s de désagrégation. Et ceci a été remarqué tout en ayant une uniformité de masse proche et une friabilité inférieure à 0.3% dans les deux cas.

L'objectif fixé de fabriquer des comprimés sublinguaux de 100 mg à partir de l'excipient de compression directe (PROSOLV® Easytab) et de 5% de CBD a également été atteint.

Les essais sur l'excipient seul ont permis d'une part de vérifier les propriétés du PROSOLV®, de valider la conformité des comprimés d'excipient seul, et d'autre part de préparer la zone de réglage de la machine de compression pour fabriquer les comprimés avec le principe actif. Ensuite, des évolutions nécessaires de la formule ont été réalisées au fur et à mesure de cette étude.

En effet, un temps de désagrégation un peu trop long, un aspect argileux/granuleux en bouche et un goût neutre sont des points à améliorer sur ce comprimé à base de PROSOLV®. Le choix a été d'ajouter un édulcorant (aspartame), un désintégrant (primellose) et un mélange de terpènes adsorbés sur de la silice colloïdale pour se rapprocher de la composition terpénique d'un extrait de cannabis. L'édulcorant avait pour but de dissimuler ou d'adoucir le goût prononcé du myrcène et le désintégrant (en faible quantité) de baisser le temps de désagrégation du comprimé.



# Conclusion générale et perspectives





## Conclusion

---

L'ensemble des travaux réalisés pour ce projet de thèse a été axé sur la valorisation des métabolites de plantes (*Humulus lupulus* L. et *Cannabis sativa* L.) à des fins thérapeutiques. A l'origine, les recherches étaient prévues uniquement sur les fleurs de *cannabis sativa* L. à travers une collaboration entre le laboratoire LABC/S (Université de Limoges) et Centre Lab (Guéret). Ce projet était directement lié à l'expérimentation du cannabis thérapeutique en France, sous le contrôle de l'ANSM.

Les délais d'obtention des multiples autorisations réglementaires afin de faire parvenir les fleurs depuis le partenaire australien (LGP) jusqu'en France (à Limoges) ont retardé les recherches sur le cannabis. Ce temps d'attente a été mis à profit en utilisant une plante modèle de la famille des Cannabacées afin de préparer les expériences. Ainsi, le projet de thèse a évolué en deux parties avec une étude de plante modèle (*Humulus lupulus* L.) puis des fleurs de cannabis.

La première partie réalisée sur les cônes de houblon a permis de développer et d'optimiser les protocoles d'extraction, les dosages colorimétriques, la quantification des métabolites et la dérégulation.

L'ensemble des techniques extractives utilisées ont été réalisées avec un ensemble des méthodes conventionnelles et alternatives pouvant être appliquées au cannabis tout en ayant des possibilités de passer à l'échelle pilote puis industrielle.

Les techniques étudiées ont été de la macération classique sous agitation (SE) jusqu'aux extractions assistées sous pression (PLE) ou micro-ondes (MAE), en passant par les ultrasons (UAE). Le solvant (éthanol) a été choisi de manière à se diriger au maximum vers les principes de l'éco extraction tout en proposant des rendements convenables. Des essais de mélange hydroéthanolique ont également été réalisés. Les rendements d'extraction dépendants de la technique utilisée étaient compris entre 8.7% (SE 25°C) et 31.7% (PLE 75°C (30% H<sub>2</sub>O)).

En utilisant l'optimisation des extractions à l'aide de la notion de désirabilité, les résultats ont été comparés les uns par rapport aux autres, afin de déterminer les procédures les plus prometteuses. La PLE à 75°C avec EtOH a démontré la désirabilité globale la plus élevée (77.4%). D'un point de vue industriel, il serait recommandé de choisir UAE-B+SE ( $d_g = 64.5\%$ ) comme possibilité rapide de mise à l'échelle à des niveaux industriels.

Les études de teneur en polyphénols (TPC) ont permis de définir la PLE comme étant la technique la plus efficace avec 75.5 mg GAE/g DM pour PLE125°C. La teneur totale en flavonoïdes (TFC) a suivi des tendances similaires avec 24.9 mg QuE/g DM pour PLE125°C. Concernant ces métabolites, l'augmentation de température, de pression ou l'utilisation d'ultrasons a un impact positif sur leurs teneurs. L'ajout d'un pourcentage d'eau a démontré un effet négatif.

L'extraction des pigments photosynthétiques a été facilitée par les dégradations physiques des parois végétales (tout comme les polyphénols et flavonoïdes) permettant d'obtenir 13,5 mg/g MS en utilisant PLE à 125°C avec de l'éthanol.

La quantification a été réalisée à l'aide d'une méthode d'étalonnage externe avec des composés standards (0,05 à 1 mg/mL). L'humulone est le principal composant extrait par toutes les méthodes d'extraction utilisées (à l'exception de la triphasique-SE). Des teneurs



élevées en humulone, cohumulone et xanthohumol ont été obtenues avec l'UAE-P+SE, tandis que la triphasique-SE et la MAE ont augmenté la teneur en lupulone. Les techniques appropriées peuvent être choisies en fonction des molécules souhaitées.

Les réseaux moléculaires traités et générés à l'aide de Mzmine et MetGem ont détecté 327 ions parents (et leurs ions fils spécifiques) avec l'annotation d'environ 20 molécules spécifiques du houblon en mode négatif (par exemple,  $\alpha$ - et  $\beta$ -acides).

Cette étude sur le houblon a mis en évidence la facilité avec laquelle ces procédés d'extraction et d'analyse peuvent être appliqués à d'autres espèces végétales. Ainsi, dans une seconde partie, les travaux se sont dirigés sur les fleurs de cannabis.

Quel que soit le type d'extraction réalisée (SE, MAE, UAE, PLE, Soxhlet), les rendements massiques d'extraction sont compris entre 20 et 28%. Seule l'extraction successive utilisant des solvants ne répondant pas aux critères d'utiliser des solvants verts conduit à un rendement de 34%.

Les mêmes protocoles de dosages colorimétriques des cônes de houblons ont été appliqués aux fleurs de cannabis. Des conclusions différentes ont été obtenues concernant les polyphénols et les flavonoïdes. En effet la meilleure technique fournissant la TPC la plus élevée est PLE25°C avec 108.2 mg GAE/g DM et la macération successive SE avec 24.3 mg QuE/g DM pour la TFC.

Sur le cannabis (variété THC dominant), l'augmentation de la température diminue les teneurs extraites en polyphénols ou flavonoïdes (effet négatif). Par rapport à la TCC, l'augmentation de température ou de pression affectent positivement les valeurs, avec la meilleure teneur à 457.0 mg/g DM pour le Soxhlet suivis de près par PLE125°C à 451.6 mg/g DM.

Les analyses en GC-MS ont permis d'identifier les molécules volatiles comme les terpènes. Ces derniers, tout comme les cannabinoïdes, sont dépendant de la variété de fleurs mais également de l'environnement de la plante et de ses conditions de culture. Le myrcène, le caryophyllène, l'humulène et le limonène sont les quatre molécules volatiles majoritaires au sein des deux lots de fleurs étudiées (THC et CBD dominants).

Les analyses de quantifications par LC-DAD ont démontré que les teneurs déterminées (jusqu'à 40.3mg de CBGA, 76.9 mg de THC et 888.7 mg de THCA pour UAE-B +SE) sont dépendantes de la variété de fleurs utilisée, des méthodes extractives et des traitements thermiques (décarboxylation à l'étuve appliquée ou non lors de notre protocole). Les étapes d'extraction et de purification peuvent être orientées suivant le pull de molécules désirées. Les résultats de quantifications ont tout de même révélé une proportion de 80 à 95 % de concentrations THCA +THC en termes de cannabinoïdes au sein des extraits.

Les résines brutes ont été soumises à des étapes de décarboxylation soit thermique (par étuve) soit chimique (par utilisation d'iode). La première a permis d'obtenir 3.1% de CBN et la seconde 21.8% par rapport à la résine initiale. Les suivis par CCM et analyses RMN ont permis de prouver la décarboxylation oxydative du THCA en THC puis CBN. La formation de cannabinoïdes secondaires tels que le d8-THC a également été observée.

Les molécules isolées après séparations et purifications sur colonne de silice, MPLC et CCM préparatives, ont été analysées par RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC). Les structures de THCA, d9-THC, d8-THC et CBN ont ainsi pu être déterminées. De plus, une superposition des spectres protons a été réalisée. Elle a permis d'une part de comparer et reconnaître plus

rapidement un cannabinoïde pur parmi ces quatre molécules mais également de déduire les impuretés dans les spectres grâce à leurs signaux caractéristiques.

Ce travail a permis d'appréhender et de maîtriser les logiciels MZmine, MetGem, GNPS, SIRIUS et Cytoscape qui sont des outils utilisés pour générer les réseaux moléculaires. L'analyse comparative a été réalisée sur cinq extraits différents : SE50 ; UAE-P+SE ; Triphasic SE ; PLE50 et MAE50-5. Le nombre total d'ions détectés a été de 254 et plus d'une trentaine de molécules ont pu être annotées avec notamment des cannabinoïdes, des sesquiterpènes, des acides aminés et peptides et des alcaloïdes.

Leurs temps de rétentions, leurs rapports  $m/z$  en mode positif, leurs formules chimiques et leurs fragmentations ont été ainsi répertoriés. La présence d'acides gras a aussi été détectée par l'analyse des données sous SIRIUS mais sans pouvoir proposer de structures spécifiques à ces derniers. Les cannabinoïdes majoritaires et plutôt connus de la littérature sont retrouvés tels que le THC, le THCA, le CBG ou le CBGA.

D'autres jugés minoritaires sont également annotés tels que le THCV, THCH ou le 6,7-Epoxy-CBG et le 6,7-Epoxy-CBGA.

L'appui d'outils statistiques comme la méthode TOPSIS a permis de trier un jeu de données et de définir un top 3 des meilleurs traitements réalisés. Un plan d'expérience et le tracé des effets principaux des réponses ont également été réalisés afin de conclure sur un ou des traitements optimaux tout en réalisant un minimum d'essais en laboratoire.

Parmi les quatre facteurs étudiés (la température, les ultrasons, la vitesse d'agitation de la pale et le temps d'extraction), le facteur le plus impactant sur les résultats s'avère être la température.

Si le souhait est d'augmenter le rendement massique et les TPC, les paramètres seraient réglés sur les niveaux +1. Cette augmentation est limitée par une utilisation excessive d'ultrasons, une extraction trop longue avec une vitesse d'agitation trop élevée. Suivant les niveaux de facteurs utilisés pour l'extraction, l'obtention de formes acides ou de formes neutres peut être orientée.

Deux traitements « optimaux » pour maximiser la concentration en THC et le rendement massique ont été déterminés à la suite du DSD. Ces traitements ont été réalisés et leurs résultats optimaux, supérieurs aux traitements effectués au départ, ont permis de valider le plan d'expérience.

Enfin, des comprimés sublinguaux de 6 mm de diamètre et dosés à 5 mg de CBD ont été fabriqués. Le premier lot de comprimés a été réalisé avec un excipient de compression directe déjà optimisé (PROSOLV® Easytab). Les comprimés possédaient un temps de désagrégation considéré comme trop long ( $\geq 2$ min) par rapport à l'objectif fixé. D'autre part il a été décidé d'intégrer des terpènes et un édulcorant pour masquer leur amertume. La formule a été modifiée progressivement pour répondre à tous ces critères, tout en maintenant la conformité des tests pharmacotechniques. La formule finale obtenue est la suivante : 97.44% PROSOLV ; 0.50 % primellose ; 0.06 % aspartame ; 2.00 % terpènes adsorbés sur de la silice colloïdale.

En conclusion, la majorité des objectifs initiaux de la thèse ont donc été atteints. De nombreuses extractions ont permis d'obtenir des résines brutes analysées par dosages colorimétriques et quantifiées par LC-MS/MS. Le profil des molécules volatiles de la plante a été établi par GC-MS. Les phytocannabinoïdes majoritaires et minoritaires ont pu être annotés par réseaux moléculaires. Des séparations et purifications de résines brutes ou décarboxylées ont conduit à l'obtention de THCA, d9-THC, d8-THC et CBN dont la structure a été vérifiée par RMN 1D et 2D. Et une étude de formulation de comprimés sublinguaux permettant d'intégrer du CBD (ou un autre cannabinoïde) a été réalisée.

## Perspectives

---

De nombreuses possibilités sont apparues à la suite de l'ensemble des travaux réalisés. Chacune des parties développées peut être approfondie et quelques unes d'entre elles sont développées ci-dessous.

La séparation des cannabinoïdes a été effectuée en plusieurs étapes et leur ordre pourrait être modifié afin d'être plus efficace. Le schéma suivant serait à traiter si l'objectif est de travailler sur la résine de cannabis sans traitement (décarboxylation) : un fractionnement en phase inverse (C18) permettrait de séparer les cannabinoïdes des autres constituants, suivie d'une séparation en phase normale, enfin une troisième étape par chromatographie liquide semi-préparative ou bien CCM préparative.

L'étude de décarboxylation a été réalisée à 160°C avec comme objectif de transformer totalement le THCA en THC et de forcer l'oxydation afin d'obtenir un maximum de CBN. Néanmoins, il serait intéressant d'optimiser la réaction d'hémisynthèse avec le diode mais avec un prétraitement à 140 °C au lieu de 160 °C, ce qui éviterait l'obtention des composés indésirables par un chauffage excessif et un meilleur rendement pourrait être obtenu. A l'inverse, il serait intéressant de purifier et caractériser en RMN les molécules « indésirables » formées à une température  $\geq 160^\circ\text{C}$ .

Les analyses LC-MS/MS sur le cannabis n'ont été réalisées et traitées qu'en mode positif. Le mode négatif permettrait de compléter la banque de données qui a été créée sur cette fleur ainsi que les données issues de SIRIUS et GNPS. D'autres cannabinoïdes pourraient être identifiés en mode négatif ce qui aiderait à l'élucidation et l'annotation des réseaux moléculaires.

Les analyses par GC-MS/MS devraient être reprogrammées avec un étalon interne différents des molécules déjà déterminées afin de réaliser une analyse quantitative des lots de fleurs « CBD dominant » et « THC dominant ».

Les comprimés sublinguaux devront être analysés par HPLC-UV afin de vérifier leur conformité par rapport à la dose en principe actif (CBD) exacte d'un comprimé. Des méthodes de pré-validation analytique ont déjà été mises en place sur les résines et serviront avec quelques modifications à ces études.

De plus, la formulation proposée pourrait encore évoluer sur plusieurs points. Si le PROSOLV<sup>®</sup> est conservé comme excipient principal, il serait nécessaire de changer l'édulcorant afin de retarder la perception du pouvoir sucrant et adoucir le goût particulier du mélange de terpènes qui est perçu de manière progressive. Le PROSOLV<sup>®</sup>, diluant principal, pourrait également être substitué par d'autres excipients destinés à la compression directe tels que le mannitol et le lactose.

L'étape la plus importante serait le transfert de la technique couplant prétraitement d'ultrasons à une macération sous agitation à une échelle pilote et de réaliser un plan d'expérience sur ce nouveau montage. Le choix des températures à appliquer sera fait en fonction des molécules souhaitées, à savoir si l'on souhaite obtenir des extraits « full spectrum » non dénaturés ou bien des extraits enrichis avec des cannabinoïdes précis (par exemple du THC ou du CBN).



# Références





## Références bibliographiques

---

- Adams, R., Baker, B.R., Wearn, R.B., 1940. Structure of Cannabinol. III. Synthesis of Cannabinol, 1-Hydroxy-3-n-amylo-6-trimethyl-6-dibenzopyran 62.
- Addo, P.W., Desaulniers Brousseau, V., Morello, V., MacPherson, S., Paris, M., Lefsrud, M., 2021. Cannabis chemistry, post-harvest processing methods and secondary metabolite profiling: A review. *Ind. Crops Prod.* 170, 113743. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113743>
- Adhikary, D., Kulkarni, M., El-Mezawy, A., Mobini, S., Elhiti, M., Gjuric, R., Ray, A., Polowick, P., Slaski, J.J., Jones, M.P., Bhowmik, P., 2021. Medical Cannabis and Industrial Hemp Tissue Culture: Present Status and Future Potential. *Front. Plant Sci.* 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.627240>
- Agarwal, C., Máthé, K., Hofmann, T., Csóka, L., 2018. Ultrasound-Assisted Extraction of Cannabinoids from Cannabis Sativa L. Optimized by Response Surface Methodology. *J. Food Sci.* 83, 700–710. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14075>
- Almaguer, C., Schönberger, C., Gastl, M., Arendt, E.K., Becker, T., 2014. Humulus lupulus – a story that begs to be told. A review. *J. Inst. Brew.* 120, 289–314. <https://doi.org/10.1002/jib.160>
- Amdoun, R., Khelifi, L., Khelifi-Slaoui, M., Amroune, S., Asch, M., Assaf-Ducrocq, C., Gontier, E., 2018. The Desirability Optimization Methodology; a Tool to Predict Two Antagonist Responses in Biotechnological Systems: Case of Biomass Growth and Hyoscyamine Content in Elicited Datura stramonium Hairy Roots. *Iran. J. Biotechnol.* 16, e1339. <https://doi.org/10.21859/ijb.1339>
- Anandakumar, P., Kamaraj, S., Vanitha, M.K., 2021. D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects. *J. Food Biochem.* 45, e13566. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13566>
- Audu, B.S., Ofojekwu, P.C., Ujah, A., Ajima, M.N.O., 2014. Phytochemical, proximate composition, amino acid profile and characterization of Marijuana (Cannabis sativa L.). *J. Phytopharm.* 3, 35–43. <https://doi.org/10.31254/phyto.2014.3106>
- Baek, S.-H., Srebnik, M., Mechoulam, R., 1985. Boron trifluoride etherate on alimina - a modified Lewis acid reagent.: An improved synthesis of cannabidiol. *Tetrahedron Lett.* 26, 1083–1086. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)98518-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)98518-6)
- Baranauskaite, J., Ockun, M.A., Uner, B., Gungor, B., Duman, G., Tas, C., Yesilada, E., 2022. Development and *In vitro* characterization of pullulan fast dissolving films loaded with *Panax ginseng* extract, antioxidant properties and cytotoxic efficiency on lung and breast cancer cell lines. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 76, 103701. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103701>
- Barrales-Cureño, H.J., López-Valdez, L., César, R., Cetina-Alcalá, V., Garcia, I., Diaz-Lira, O., Herrera-Cabrera, B., 2020. Chemical Characteristics, Therapeutic Uses, and Legal Aspects of the Cannabinoids of Cannabis sativa: A Review. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 63, 1–14. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020190222>
- Barron, D., Ibrahim, R.K., 1996. Isoprenylated flavonoids—a survey. *Phytochemistry* 43, 921–982. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00344-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00344-5)
- Bassetti, B., Hone, C.A., Kappe, C.O., 2023. Continuous-Flow Synthesis of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol and  $\Delta^8$ -Tetrahydrocannabinol from Cannabidiol. *J. Org. Chem.* 88, 6227–6231. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.3c00300>
- Bastola, K., Hazekamp, A., Verpoorte, R., 2007. Synthesis and Spectroscopic Characterization of Cannabinolic Acid. *Planta Med.* 73, 273–275. <https://doi.org/10.1055/s-2007-967129>



- Bayewitch, M., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Barg, J., Mechoulam, R., Vogel, Z., 1995. The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett.* 375, 143–147. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01207-u](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01207-u)
- Benitez, J., Forster, A., De Keukeleire, D., Moir, M., Scharpe, F., Verhagen, L., Westwood, K., n.d. Hops and hop products, Hans Carl, Nürnberg, Duitsland, 1997, pp. 185 ISBN 3-418-00756-2.
- Bernstein, N., Gorelick, J., Koch, S., 2019. Interplay between chemistry and morphology in medical cannabis (*Cannabis sativa* L.). *Ind. Crops Prod.* 129, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.039>
- Böcker, S., Dührkop, K., 2016. Fragmentation trees reloaded. *J. Cheminformatics* 8, 5. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0116-8>
- Bocquet, L., Sahpaz, S., Hilbert, J.L., Rambaud, C., Rivière, C., 2018. *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochem. Rev.* 17, 1047–1090. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9584-y>
- Bolca, S., Possemiers, S., Maervoet, V., Huybrechts, I., Heyerick, A., Vervarcke, S., Depypere, H., Keukeleire, D.D., Bracke, M., Henauw, S.D., Verstraete, W., Wiele, T.V. de, 2007. Microbial and dietary factors associated with the 8-prenylnaringenin producer phenotype: a dietary intervention trial with fifty healthy post-menopausal Caucasian women. *Br. J. Nutr.* 98, 950–959. <https://doi.org/10.1017/S0007114507749243>
- Bonini, S.A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., Mastinu, A., 2018. *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *J. Ethnopharmacol.* 227, 300–315. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.004>
- Bowe, J., Li, X.F., Kinsey-Jones, J., Heyerick, A., Brain, S., Milligan, S., O'Byrne, K., 2006. The hop phytoestrogen, 8-prenylnaringenin, reverses the ovariectomy-induced rise in skin temperature in an animal model of menopausal hot flushes. *J. Endocrinol.* 191, 399–405. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06919>
- Bread, C., Lallemand, L., Mares, G., Mabrouki, F., Bertolotti, M., Simmler, C., Greff, S., Mauduit, M., Herbette, G., Garayev, Eldar, Lavergne, C., Cesari, M., Bun-Llopet, S.-S., Baghdikian, B., Garayev, Elnur, 2023. LC-MS Based Phytochemical Profiling towards the Identification of Antioxidant Markers in Some Endemic Aloe Species from Mascarene Islands. *Antioxidants* 12, 50. <https://doi.org/10.3390/antiox12010050>
- Brenneisen, R., 2007. Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents, in: ElSohly, M.A. (Ed.), *Marijuana and the Cannabinoids*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 17–49. [https://doi.org/10.1007/978-1-59259-947-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-947-9_2)
- Brighenti, V., Pellati, F., Steinbach, M., Maran, D., Benvenuti, S., 2017. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 143, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.049>
- Capuzzo, A., Maffei, M.E., Occhipinti, A., 2013. Supercritical Fluid Extraction of Plant Flavors and Fragrances. *Molecules* 18, 7194–7238. <https://doi.org/10.3390/molecules18067194>
- Carbone, K., Macchioni, V., Petrella, G., Cicero, D.O., 2020a. Exploring the potential of microwaves and ultrasounds in the green extraction of bioactive compounds from *Humulus lupulus* for the food and pharmaceutical industry. *Ind. Crops Prod.* 156, 112888. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112888>
- Carbone, K., Macchioni, V., Petrella, G., Cicero, D.O., 2020b. Exploring the potential of microwaves and ultrasounds in the green extraction of bioactive compounds from

- Humulus lupulus* for the food and pharmaceutical industry. *Ind. Crops Prod.* 156, 112888. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112888>
- Carquet, M., 2015. Combinatorial approaches to rebuild a biosynthetic pathway in yeast : variation of expression levels and functional analysis of a key step in the pathway.
- Chadwick, L.R., Pauli, G.F., Farnsworth, N.R., 2006. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine* 13, 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.07.006>
- Chagas, M.H.N., Eckeli, A.L., Zuardi, A.W., Pena-Pereira, M.A., Sobreira-Neto, M.A., Sobreira, E.T., Camilo, M.R., Bergamaschi, M.M., Schenck, C.H., Hallak, J.E.C., Tumas, V., Crippa, J. a. S., 2014. Cannabidiol can improve complex sleep-related behaviours associated with rapid eye movement sleep behaviour disorder in Parkinson's disease patients: a case series. *J. Clin. Pharm. Ther.* 39, 564–566. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12179>
- Chanvre - Commission européenne [WWW Document], 2022. URL [https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/hemp\\_fr](https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/hemp_fr) (accessed 8.22.24).
- Chapman, A.C., 1929. The Essential Oil of Hops. *J. Inst. Brew.* 35, 247–255. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1929.tb05191.x>
- Chemat, F., Vian, M.A., Cravotto, G., 2012. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Chen, T., He, J., Zhang, J., Li, X., Zhang, H., Hao, J., Li, L., 2012. The isolation and identification of two compounds with predominant radical scavenging activity in hempseed (seed of *Cannabis sativa* L.). *Food Chem.* 134, 1030–1037. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.009>
- Chiurchiù, E., Sampaolesi, S., Allegrini, P., Ciceri, D., Ballini, R., Palmieri, A., 2021. A Novel and Practical Continuous Flow Chemical Synthesis of Cannabidiol (CBD) and its CBDV and CBDB Analogues. *Eur. J. Org. Chem.* 2021, 1286–1289. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202001633>
- Choi, Y.H., Hazekamp, A., Peltenburg-Looman, A.M.G., Frédérick, M., Erkelens, C., Lefeber, A.W.M., Verpoorte, R., 2004. NMR assignments of the major cannabinoids and cannabiflavonoids isolated from flowers of *Cannabis sativa*. *Phytochem. Anal.* 15, 345–354. <https://doi.org/10.1002/pca.787>
- Citti, C., Linciano, P., Panseri, S., Vezzalini, F., Forni, F., Vandelli, M.A., Cannazza, G., 2019. Cannabinoid Profiling of Hemp Seed Oil by Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry. *Front. Plant Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00120>
- Clarke, R., 2016. Cannabis Taxonomy: The “sativa” vs. “indica” debate.
- Coste, H., 1937. Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes, PARIS LIBRAIRIE DES SCIENCES ET DES ARTS.
- de Meijer, E.P.M., Bagatta, M., Carboni, A., Crucitti, P., Moliterni, V.M.C., Ranalli, P., Mandolino, G., 2003. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics* 163, 335–346.
- de Souza, M.R., Henriques, A.T., Limberger, R.P., 2022. Medical cannabis regulation: an overview of models around the world with emphasis on the Brazilian scenario. *J. Cannabis Res.* 4, 33. <https://doi.org/10.1186/s42238-022-00142-z>
- DeLyser, D.Y., Kasper, W.J., 1994. Hopped Beer: The Case for Cultivation. *Econ. Bot.* 48, 166–170.

- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946–1949. <https://doi.org/10.1126/science.1470919>
- Devinsky, O., Cross, J.H., Laux, L., Marsh, E., Miller, I., Nabbout, R., Scheffer, I.E., Thiele, E.A., Wright, S., Cannabidiol in Dravet Syndrome Study Group, 2017. Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 376, 2011–2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611618>
- Djombou Feunang, Y., Eisner, R., Knox, C., Chepelev, L., Hastings, J., Owen, G., Fahy, E., Steinbeck, C., Subramanian, S., Bolton, E., Greiner, R., Wishart, D.S., 2016. ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. *J. Cheminformatics* 8, 61. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0174-y>
- Do, Y.V., Le, Q.N.T., Nghia, N.H., Vu, N.D., Tran, N.T.Y., Bay, N.T., Tran, T.T., Bach, L.G., Dao, T.P., 2024. Assessment of the changes in product characteristics, total ascorbic acid, total flavonoid content, total polyphenol content and antioxidant activity of dried soursop fruit tea (*Annona muricata* L.) during product storage. *Food Sci. Nutr.* 12, 2679–2691. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3949>
- Dos Santos, N.A., Souza, L.M., Domingos, E., França, H.S., Lacerda, V., Beatriz, A., Vaz, B.G., Rodrigues, R.R.T., Carvalho, V.V., Merlo, B.B., Kuster, R.M., Romão, W., 2016. Evaluating the selectivity of colorimetric test (Fast Blue BB salt) for the cannabinoids identification in marijuana street samples by UV–Vis, TLC, ESI(+)FT-ICR MS and ESI(+)MS/MS. *Forensic Chem.* 1, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2016.07.001>
- Du Toit, B.M., 1980. Cannabis in Africa: a survey of its distribution in Africa, and a study of cannabis use and users in multi-et[h]nic South Africa. Published for the African Studies Center, University of Florida, Gainesville, Florida by A.A. Balkema, Rotterdam.
- Dührkop, K., Fleischauer, M., Ludwig, M., Aksenov, A.A., Melnik, A.V., Meusel, M., Dorrestein, P.C., Rousu, J., Böcker, S., 2019. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nat. Methods* 16, 299–302. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8>
- Dührkop, K., Nothias, L.-F., Fleischauer, M., Reher, R., Ludwig, M., Hoffmann, M.A., Petras, D., Gerwick, W.H., Rousu, J., Dorrestein, P.C., Böcker, S., 2021. Systematic classification of unknown metabolites using high-resolution fragmentation mass spectra. *Nat. Biotechnol.* 39, 462–471. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0740-8>
- Dührkop, K., Shen, H., Meusel, M., Rousu, J., Böcker, S., 2015. Searching molecular structure databases with tandem mass spectra using CSI:FingerID. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 12580–12585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509788112>
- Dušek, M., Olšovská, J., Krofta, K., Jurková, M., Mikyška, A., 2014. Qualitative Determination of  $\beta$ -Acids and Their Transformation Products in Beer and Hop Using HR/AM-LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 62, 7690–7697. <https://doi.org/10.1021/jf501852r>
- Edwardson, J.R., 1952. Hops—Their botany, history, production and utilization. *Econ. Bot.* 6, 160–175. <https://doi.org/10.1007/BF02984875>
- El-Feraly, F.S., El-Sherei, M.M., Al-Muhtadi, F.J., 1986. Spiro-indans from *Cannabis sativa*. *Phytochemistry* 25, 1992–1994. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81194-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81194-2)
- Elsohly, M.A., Slade, D., 2005. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.* 78, 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.011>
- EPIDYOLEX 100 mg/ml sol buv [WWW Document], n.d. . VIDAL. URL <https://www.vidal.fr/medicaments/epidyolex-100-mg-ml-sol-buv-205318.html> (accessed 8.22.24).

Epidyolex Monography, n.d.

European Unions Drugs Agency, 2024. Cannabis – the current situation in Europe (European Drug Report 2024).

Felder, C.C., Briley, E.M., Axelrod, J., Simpson, J.T., Mackie, K., Devane, W.A., 1993. Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 7656–7660. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.16.7656>

Flores-Sanchez, I.J., Verpoorte, R., 2008. Secondary metabolism in cannabis. *Phytochem. Rev.* 7, 615–639. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9094-4>

França, H.S., Acosta, A., Jamal, A., Romao, W., Mulloor, J., Almirall, J.R., 2020. Experimental and ab initio investigation of the products of reaction from  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) and the fast blue BB spot reagent in presumptive drug tests for cannabinoids. *Forensic Chem.* 17, 100212. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2019.100212>

Francomano, F., Caruso, A., Barbarossa, A., Fazio, A., La Torre, C., Ceramella, J., Mallamaci, R., Saturnino, C., Iacopetta, D., Sinicropi, M.S., 2019.  $\beta$ -Caryophyllene: A Sesquiterpene with Countless Biological Properties. *Appl. Sci.* 9, 5420. <https://doi.org/10.3390/app9245420>

Gaoni, Y., Mechoulam, R., 1964. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1646–1647. <https://doi.org/10.1021/ja01062a046>

Gil-Ramírez, A., Mendiola, J.A., Arranz, E., Ruíz-Rodríguez, A., Reglero, G., Ibáñez, E., Marín, F.R., 2012. Highly isoxanthohumol enriched hop extract obtained by pressurized hot water extraction (PHWE). Chemical and functional characterization. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 16, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.04.006>

Gomes, F.V., Del Bel, E.A., Guimarães, F.S., 2013. Cannabidiol attenuates catalepsy induced by distinct pharmacological mechanisms via 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 46, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.06.005>

Greco, R., Mangione, A.S., Sandrini, G., Nappi, G., Tassorelli, C., 2014. Activation of CB<sub>2</sub> receptors as a potential therapeutic target for migraine: evaluation in an animal model. *J. Headache Pain* 15, 14. <https://doi.org/10.1186/1129-2377-15-14>

Grotenhermen, F., Russo, E., 2002. Cannabis and Cannabinoids Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential.

Guy, G.W., Stott, C.G., 2005. The development of Sativex® — a natural cannabis-based medicine, in: Mechoulam, R. (Ed.), *Cannabinoids as Therapeutics*. Birkhäuser, Basel, pp. 231–263. [https://doi.org/10.1007/3-7643-7358-X\\_14](https://doi.org/10.1007/3-7643-7358-X_14)

Hallak, J.E.C., Machado-de-Sousa, J.P., Crippa, J.A.S., Sanches, R.F., Trzesniak, C., Chaves, C., Bernardo, S.A., Regalo, S.C., Zuardi, A.W., 2010. Performance of schizophrenic patients in the Stroop Color Word Test and electrodermal responsiveness after acute administration of cannabidiol (CBD). *Rev. Bras. Psiquiatr. Sao Paulo Braz.* 1999 32, 56–61. <https://doi.org/10.1590/s1516-44462010000100011>

Hartsel, J.A., Eades, J., Hickory, B., Makriyannis, A., 2016. *Cannabis sativa* and Hemp, in: Gupta, R.C. (Ed.), *Nutraceuticals*. Academic Press, Boston, pp. 735–754. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00053-X>

Havaux, M., Niyogi, K.K., 1999. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8762–8767.

- Hillig, K.W., Mahlberg, P.G., 2004. A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae). *Am. J. Bot.* 91, 966–975. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.6.966>
- Hoffmann, M.A., Nothias, L.-F., Ludwig, M., Fleischauer, M., Gentry, E.C., Witting, M., Dorrestein, P.C., Dührkop, K., Böcker, S., 2021. Assigning confidence to structural annotations from mass spectra with COSMIC. <https://doi.org/10.1101/2021.03.18.435634>
- Hood, L.V., Dames, M.E., Barry, G.T., 1973. Headspace volatiles of marijuana. *Nature* 242, 402–403. <https://doi.org/10.1038/242402a0>
- Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., Ojima, Y., Tanaka, Kenichi, Tanaka, S., Aoshima, K., Oda, Y., Kakazu, Y., Kusano, M., Tohge, T., Matsuda, F., Sawada, Y., Hirai, M.Y., Nakanishi, H., Ikeda, K., Akimoto, N., Maoka, T., Takahashi, H., Ara, T., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Neumann, S., Iida, T., Tanaka, Ken, Funatsu, K., Matsuura, F., Soga, T., Taguchi, R., Saito, K., Nishioka, T., 2010. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J. Mass Spectrom.* 45, 703–714. <https://doi.org/10.1002/jms.1777>
- Hornsey, I.S., 2003. *A History of Beer and Brewing*. The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847550026>
- Houblon - Commission européenne [WWW Document], 2022. URL [https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/hops\\_fr](https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/hops_fr) (accessed 8.22.24).
- House, J.D., Neufeld, J., Leson, G., 2010. Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *J. Agric. Food Chem.* 58, 11801–11807. <https://doi.org/10.1021/jf102636b>
- Howard, G.A., 1957. Evaluation of Hops V. the Essential Oil of Hops. *J. Inst. Brew.* 63, 126–138. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1957.tb02910.x>
- Howard, G.A., Slater, C.A., 1957. Evaluation of Hops Vii. Composition of the Essential Oil of Hops. *J. Inst. Brew.* 63, 491–506. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1957.tb06290.x>
- Hughes, B., Herron, C.E., 2019. Cannabidiol Reverses Deficits in Hippocampal LTP in a Model of Alzheimer's Disease. *Neurochem. Res.* 44, 703–713. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2513-z>
- Hwang, C.-L., Yoon, K., 1981. Methods for Multiple Attribute Decision Making, in: Hwang, C.-L., Yoon, K. (Eds.), *Multiple Attribute Decision Making: Methods and Applications A State-of-the-Art Survey*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 58–191. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-48318-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-48318-9_3)
- Hwang, J., Adamson, C., Butler, D., Janero, D.R., Makriyannis, A., Bahr, B.A., 2010. Enhancement of endocannabinoid signaling by fatty acid amide hydrolase inhibition: A neuroprotective therapeutic modality. *Life Sci.* 86, 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.06.003>
- Imamoto, T., Yokoyama, H., Yokoyama, M., 1981. Trimethylsilyl polyphosphate (PPSE), a useful reagent for the Beckmann rearrangement. *Tetrahedron Lett.* 22, 1803–1804. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)90444-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)90444-7)
- Intelmann, D., Haseleu, G., Hofmann, T., 2009. LC-MS/MS Quantitation of Hop-Derived Bitter Compounds in Beer Using the ECHO Technique. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1172–1182. <https://doi.org/10.1021/jf803040g>
- Iuvone, T., Esposito, G., Esposito, R., Santamaria, R., Di Rosa, M., Izzo, A.A., 2004. Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis*

- sativa, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J. Neurochem.* 89, 134–141. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2003.02327.x>
- Ivancic, M., 1997. Prenylflavonoids from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry*.
- Jang, H.-I., Rhee, K.-J., Eom, Y.-B., 2020. Antibacterial and antibiofilm effects of  $\alpha$ -humulene against *Bacteroides fragilis*. *Can. J. Microbiol.* 66, 389–399. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0004>
- Jiang, C.-H., Sun, T.-L., Xiang, D.-X., Wei, S.-S., Li, W.-Q., 2018. Anticancer Activity and Mechanism of Xanthohumol: A Prenylated Flavonoid From Hops (*Humulus lupulus* L.). *Front. Pharmacol.* 9.
- Johnson, R., 2019. Defining Hemp: A Fact Sheet.
- Jones, B., Nachtsheim, C.J., 2011. A Class of Three-Level Designs for Definitive Screening in the Presence of Second-Order Effects. *J. Qual. Technol.* 43, 1–15. <https://doi.org/10.1080/00224065.2011.11917841>
- Karniol, I.G., Shirakawa, I., Takahashi, R.N., Knobel, E., Musty, R.E., 1975. Effects of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabinal in man. *Pharmacology* 13, 502–512. <https://doi.org/10.1159/000136944>
- Kaur, G., Kander, R., 2023. The Sustainability of Industrial Hemp: A Literature Review of Its Economic, Environmental, and Social Sustainability. *Sustainability* 15, 6457. <https://doi.org/10.3390/su15086457>
- Kim, H.W., Wang, M., Leber, C.A., Nothias, L.-F., Reher, R., Kang, K.B., van der Hooft, J.J.J., Dorrestein, P.C., Gerwick, W.H., Cottrell, G.W., 2021. NPClassifier: A Deep Neural Network-Based Structural Classification Tool for Natural Products. *J. Nat. Prod.* 84, 2795–2807. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00399>
- Kornpointner, C., Sainz Martinez, A., Marinovic, S., Haselmair-Gosch, C., Jamnik, P., Schröder, K., Löffke, C., Halbwirth, H., 2021. Chemical composition and antioxidant potential of *Cannabis sativa* L. roots. *Ind. Crops Prod.* 165, 113422. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113422>
- Leonard, W., Zhang, P., Ying, D., Xiong, Y., Fang, Z., 2021. Extrusion improves the phenolic profile and biological activities of hempseed (*Cannabis sativa* L.) hull. *Food Chem.* 346, 128606. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128606>
- Li, H.-L., 1973. An archaeological and historical account of cannabis in China. *Econ. Bot.* 28, 437–448. <https://doi.org/10.1007/BF02862859>
- Li, J., Ma, C., Ma, Y., Li, Y., Zhou, W., Xu, P., 2007. Medium optimization by combination of response surface methodology and desirability function: an application in glutamine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 563–571. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0699-5>
- Limousin, R., Guendoul, F., Vibert, C., Antoun, K., Ségovia, C., Ziegler-Devin, I., Brosse, N., 2023. Hop stems, a new fibrous bioresource. *Ind. Crops Prod.* 201, 116966. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116966>
- Liu, M., Hansen, P.E., Wang, G., Qiu, L., Dong, J., Yin, H., Qian, Z., Yang, M., Miao, J., 2015. Pharmacological Profile of Xanthohumol, a Prenylated Flavonoid from Hops (*Humulus lupulus*). *Molecules* 20, 754–779. <https://doi.org/10.3390/molecules20010754>
- Liu, P., 2009. Multi-attribute decision-making method research based on interval vague set and TOPSIS method. *Utko Technol. Ir Ekon. Vystym.* 15, 453–463. <https://doi.org/10.3846/1392-8619.2009.15.453-463>
- Lu, H.-C., Mackie, K., 2016. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol. Psychiatry* 79, 516–525. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.028>

- Ludwig, M., Nothias, L.-F., Dührkop, K., Koester, I., Fleischauer, M., Hoffmann, M.A., Petras, D., Vargas, F., Morsy, M., Aluwihare, L., Dorrestein, P.C., Böcker, S., 2019. ZODIAC: database-independent molecular formula annotation using Gibbs sampling reveals unknown small molecules. <https://doi.org/10.1101/842740>
- MacCallum, C.A., Russo, E.B., 2018. Practical considerations in medical cannabis administration and dosing. *Eur. J. Intern. Med.* 49, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.01.004>
- Madaka, F., Chankana, N., Khamthong, N., Maha, A., Songsak, T., 2021. TETRAHYDROCANNABINOL FROM *Cannabis sativa* L. 25.
- Malabadi, R., Kolkar, K., Chalannavar, R., 2023. Cannabis sativa: Industrial hemp (fiber type) -An Ayurvedic Traditional Herbal Medicine 5, 4040–4046.
- Maroon, J., Bost, J., 2018. Review of the neurological benefits of phytocannabinoids. *Surg. Neurol. Int.* 9, 91. [https://doi.org/10.4103/sni.sni\\_45\\_18](https://doi.org/10.4103/sni.sni_45_18)
- Martin, B.R., Mechoulam, R., Razdan, R.K., 1999. Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. *Life Sci.* 65, 573–595. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(99\)00281-7](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(99)00281-7)
- McPartland, J., Guy, G., Hegman, W., 2018. Cannabis is indigenous to Europe and cultivation began during the Copper or Bronze age: a probabilistic synthesis of fossil pollen studies. *Veg. Hist. Archaeobotany* 27. <https://doi.org/10.1007/s00334-018-0678-7>
- Mechoulam, R., 1970. Marihuana Chemistry. *Science* 168, 1159–1166.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50, 83–90. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00109-d](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00109-d)
- Mechoulam, R., Yagnitinsky, B., Gaoni, Y., 1968. Hashish. XII. Stereoelectronic factor in the chloranil dehydrogenation of cannabinoids. Total synthesis of dl-cannabichromene *Journal of the American Chemical Society*, 9.
- Mechoulam, Raphael., Braun, P., Gaoni, Yehiel., 1967. Stereospecific synthesis of (-)-.DELTA.1- and (-)-.DELTA.1(6)-tetrahydrocannabinols. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 4552–4554. <https://doi.org/10.1021/ja00993a072>
- Mediavilla, V., 1997. Essential oil of *Cannabis sativa* L. strains [WWW Document]. URL <http://www.internationalhempassociation.org/jiha/jiha4208.html> (accessed 8.21.24).
- Mohimani, H., Gurevich, A., Shlemov, A., Mikheenko, A., Korobeynikov, A., Cao, L., Shcherbin, E., Nothias, L.-F., Dorrestein, P.C., Pevzner, P.A., 2018. Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. *Nat. Commun.* 9, 4035. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06082-8>
- Montero, L., Ballesteros-Vivas, D., Gonzalez-Barrios, A.F., Sánchez-Camargo, A.D.P., 2022. Hemp seeds: Nutritional value, associated bioactivities and the potential food applications in the Colombian context. *Front. Nutr.* 9, 1039180. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1039180>
- Moreau, J.J., 1845. *Du hachisch et de l'aliénation mentale : études psychologiques*. Paris : Fortin, Masson.
- Moreno, T., Dyer, P., Tallon, S., 2020. Cannabinoid Decarboxylation: A Comparative Kinetic Study. *Ind. Eng. Chem. Res.* 59, 20307–20315. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c03791>

- Murakami, A., Darby, P., Javornik, B., Pais, M.S.S., Seigner, E., Lutz, A., Svoboda, P., 2006. Molecular phylogeny of wild Hops, *Humulus lupulus* L. *Heredity* 97, 66–74. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800839>
- Murugu Nachippan, N., Alphonse, M., Bupesh Raja, V.K., Shasidhar, S., Varun Teja, G., Harinath Reddy, R., 2021. Experimental investigation of hemp fiber hybrid composite material for automotive application. *Mater. Today Proc.*, 3rd International Conference on Frontiers in Automobile & Mechanical Engineering 44, 3666–3672. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.10.798>
- Musto, D.F., 1937. The Marihuana Tax Act of 1937. *Arch. Gen. Psychiatry* 26, 101–108. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1972.01750200005002>
- Myers, O.D., Sumner, S.J., Li, S., Barnes, S., Du, X., 2017. One Step Forward for Reducing False Positive and False Negative Compound Identifications from Mass Spectrometry Metabolomics Data: New Algorithms for Constructing Extracted Ion Chromatograms and Detecting Chromatographic Peaks. *Anal. Chem.* 89, 8696–8703. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00947>
- Naeem, M.Y., Corbo, F., Crupi, P., Clodoveo, M.L., 2023. Hemp: An Alternative Source for Various Industries and an Emerging Tool for Functional Food and Pharmaceutical Sectors. *Processes* 11, 718. <https://doi.org/10.3390/pr11030718>
- Navarro, J.M., Botía, P., Pérez-Pérez, J.G., 2015. Influence of deficit irrigation timing on the fruit quality of grapefruit (*Citrus paradisi* Mac.). *Food Chem.* 175, 329–336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.152>
- Nguyen, N.-K., Stylianou, S., 2013. Constructing Definitive Screening Designs Using Cyclic Generators. *J. Stat. Theory Pract.* 7, 713–724. <https://doi.org/10.1080/15598608.2013.781891>
- Nothias, L.F., Petras, D., Schmid, R., Dührkop, K., Rainer, J., Sarvepalli, A., Protsyuk, I., Ernst, M., Tsugawa, H., Fleischauer, M., Aicheler, F., Aksenov, A., Alka, O., Allard, P.-M., Barsch, A., Cachet, X., Caraballo, M., Silva, R.R.D., Dang, T., Garg, N., Gauglitz, J.M., Gurevich, A., Isaac, G., Jarmusch, A.K., Kameník, Z., Kang, K.B., Kessler, N., Koester, I., Korf, A., Gouellec, A.L., Ludwig, M., Christian, M.H., McCall, L.-I., McSayles, J., Meyer, S.W., Mohimani, H., Morsy, M., Moyne, O., Neumann, S., Neuweger, H., Nguyen, N.H., Nothias-Esposito, M., Paolini, J., Phelan, V.V., Pluskal, T., Quinn, R.A., Rogers, S., Shrestha, B., Tripathi, A., Hooft, J.J.J. van der, Vargas, F., Weldon, K.C., Witting, M., Yang, H., Zhang, Z., Zubeil, F., Kohlbacher, O., Böcker, S., Alexandrov, T., Bandeira, N., Wang, M., Dorrestein, P.C., 2019. Feature-based Molecular Networking in the GNPS Analysis Environment. <https://doi.org/10.1101/812404>
- Ohio State Medical Association, 1960. *Ohio State medical journal*. [Athens, Ohio] Ohio State Medical Association.
- Olivon, F., Elie, N., Grelier, G., Roussi, F., Litaudon, M., Touboul, D., 2018. MetGem Software for the Generation of Molecular Networks Based on the t-SNE Algorithm. *Anal. Chem.* 90, 13900–13908. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03099>
- Olivon, F., Grelier, G., Roussi, F., Litaudon, M., Touboul, D., 2017a. MZmine 2 Data-Preprocessing To Enhance Molecular Networking Reliability. *Anal. Chem.* 89, 7836–7840. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01563>
- Olivon, F., Grelier, G., Roussi, F., Litaudon, M., Touboul, D., 2017b. MZmine 2 Data-Preprocessing To Enhance Molecular Networking Reliability. *Anal. Chem.* 89, 7836–7840. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01563>
- Ono, K., Demchak, B., Ideker, T., 2014. Cytoscape tools for the web age: D3.js and Cytoscape.js exporters. <https://doi.org/10.12688/f1000research.4510.2>



- O'Shaughnessy, W.B., 1843. On the Preparations of the Indian Hemp, or Gunjah. *Prov. Med. J. Retrospect. Med. Sci.* 5, 363–369.
- Pacher, P., Bátkai, S., Kunos, G., 2006. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 58, 389–462. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.2>
- Padilla-González, G.F., Rosselli, A., Sadgrove, N.J., Cui, M., Simmonds, M.S.J., 2023. Mining the chemical diversity of the hemp seed (*Cannabis sativa* L.) metabolome: discovery of a new molecular family widely distributed across hemp. *Front. Plant Sci.* 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1114398>
- Pai, A., Nair, B., 2015. Synthesis and characterization of a binary oxide ZrO<sub>2</sub>–TiO<sub>2</sub> and its application in chlorophyll dye-sensitized solar cell with reduced graphene oxide as counter electrodes. *Bull. Mater. Sci.* 38, 1129–1133. <https://doi.org/10.1007/s12034-015-0991-z>
- Pandohee, J., Stevenson, P.G., Conlan, X.A., Zhou, X.-R., Jones, O.A.H., 2015. Off-line two-dimensional liquid chromatography for metabolomics: an example using *Agaricus bisporus* mushrooms exposed to UV irradiation. *Metabolomics* 11, 939–951. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0749-4>
- Park, S.-H., Sim, Y.-B., Kang, Y.-J., Kim, S.-S., Kim, C.-H., Kim, S., Seo, J.-Y., Lim, S.-M., Suh, H.-W., 2012. Hop Extract Produces Antinociception by Acting on Opioid System in Mice. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 16, 187–192. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2012.16.3.187>
- Pavlovic, R., Panseri, S., Giupponi, L., Leoni, V., Citti, C., Cattaneo, C., Cavaletto, M., Giorgi, A., 2019. Phytochemical and Ecological Analysis of Two Varieties of Hemp (*Cannabis sativa* L.) Grown in a Mountain Environment of Italian Alps. *Front. Plant Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01265>
- Pelletier, W., 1996. Alkaloids: chemical and biological perspectives. Volume 11, Alkaloids: chemical and biological perspectives. Pergamon, Oxford.
- Pepper, M.S., Hazel, S.J., Hümpel, M., Schleuning, W.-D., 2004. 8-prenylnaringenin, a novel phytoestrogen, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *J. Cell. Physiol.* 199, 98–107. <https://doi.org/10.1002/jcp.10460>
- Perucca, E., Bialer, M., 2020. Critical Aspects Affecting Cannabidiol Oral Bioavailability and Metabolic Elimination, and Related Clinical Implications. *CNS Drugs* 34, 795–800. <https://doi.org/10.1007/s40263-020-00741-5>
- Petrzilka, T., Haefliger, W., Sikemeier, C., Ohloff, G., Eschenmoser, A., 1967. [Synthesis and optical rotation of the (-)-cannabidiols]. *Helv. Chim. Acta* 50, 719–723. <https://doi.org/10.1002/hlca.19670500235>
- Phoa, F.K.H., Lin, D.K.J., 2015. A systematic approach for the construction of definitive screening designs. *Stat. Sin.* <https://doi.org/10.5705/ss.2013.311>
- Pokorný, J., Křivánek, J., Jezek, J., Pulkrábek, J., 2013. Characterization of changes in photosynthetic rate, transpiration and chlorophyll content during the hop growing season. *Acta Hort.* 1010, 163–168. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1010.19>
- Pollastro, F., Caprioglio, D., Marotta, P., Moriello, A.S., De Petrocellis, L., Tagliabatella-Scafati, O., Appendino, G., 2018. Iodine-Promoted Aromatization of *p*-Menthane-Type Phytocannabinoids. *J. Nat. Prod.* 81, 630–633. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00946>
- Powles, T., Poole, R., Shamash, J., Chaplin, T., Propper, D., Joel, S., Oliver, T., Liu, W.M., 2005. Cannabis-induced cytotoxicity in leukemic cell lines: the role of the cannabinoid receptors and the MAPK pathway. *Blood* 105, 1214–1221. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1182>

- Prencipe, F.P., Brighenti, V., Rodolfi, M., Mongelli, A., dall'Asta, C., Ganino, T., Bruni, R., Pellati, F., 2014. Development of a new high-performance liquid chromatography method with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection for the metabolite fingerprinting of bioactive compounds in *Humulus lupulus* L. *J. Chromatogr. A* 1349, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.097>
- Razdan, R.K., Dalzell, H.C., Handrick, G.R., 1974a. Hashish. X. Simple one-step synthesis of (-)-DELTA.1-tetrahydrocannabinol (THC) from p-mentha-2,8-dien-1-ol and olivetol. *J. Am. Chem. Soc.* 96, 5860–5865. <https://doi.org/10.1021/ja00825a026>
- Razdan, R.K., Dalzell, H.C., Handrick, G.R., 1974b. Hashish. X. Simple one-step synthesis of (-)-DELTA.1-tetrahydrocannabinol (THC) from p-mentha-2,8-dien-1-ol and olivetol. *J. Am. Chem. Soc.* 96, 5860–5865. <https://doi.org/10.1021/ja00825a026>
- Ribeiro Grijó, D., Vieitez Osorio, I.A., Cardozo-Filho, L., 2019. Supercritical Extraction Strategies Using CO<sub>2</sub> and Ethanol to Obtain Cannabinoid Compounds from *Cannabis* Hybrid Flowers. *J. CO<sub>2</sub> Util.* 30, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.12.014>
- Ross, S.A., ElSohly, M.A., 1996. The Volatile Oil Composition of Fresh and Air-Dried Buds of *Cannabis sativa*. *J. Nat. Prod.* 59, 49–51. <https://doi.org/10.1021/np960004a>
- Rubin, V.D. (Ed.), 1975. *Cannabis and culture*, World anthropology. Presented at the International Congress of Anthropological and Ethnological Sciences, Mouton, The Hague.
- Ruheel, M.A., Gomes, Z., Usman, S., Homayouni, P., Ng, J.Y., 2021. Facilitators and barriers to the regulation of medical cannabis: a scoping review of the peer-reviewed literature. *Harm. Reduct. J.* 18, 106. <https://doi.org/10.1186/s12954-021-00547-8>
- Russo, E.B., 2011. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1344–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x>
- Rutnik, K., Knez Hrnčič, M., Jože Košir, I., 2022. Hop Essential Oil: Chemical Composition, Extraction, Analysis, and Applications. *Food Rev. Int.* 38, 529–551. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1874413>
- Sajous, C.E. de M. (Charles E. de M., 1918. *Analytic cyclopedia of practical medicine*. Philadelphia, F. A. Davis.
- Sanz, V., Torres, M.D., Lopez Vilarino, J.M., Dominguez, H., 2022. Green extraction of phenolic compounds from Perle Hallertau and Nuggets hop pellets. *Food Biosci.* 50, 102044. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102044>
- Sarkar, A.K., Sadhukhan, S., 2023. Role of *Cannabis sativa* L. in the Cosmetic Industry: Opportunities and Challenges, in: *Cannabis Sativa Cultivation, Production, and Applications in Pharmaceuticals and Cosmetics*. IGI Global, pp. 81–100. <https://doi.org/10.4018/978-1-6684-5718-4.ch006>
- SATIVEX, solution pour pulvérisation buccale, Flacon 10 ml, 2014.
- Savinainen, J.R., Järvinen, T., Laine, K., Laitinen, J.T., 2001. Despite substantial degradation, 2-arachidonoylglycerol is a potent full efficacy agonist mediating CB1 receptor-dependent G-protein activation in rat cerebellar membranes. *Br. J. Pharmacol.* 134, 664–672. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704297>
- Schlag, A.K., Zafar, R.R., Lynskey, M.T., Athanasiou-Fragkouli, A., Phillips, L.D., Nutt, D.J., 2022. The value of real world evidence: The case of medical cannabis. *Front. Psychiatry* 13. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.1027159>
- Schmid, R., Heuckeroth, S., Korf, A., Smirnov, A., Myers, O., Dyrland, T.S., Bushuiev, R., Murray, K.J., Hoffmann, N., Lu, M., Sarvepalli, A., Zhang, Z., Fleischauer, M., Dührkop, K., Wesner, M., Hoogstra, S.J., Rudt, E., Mokshyna, O., Brungs, C., Ponomarov, K.,

- Mutabdžija, L., Damiani, T., Pudney, C.J., Earll, M., Helmer, P.O., Fallon, T.R., Schulze, T., Rivas-Ubach, A., Bilbao, A., Richter, H., Nothias, L.-F., Wang, M., Orešič, M., Weng, J.-K., Böcker, S., Jeibmann, A., Hayen, H., Karst, U., Dorrestein, P.C., Petras, D., Du, X., Pluskal, T., 2023. Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. *Nat. Biotechnol.* 41, 447–449. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01690-2>
- Schmid, R., Petras, D., Nothias, L.-F., Wang, M., Aron, A.T., Jagels, A., Tsugawa, H., Rainer, J., Garcia-Aloy, M., Dührkop, K., Korf, A., Pluskal, T., Kameník, Z., Jarmusch, A.K., Caraballo-Rodríguez, A.M., Weldon, K.C., Nothias-Esposito, M., Aksenov, A.A., Bauermeister, A., Albarracin Orio, A., Grundmann, C.O., Vargas, F., Koester, I., Gauglitz, J.M., Gentry, E.C., Hövelmann, Y., Kalinina, S.A., Pendergraft, M.A., Panitchpakdi, M., Tehan, R., Le Gouellec, A., Aleti, G., Mannochio Russo, H., Arndt, B., Hübner, F., Hayen, H., Zhi, H., Raffatellu, M., Prather, K.A., Aluwihare, L.I., Böcker, S., McPhail, K.L., Humpf, H.-U., Karst, U., Dorrestein, P.C., 2021. Ion identity molecular networking for mass spectrometry-based metabolomics in the GNPS environment. *Nat. Commun.* 12, 3832. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23953-9>
- Search - European Pharmacopoeia 11.4 [WWW Document], n.d. URL <https://pheur.edqm.eu/app/11-4/search/> (accessed 8.22.24).
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Shannon, S., Lewis, N., Lee, H., Hughes, S., 2019. Cannabidiol in Anxiety and Sleep: A Large Case Series. *Perm. J.* 23, 18–041. <https://doi.org/10.7812/TPP/18-041>
- Sharpe, F.R., Laws, D.R.J., 1981. The Essential Oil of Hops a Review. *J. Inst. Brew.* 87, 96–107. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1981.tb03996.x>
- Small, E., 2017. Classification of Cannabis sativa L. in Relation to Agricultural, Biotechnological, Medical and Recreational Utilization, in: Cannabis Sativa L. - Botany and Biotechnology. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_1)
- Small, E., Pocock, T., Cavers, P.B., 2003. The biology of Canadian weeds. 119. Cannabis sativa L. *Can. J. Plant Sci.* 83, 217–237. <https://doi.org/10.4141/P02-021>
- Śmiarowska, M., Białecka, M., Machoy-Mokrzyńska, A., 2022. Cannabis and cannabinoids: pharmacology and therapeutic potential. *Neurol. Neurochir. Pol.* 56, 4–13. <https://doi.org/10.5603/PJNNS.a2022.0015>
- Song, W., Yin, H., Zhong, Y., Wang, D., Xu, W., Deng, Y., 2022. Regional differentiation based on volatile compounds via HS-SPME/GC–MS and chemical compositions comparison of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds. *Food Res. Int.* 162, 112151. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112151>
- Stannard, J., 1982. Medicinal Plants and Folk Remedies in Pliny, “*Historia Naturalis*.” *Hist. Philos. Life Sci.* 4, 3–23.
- Stevens, J.F., Miranda, C.L., Buhler, D.R., Deinzer, M.L., 1998. Chemistry and Biology of Hop Flavonoids1. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56, 136–145. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-56-0136>
- Stevens, J.F., Page, J.E., 2004. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* 65, 1317–1330. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.025>
- Stevens, J.F., Taylor, A.W., Deinzer, M.L., 1999. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography–tandem mass

- spectrometry. *J. Chromatogr. A* 832, 97–107. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)01001-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)01001-2)
- Stolker, A.A.M., van Schoonhoven, J., de Vries, A.J., Bobeldijk-Pastorova, I., Vaes, W.H.J., van den Berg, R., 2004. Determination of cannabinoids in cannabis products using liquid chromatography–ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A, Mass Spectrometry: Innovation and Application. Part III* 1058, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.089>
- Sugiura, T., Kodaka, T., Nakane, S., Miyashita, T., Kondo, S., Suhara, Y., Takayama, H., Waku, K., Seki, C., Baba, N., Ishima, Y., 1999. Evidence That the Cannabinoid CB1 Receptor Is a 2-Arachidonoylglycerol Receptor: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP OF 2-ARACHIDONOYLGLYCEROL, ETHER-LINKED ANALOGUES, AND RELATED COMPOUNDS\*. *J. Biol. Chem.* 274, 2794–2801. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.5.2794>
- Surendran, S., Qassadi, F., Surendran, G., Lilley, D., Heinrich, M., 2021. Myrcene—What Are the Potential Health Benefits of This Flavouring and Aroma Agent? *Front. Nutr.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.699666>
- Szabo, B., Schlicker, E., 2005. Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handb. Exp. Pharmacol.* 327–365. [https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2\\_11](https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_11)
- Tacchini, M., Spagnoletti, A., Brighenti, V., Prencipe, F.P., Benvenuti, S., Sacchetti, G., Pellati, F., 2017. A new method based on supercritical fluid extraction for polyacetylenes and polyenes from *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. roots. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 146, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.053>
- Telichowska, A., Kobus-Cisowska, J., 2020. COMPARATIVE QUANTITATIVE STUDY ON PHYTOCHEMICAL CONTENTS OF HOPS (*Humulus lupulus* L.).
- Tiago, F.J., Paiva, A., Matias, A.A., Duarte, A.R.C., 2022. Extraction of Bioactive Compounds From Cannabis sativa L. Flowers and/or Leaves Using Deep Eutectic Solvents. *Front. Nutr.* 9.
- Touw, M., 1981. The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *J. Psychoactive Drugs* 13, 23–34. <https://doi.org/10.1080/02791072.1981.10471447>
- Tronina, T., Popłoński, J., Bartmańska, A., 2020. Flavonoids as Phytoestrogenic Components of Hops and Beer. *Molecules* 25, 4201. <https://doi.org/10.3390/molecules25184201>
- Turner, C.E., Elsohly, M.A., Boeren, E.G., 1980. Constituents of Cannabis sativa L. XVII. A Review of the Natural Constituents. *J. Nat. Prod.* 43, 169–234. <https://doi.org/10.1021/np50008a001>
- Vaillancourt, V., Albizati, K.F., 1992. A one-step method for the .alpha.-arylation of camphor. Synthesis of (-)-cannabidiol and (-)-cannabidiol dimethyl ether. *J. Org. Chem.* 57, 3627–3631. <https://doi.org/10.1021/jo00039a022>
- Van Cleemput, M., Cattoor, K., De Bosscher, K., Haegeman, G., De Keukeleire, D., Heyerick, A., 2009. Hop (*Humulus lupulus*)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. *J. Nat. Prod.* 72, 1220–1230. <https://doi.org/10.1021/np800740m>
- Van Opstaele, F., Goiris, K., De Rouck, G., Aerts, G., De Cooman, L., 2012. Production of novel varietal hop aromas by supercritical fluid extraction of hop pellets—Part 1: Preparation of single variety total hop essential oils and polar hop essences. *J. Supercrit. Fluids* 69, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.05.009>
- Velde, N.V. de, Verzele, M., 1986. High Performance Liquid Chromatography of Hop and Beer Extracts with Photodiode Array Detection. *J. Inst. Brew.* 92, 584–587. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04457.x>

- Venturelli, A., Brighenti, V., Mascolo, D., Pellati, F., 2019. A new strategy based on microwave-assisted technology for the extraction and purification of beeswax policosanols for pharmaceutical purposes and beyond. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 172, 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.04.015>
- Venturelli, S., Burkard, M., Biendl, M., Lauer, U.M., Frank, J., Busch, C., 2016. Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of cancer. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 32, 1171–1178. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.03.020>
- Verhagen, L.C., 1994. Beer flavour, in: Piggott, J.R., Paterson, A. (Eds.), *Understanding Natural Flavors*. Springer US, Boston, MA, pp. 211–227. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2143-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2143-3_14)
- Vicente de Andrade Silva, G., Demaman Arend, G., Antonio Ferreira Zielinski, A., Di Luccio, M., Ambrosi, A., 2023. Xanthohumol properties and strategies for extraction from hops and brewery residues: A review. *Food Chem.* 404, 134629. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134629>
- Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* 8, 303–313. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2)
- Vlad, R.-A., Antonoaea, P., Todoran, N., Muntean, D.-L., Rádai, E.M., Silași, O.A., Tătaru, A., Bîrsan, M., Imre, S., Ciurba, A., 2021. Pharmacotechnical and analytical preformulation studies for cannabidiol orodispersible tablets. *Saudi Pharm. J. SPJ* 29, 1029–1042. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.07.012>
- Wager-Miller, J., Westenbroek, R., Mackie, K., 2002. Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem. Phys. Lipids* 121, 83–89. [https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(02\)00151-2](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(02)00151-2)
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D., Watrous, J., Kaponov, C.A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A.V., Meehan, M.J., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P.D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R.D., Pace, L.A., Quinn, R.A., Duncan, K.R., Hsu, C.-C., Floros, D.J., Gavilan, R.G., Kleigrew, K., Northen, T., Dutton, R.J., Parrot, D., Carlson, E.E., Aigle, B., Michelsen, C.F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B.T., Gerwick, L., Liaw, C.-C., Yang, Y.-L., Humpf, H.-U., Maansson, M., Keyzers, R.A., Sims, A.C., Johnson, A.R., Sidebottom, A.M., Sedio, B.E., Klitgaard, A., Larson, C.B., Boya P, C.A., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D.J., Silva, D.B., Marques, L.M., Demarque, D.P., Pociute, E., O'Neill, E.C., Briand, E., Helfrich, E.J.N., Granatosky, E.A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J.J., Zeng, Y., Vorholt, J.A., Kurita, K.L., Charusanti, P., McPhail, K.L., Nielsen, K.F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M.F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O.B., Baric, R., Silva, R.R., Mascuch, S.J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P.G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A.M.C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B.M., Almaliti, J., Allard, P.-M., Phapale, P., Nothias, L.-F., Alexandrov, T., Litaudon, M., Wolfender, J.-L., Kyle, J.E., Metz, T.O., Peryea, T., Nguyen, D.-T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Müller, R., Waters, K.M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P.R., Palsson, B.Ø., Pogliano, K., Lington, R.G., Gutiérrez, M., Lopes, N.P., Gerwick, W.H., Moore, B.S., Dorrestein, P.C., Bandeira, N., 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* 34, 828–837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- Wang, Y., Yu, Q., Wang, X., Song, J., Lambo, M.T., Huang, J., He, P., Li, Y., Zhang, Y., 2023. Replacing alfalfa hay with industrial hemp ethanol extraction byproduct and Chinese wildrye hay: Effects on lactation performance, plasma metabolites, and bacterial

- communities in Holstein cows. *Front. Vet. Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1061219>
- Waterhouse, A.L., 2002. Determination of Total Phenolics. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* 6, I1.1.1-I1.1.8. <https://doi.org/10.1002/0471142913.fai0101s06>
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C.S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H., Luo, X., 2018. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. *Ultrason. Sonochem.* 48, 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018>
- Wianowska, D., 2014. Simplified Procedure of Silymarin Extraction from *Silybum marianum* L. Gaertner.
- Wilson, D.G., 1975. Plant Remains from the Graveney Boat and the Early History of *Humulus Lupulus* L. in W. Europe. *New Phytol.* 75, 627–648. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1975.tb01429.x>
- Wisniewska, A., Widomska, J., Subczynski, W.K., 2006. Carotenoid-membrane interactions in liposomes: effect of dipolar, monopolar, and nonpolar carotenoids. *Acta Biochim. Pol.* 53, 475–484.
- Xiao, L., Lin, D.K.J., Bai, F., 2012. Constructing Definitive Screening Designs Using Conference Matrices. *J. Qual. Technol.* 44, 2–8. <https://doi.org/10.1080/00224065.2012.11917877>
- Yano, H., Fu, W., 2023. Hemp: A Sustainable Plant with High Industrial Value in Food Processing. *Foods* 12, 651. <https://doi.org/10.3390/foods12030651>
- Zanoli, P., Zavatti, M., 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J. Ethnopharmacol.* 116, 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.011>
- Zhang, X., Liang, X., Xiao, H., Xu, Q., 2004. Direct characterization of bitter acids in a crude hop extract by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2003.09.014>
- Zhou, J., Liu, F., Li, X., Li, P., Yang, H., Liu, Y., Chen, Y., Wei, C., Li, H., 2021. A strategy for rapid discovery of traceable chemical markers in herbal products using MZmine 2 data processing toolbox: A case of Jing Liqueur. *Chin. Herb. Med.* 13, 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2021.05.004>



# Annexes







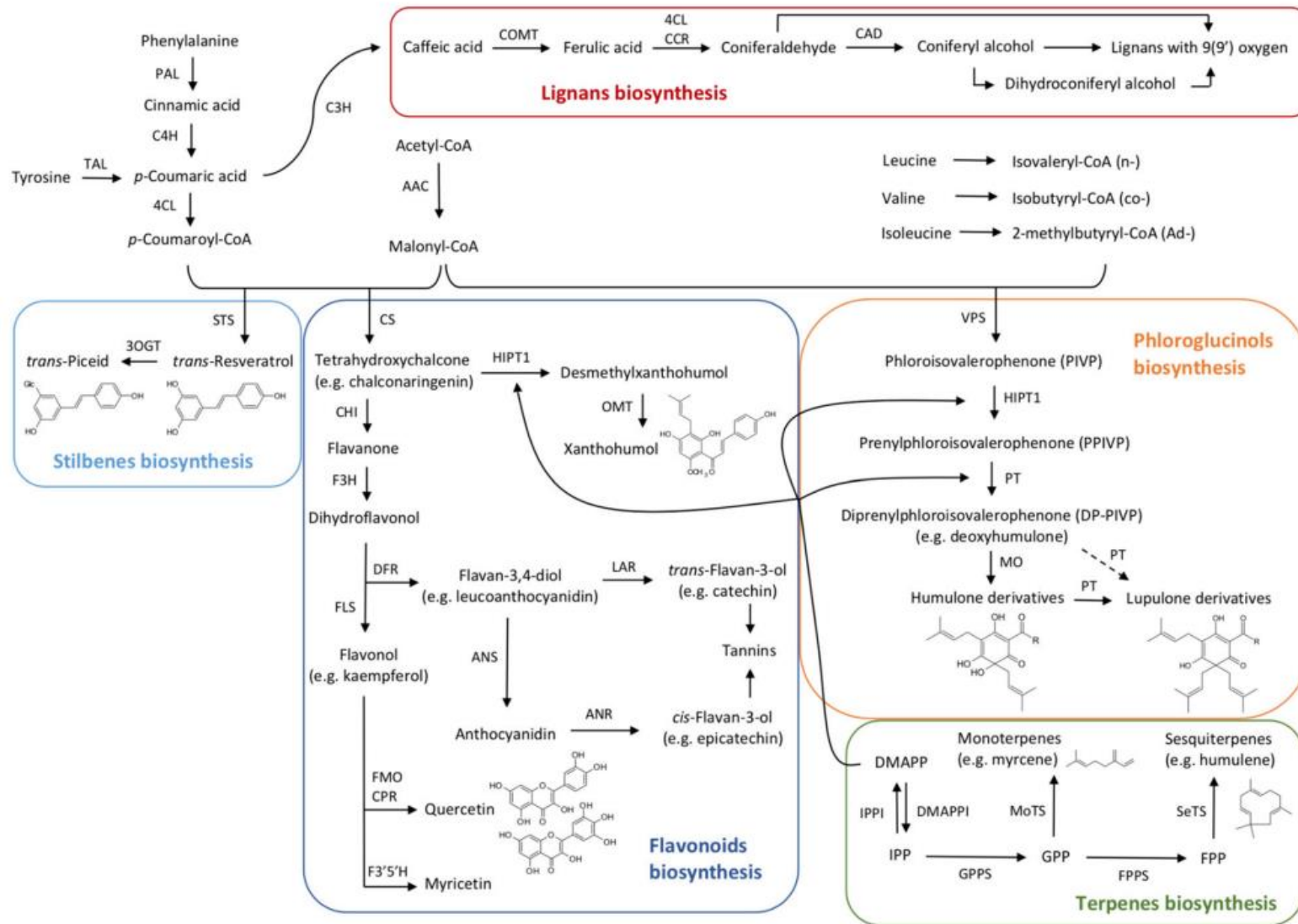
## Annexes

---

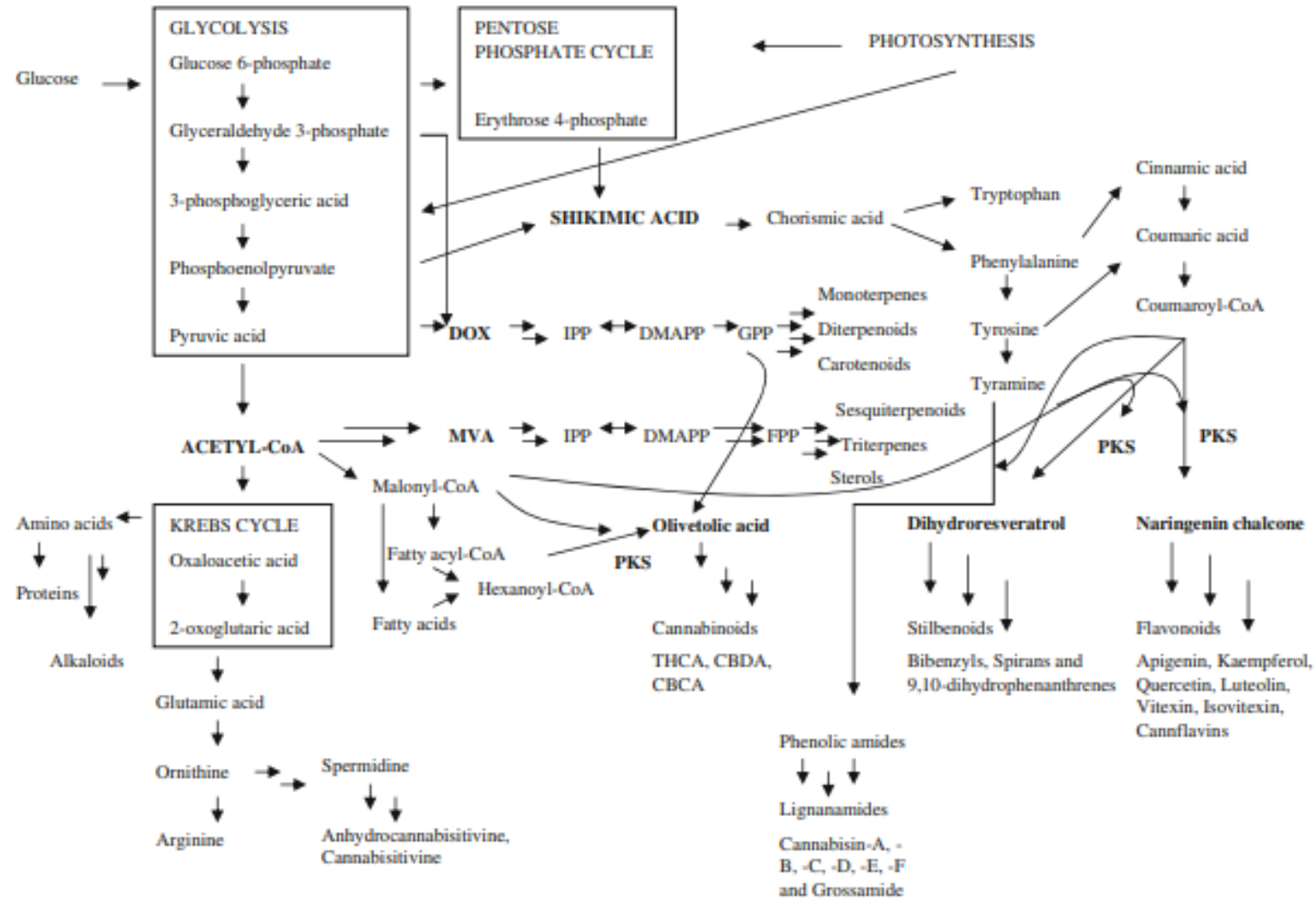
Annexe 1. Voies de biosynthèse des métabolites secondaires du houblon selon Bocquet et al.....	247
Annexe 2. Schéma général des voies métaboliques de <i>Cannabis sativa</i> L. selon Flores-Sanchez et al. ....	248
Annexe 3. Composés annotés des extraits de houblons selon les banque de données de GNPS et MS-DIAL, leurs temps de rétention (Rt), leurs ions moléculaires (m/z (-)), leurs courants d'ion total (TIC), leurs scores (Score) et les fragments d'ions des molécules....	249
Annexe 4. Récapitulatif de l'ensemble des molécules annotées des extraits de cannabis à partir de GNPS en fonction de leurs temps de rétention, leurs m/z, leurs adduits, leurs formules et noms, leurs scores et leurs fragments produits.....	250
Annexe 5. Molécules annotées des extraits de cannabis par SIRIUS en fonction de leurs temps de rétention, leurs m/z, leurs adduits, leurs formules et noms, leurs scores et leurs fragments produits .....	252
Annexe 6. RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du CBN .....	254
Annexe 7. RMN <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC (CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HMBC (CDCl <sub>3</sub> ) du CBN.....	255
Annexe 8. RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du d8-THC .....	256
Annexe 9. RMN <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC (CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HMBC (CDCl <sub>3</sub> ) du d8-THC.....	257
Annexe 10. RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du d9-THC .....	258
Annexe 11. RMN <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC (CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HMBC (CDCl <sub>3</sub> ) du d9-THC.....	259
Annexe 12. RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du THCA .....	260
Annexe 13. RMN <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC (CDCl <sub>3</sub> ) et RMN <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HMBC (CDCl <sub>3</sub> ) du THCA.....	261



Annexe 1. Voies de biosynthèse des métabolites secondaires du houblon selon Bocquet et al.



Annexe 2. Schéma général des voies métaboliques de *Cannabis sativa* L. selon Flores-Sanchez et al.



**Annexe 3. Composés annotés des extraits de houblons selon les banque de données de GNPS et MS-DIAL, leurs temps de rétention (Rt), leurs ions moléculaires (m/z (-)), leurs courants d'ion total (TIC), leurs scores (Score) et les fragments d'ions des molécules.**

Index	R <sub>t</sub> (min)	m/z (-) ESI- MS/MS	Formule chimique	Nom	Ecart de masse	TIC	Score	Fragments
211	2.182	179.061	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Glucose	0.0616	2.20E+04	85	113.0242, 95.0148, 89.0242, 71.0138, 59.0141, 43.0188
1548	13.050	187.102	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	Acide azélaïque	0.1028	1.10E+04	78	169.0873, 125.0965, 123.0818, 97.0650, 69.0336, 57.0343, 41.0032
2677	20.924	263.128	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	Acide hulupinique	0.1465	2.10E+04	87	235.1407, 194.0568, 193.0508, 151.0035, 125.9957, 123.0080, 70.0069
2180	18.062	329.231	NA	Acide gras (18:1+3O)	0.2292	1.20E+04	57	311.2208, 229.1448, 211.1325, 171.1018, 139.1113, 99.0799
3463	24.190	339.12	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	8-prenylnaringenine	0.1191	3.40E+04	68	245.0798, 219.0641, 175.0748, 133.0644, 119.0492, 93.0349
192	2.114	341.109	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Sucrose	0.1057	2.40E+04	76	179.0567, 161.0387, 119.0345, 89.0244, 59.0139
4798	32.021	347.181	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	Cohumulone	0.1812	3.40E+05	87	329.1735, 278.1134, 263.0902, 235.0603, 207.0655, 193.0492
3778	26.531	353.135	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	Xanthohumol	0.1343	2.60E+05	81	338.1124, 295.0589, 233.0808, 218.0574, 133.0657, 119.0498, 98.0012
2410	19.497	353.145	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	Isoxanthohumol	0.1337	2.70E+04	71	352.0238, 295.0608, 233.0806, 232.2548, 218.0569, 189.0893, 133.0657, 119.0499, 65.0032
162	2.0605	359.115	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	Junipediol A 8-glucoside	0.1153	1.10E+04	76	313.1099, 179.0546, 161.0458, 159.0279, 119.0351, 89.0244, 71.0138, 59.0141
5166	33.311	361.196	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	Humulone	0.1957	5.50E+05	92	361.1977, 343.1879, 292.1288, 249.0758, 224.0679, 221.0803
5824	36.064	399.245	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	Colupulone	0.2457	4.10E+05	94	330.1801, 287.1256, 275.1267, 262.118, 219.0647, 194.0570
1342	11.658	403.116	NA	Sweroside (M+FA-H)	0.117	3.00E+04	90	357.1168, 195.0660, 194.4701, 151.0777
4537	30.510	407.176	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	6-8-diprenylnaringenine	0.1768	1.30E+04	68	407.1804, 311.1635, 287.1264, 119.0499
6037	37.036	413.26	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	Lupulone	0.2599	3.50E+05	85	344.1964, 301.1415, 289.1427, 233.0803
5738	31.738	415.239	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub>	Hydroxytricyclocolupone	0.2387	2.00E+05	85	301.2144, 276.1347, 275.1269, 261.1115, 233.0804, 208.0728
5969	36.661	429.254	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub>	Hydroxytricyclocolupone	0.2542	1.70E+05	82	427.8955, 315.2294, 290.1496, 289.1417, 275.1265, 247.0955, 222.0872, 166.0263
1406	12.002	447.082	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	Astragaline	0.0822	6.70E+04	88	285.0390, 284.0312, 255.0289, 227.0352
1254	11.085	463.077	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	Isoquercetine	0.0768	8.50E+04	90	301.0334, 300.0256, 271.0232, 255.0280, 151.0019

**Annexe 4. Récapitulatif de l'ensemble des molécules annotées des extraits de cannabis à partir de GNPS en fonction de leurs temps de rétention, leurs *m/z*, leurs adduits, leurs formules et noms, leurs scores et leurs fragments produits**

Index	R <sub>t</sub> (min)	<i>m/z</i> (+) (ESI- MS/MS)	Adduits	Formule	Nom	MQScore	Fragments
80	18.7849	287.199	M+H	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	THCV	ND	69.0689 ; 81.0685 ; 81.0711 ; 91.0545 ; 93.0689 ; 107.081 ; 107.086 ; 109.101 ; 123.043 ; 135.113 ; 135.117 ; 153.091 ; 165.09 ; 179.105 ; 189.087 ; 189.094 ; 193.119 ; 203.104 ; 203.108 ; 203.112 ; 205.118 ; 205.122 ; 205.126 ; 207.135 ; 207.139 ; 219.135 ; 231.127 ; 231.133 ; 231.14 ; 287.2 ; 287.205
133	24.1093	303.1576	M+H	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	THCA-C1	ND	109.101 ; 123.117 ; 151.035 ; 163.038 ; 177.049 ; 177.054 ; 191.069 ; 191.075 ; 203.063 ; 203.068 ; 205.077 ; 205.082 ; 205.088 ; 205.092 ; 217.078 ; 217.084 ; 229.071 ; 229.083 ; 229.092 ; 243.099 ; 243.107 ; 285.146 ; 285.167
134	24.4853	311.1989	M+H	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	CBN	0.758	71.0849 ; 143.085 ; 157.101 ; 169.096 ; 180.092 ; 190.079 ; 194.108 ; 195.115 ; 199.109 ; 205.099 ; 208.087 ; 209.096 ; 209.131 ; 213.089 ; 219.119 ; 222.102 ; 223.11 ; 225.088 ; 237.126 ; 241.121 ; 265.195 ; 269.188 ; 275.177 ; 275.181 ; 278.164 ; 293.188 ; 311.198
203	26.8667	315.2291	M+H	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	THC	0.914	43.0539 ; 67.0531 ; 69.0689 ; 77.0372 ; 79.0532 ; 81.069 ; 91.0532 ; 93.0683 ; 107.084 ; 109.099 ; 111.042 ; 123.042 ; 123.115 ; 135.115 ; 137.058 ; 151.075 ; 165.088 ; 177.124 ; 181.12 ; 193.119 ; 207.135 ; 217.12 ; 221.151 ; 231.135 ; 233.15 ; 235.166 ; 245.147 ; 245.152 ; 247.166 ; 259.165 ; 273.182 ; 297.22 ; 315.227
188	26.7442	315.2291	M+H	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>		0.914	41.0379 ; 43.0537 ; 67.0533 ; 69.0691 ; 77.0374 ; 79.0529 ; 91.0529 ; 93.0685 ; 107.084 ; 109.1 ; 123.042 ; 123.116 ; 123.119 ; 135.115 ; 151.074 ; 165.089 ; 177.125 ; 181.12 ; 193.12 ; 221.152 ; 231.137 ; 233.152 ; 245.148 ; 245.152 ; 247.167 ; 259.167 ; 297.216 ; 315.228
105	20.1295	317.2457	M+H	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	CBG	0.918	67.0535 ; 69.0686 ; 79.053 ; 81.0687 ; 95.0481 ; 95.0831 ; 95.0872 ; 109.063 ; 123.043 ; 137.059 ; 193.102 ; 193.121 ; 207.133 ; 207.137 ; 233.152
217	29.6486	331.1886	M+H	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	THCVA	ND	69.0687 ; 93.0672 ; 93.0712 ; 98.9827 ; 109.099 ; 109.102 ; 123.115 ; 135.115 ; 137.059 ; 165.088 ; 165.092 ; 179.069 ; 191.069 ; 191.09 ; 205.073 ; 205.081 ; 205.087 ; 205.092 ; 205.102 ; 217.078 ; 217.082 ; 217.086 ; 219.095 ; 219.099 ; 229.077 ; 229.084 ; 231.101 ; 233.098 ; 233.114 ; 233.133 ; 245.11 ; 245.114 ; 245.125 ; 245.185 ; 245.191 ; 257.097 ; 257.116 ; 257.129 ; 271.107 ; 271.116 ; 271.13 ; 271.142 ; 285.181 ; 312.197 ; 313.177 ; 313.204 ; 331.181 ; 331.186
132	23.8919	333.2403	M+H	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	6,7- epoxy -CBG	ND	95.0837 ; 123.034 ; 123.037 ; 123.04 ; 123.045 ; 123.117 ; 135.115 ; 137.059 ; 193.103 ; 193.121 ; 193.135 ; 231.133 ; 231.138 ; 259.157 ; 259.162 ; 259.166 ; 259.171
254	35.6372	341.2087	M- H <sub>2</sub> O+H	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	THCA (M- H <sub>2</sub> O)	ND	67.0532 ; 81.0691 ; 93.0687 ; 109.1 ; 123.115 ; 135.115 ; 149.058 ; 161.059 ; 175.075 ; 177.09 ; 189.088 ; 201.087 ; 201.093 ; 207.1 ; 219.1 ; 233.115 ; 243.1 ; 245.115 ; 247.131 ; 257.116 ; 259.131 ; 261.146 ; 271.13 ; 273.145 ; 273.149 ; 285.146 ; 299.158 ; 299.163 ; 341.208
265	35.8036	341.2089	M- H <sub>2</sub> O+H	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>		ND	67.0534 ; 107.085 ; 109.1 ; 135.115 ; 201.085 ; 207.098 ; 207.102 ; 219.1 ; 219.104 ; 233.116 ; 233.12 ; 259.129 ; 259.141 ; 261.147 ; 261.156 ; 273.145 ; 273.159 ; 285.129 ; 285.146 ; 285.151 ; 285.155 ; 299.158 ; 299.163 ; 341.208 ; 341.235
275	35.9823	341.209	M- H <sub>2</sub> O+H	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>		ND	81.0683 ; 93.0681 ; 109.101 ; 135.116 ; 177.09 ; 201.087 ; 207.102 ; 219.081 ; 219.1 ; 233.116 ; 233.124 ; 243.098 ; 247.129 ; 247.134 ; 257.118 ; 259.125 ; 259.131 ; 261.139 ; 261.146 ; 271.128 ; 273.145 ; 273.149 ; 273.154 ; 273.161 ; 285.143 ; 285.148 ; 299.155 ; 299.16 ; 341.208
153	25.0399	343.2246	M- H <sub>2</sub> O+H	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	CBGA (M- H <sub>2</sub> O)	0.904	117.068 ; 135.039 ; 145.096 ; 149.059 ; 163.038 ; 177.056 ; 191.107 ; 201.087 ; 207.097 ; 219.099 ; 221.115 ; 233.117 ; 261.148 ; 261.153 ; 275.159 ; 287.161 ; 287.168 ; 343.224
235	33.1317	345.2041	M+H	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	THCA-C4	ND	205.081 ; 205.085 ; 247.131 ; 259.125 ; 259.129 ; 271.126 ; 271.137 ; 285.141 ; 285.146 ; 327.193 ; 327.218 ; 327.226
50	13.1745	347.2199	M+H	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	CBT	ND	43.0164 ; 43.0182 ; 107.084 ; 125.095 ; 193.117 ; 193.123 ; 217.113 ; 217.118 ; 217.122 ; 231.129 ; 231.133 ; 231.137 ; 243.172 ; 259.171 ; 271.167 ; 287.198 ; 287.202 ; 287.207 ; 311.192 ; 311.197 ; 329.204 ; 329.209

37	9.7786	349.2354	M+H	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	CBR	ND	193.119 ; 193.123 ; 231.136 ; 273.183 ; 313.195 ; 313.21 ; 313.215 ; 331.223 ; 349.235 ; 349.24
267	35.8246	359.2182	M+H	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	THCA	ND	55.0533 ; 67.053 ; 69.0686 ; 79.052 ; 81.0684 ; 107.084 ; 109.1 ; 123.042 ; 123.115 ; 135.115 ; 149.057 ; 161.057 ; 163.036 ; 175.073 ; 177.089 ; 179.107 ; 185.094 ; 189.086 ; 189.089 ; 191.104 ; 193.12 ; 207.099 ; 215.067 ; 229.083 ; 231.135 ; 233.115 ; 233.134 ; 243.098 ; 247.131 ; 257.115 ; 259.131 ; 259.165 ; 261.146 ; 273.145 ; 273.218 ; 281.15 ; 285.145 ; 313.207 ; 323.198 ; 340.133 ; 341.207 ; 341.984 ; 359.218
253	35.6325	359.2185	M+H	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>		ND	55.0537 ; 69.0688 ; 69.0711 ; 81.0693 ; 93.0683 ; 107.082 ; 107.085 ; 109.1 ; 123.115 ; 135.116 ; 149.057 ; 177.088 ; 177.094 ; 189.052 ; 189.088 ; 193.12 ; 201.085 ; 201.091 ; 203.105 ; 207.099 ; 207.104 ; 215.105 ; 219.099 ; 233.115 ; 243.099 ; 243.105 ; 245.116 ; 247.125 ; 257.149 ; 259.127 ; 259.132 ; 259.161 ; 267.134 ; 271.133 ; 271.142 ; 273.145 ; 285.217 ; 299.161 ; 313.212 ; 323.194 ; 340.131 ; 340.136 ; 341.207
154	25.0399	361.235	M+H	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	CBGA	0.850	69.0684 ; 69.0708 ; 135.037 ; 149.021 ; 163.031 ; 163.036 ; 177.05 ; 193.116 ; 193.12 ; 193.124 ; 201.087 ; 207.093 ; 207.099 ; 207.105 ; 218.411 ; 218.415 ; 219.098 ; 221.114 ; 233.115 ; 233.128 ; 237.108 ; 237.113 ; 261.145 ; 261.155 ; 275.159 ; 275.166 ; 287.156 ; 287.163 ; 343.191 ; 343.223
42	11.9885	377.2302	M+H	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	6,7- époxy -CBGA	ND	207.101 ; 219.087 ; 219.093 ; 219.099 ; 219.114 ; 259.125 ; 259.131 ; 277.134 ; 277.141 ; 277.148 ; 277.153 ; 341.203 ; 341.211 ; 359.182 ; 359.19 ; 359.196 ; 359.201 ; 359.207 ; 359.215 ; 359.22 ; 359.225 ; 359.236
67	16.1608	391.2092	M+H	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	CBTA	ND	219.098 ; 219.102 ; 313.177 ; 313.195 ; 355.185 ; 355.197 ; 373.174 ; 373.197 ; 373.22
19	2.8888	209.0799	M+H	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	Pyrenocin A	0.683	77.0369 ; 79.0537 ; 91.053 ; 103.051 ; 103.053 ; 105.069 ; 107.048 ; 120.054 ; 120.057 ; 131.047 ; 132.056 ; 133.064 ; 135.078 ; 139.074 ; 148.047 ; 148.051 ; 163.074 ; 163.091 ; 176.043 ; 181.085 ; 191.069 ; 209.074 ; 209.083
63	15.876	203.1785	M- H <sub>2</sub> O+H	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	Alismol (M-H <sub>2</sub> O)	0.736	41.0367 ; 55.0531 ; 55.0552 ; 67.0529 ; 69.0676 ; 69.0712 ; 77.0348 ; 77.0385 ; 79.0531 ; 81.0687 ; 91.0528 ; 93.0682 ; 93.0727 ; 95.0844 ; 105.069 ; 105.08 ; 107.084 ; 109.1 ; 119.084 ; 121.1 ; 123.116 ; 131.083 ; 133.092 ; 133.1 ; 147.115 ; 161.131 ; 161.136 ; 175.146 ; 203.176 ; 203.182
62	15.8601	221.1891	M+H	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	Alismol	ND	41.0378 ; 55.0538 ; 67.0536 ; 69.0676 ; 69.0712 ; 77.0385 ; 79.0513 ; 79.0551 ; 81.0689 ; 83.084 ; 91.0538 ; 93.0685 ; 95.0846 ; 97.0619 ; 97.0646 ; 105.068 ; 107.085 ; 109.1 ; 119.077 ; 119.083 ; 121.095 ; 121.101 ; 123.115 ; 133.1 ; 133.107 ; 147.115 ; 161.127 ; 161.131 ; 203.176 ; 203.18 ; 221.187
74	17.9817	205.1942	M+H	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	trans- Nerolidol	0.742	55.0532 ; 67.0533 ; 69.0665 ; 69.07 ; 77.0386 ; 79.0514 ; 79.0539 ; 81.0687 ; 91.0534 ; 93.0686 ; 95.084 ; 107.084 ; 121.101 ; 123.111 ; 123.114 ; 123.117 ; 135.116 ; 149.131
104	19.9775	205.1943	M+H	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	α- Bisabolol	0.866	55.0521 ; 55.0542 ; 55.0563 ; 67.0509 ; 67.0532 ; 67.0567 ; 69.0689 ; 77.0374 ; 79.0533 ; 81.069 ; 91.053 ; 91.0585 ; 93.0633 ; 93.0687 ; 95.0827 ; 95.0871 ; 107.083 ; 107.089 ; 109.098 ; 109.101 ; 109.104 ; 121.093 ; 121.096 ; 121.103 ; 149.127 ; 149.13



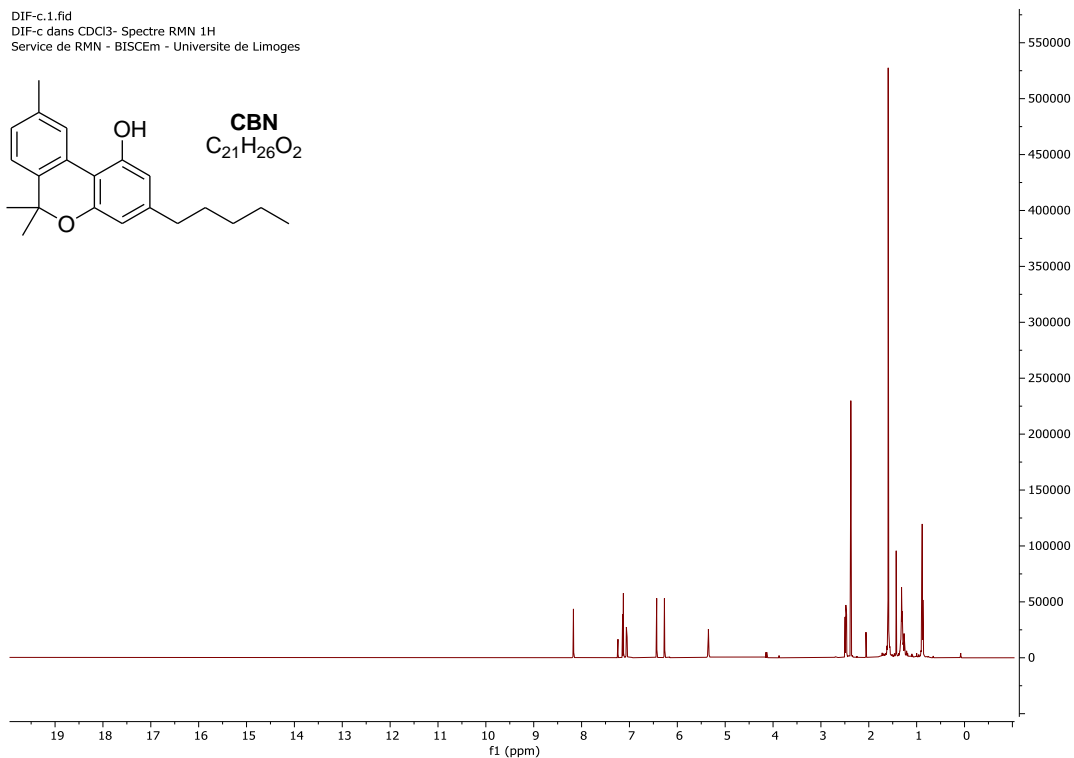
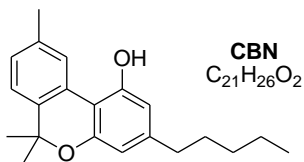
**Annexe 5. Molécules annotées des extraits de cannabis par SIRIUS en fonction de leurs temps de rétention, leurs m/z, leurs adduits, leurs formules et noms, leurs scores et leurs fragments produits**

Cluster Index	R <sub>t</sub> (min)	m/z (+) ESI-MS/MS	Adduits	Formule chimique	Nom	Fragments
5	1.0936	136.0611	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	Adénine	65.0123; 67.0276; 92.0214; 92.0241; 94.0381; 94.0422; 109.05; 119.034; 136.06
7	1.1716	138.054	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	Trigonelline	39.0208; 41.0384; 51.0235; 52.0315; 53.0371; 53.0401; 65.0388; 66.034; 67.0495; 67.053; 67.0564; 77.0396; 78.0315; 78.034; 79.0386; 79.0411; 79.0461; 80.0508; 92.0486; 93.0564; 94.0627; 94.0654; 136.034; 136.037; 136.04; 138.054; 138.066
2	0.9331	144.1012	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	Ethyl L-prolinate	43.055; 68.0484; 69.8524; 70.0647
8	1.3988	158.0806	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Ethyl pyroglutamate	41.0378; 41.0405; 56.0489; 84.0439; 84.051
80	18.7849	287.199	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	THCV	69.0689 ; 81.0685 ; 81.0711 ; 91.0545 ; 93.0689 ; 107.081 ; 107.086 ; 109.101 ; 123.043 ; 135.113 ; 135.117 ; 153.091 ; 165.09 ; 179.105 ; 189.087 ; 189.094 ; 193.119 ; 203.104 ; 203.108 ; 203.112 ; 205.118 ; 205.122 ; 205.126 ; 207.135 ; 207.139 ; 219.135 ; 231.127 ; 231.133 ; 231.14 ; 287.2 ; 287.205
134	24.4853	311.1989	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	CBN	71.0849 ; 143.085 ; 157.101 ; 169.096 ; 180.092 ; 190.079 ; 194.108 ; 195.115 ; 199.109 ; 205.099 ; 208.087 ; 209.096 ; 209.131 ; 213.089 ; 219.119 ; 222.102 ; 223.11 ; 225.088 ; 237.126 ; 241.121 ; 265.195 ; 269.188 ; 275.177 ; 275.181 ; 278.164 ; 293.188 ; 311.198
188	26.7442	315.2291	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	d9-THC	41.0379 ; 43.0537 ; 67.0533 ; 69.0691 ; 77.0374 ; 79.0529 ; 91.0529 ; 93.0685 ; 107.084 ; 109.1 ; 123.042 ; 123.116 ; 123.119 ; 135.115 ; 151.074 ; 165.089 ; 177.125 ; 181.12 ; 193.12 ; 221.152 ; 231.137 ; 233.152 ; 245.148 ; 245.152 ; 247.167 ; 259.167 ; 297.216 ; 315.228
203	26.8667	315.2291	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	d9-THC	43.0539 ; 67.0531 ; 69.0689 ; 77.0372 ; 79.0532 ; 81.069 ; 91.0532 ; 93.0683 ; 107.084 ; 109.099 ; 111.042 ; 123.042 ; 123.115 ; 135.115 ; 137.058 ; 151.075 ; 165.088 ; 177.124 ; 181.12 ; 193.119 ; 207.135 ; 217.12 ; 221.151 ; 231.135 ; 233.15 ; 235.166 ; 245.147 ; 245.152 ; 247.166 ; 259.165 ; 273.182 ; 297.22 ; 315.227
105	20.1295	317.2457	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	CBG	67.0535 ; 69.0686 ; 79.053 ; 81.0687 ; 95.0481 ; 95.0831 ; 95.0872 ; 109.063 ; 123.043 ; 137.059 ; 193.102 ; 193.121 ; 207.133 ; 207.137 ; 233.152
132	23.8919	333.2403	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	6,7-Epoxy-CBG	95.0837 ; 123.034 ; 123.037 ; 123.04 ; 123.045 ; 123.117 ; 135.115 ; 137.059 ; 193.103 ; 193.121 ; 193.135 ; 231.133 ; 231.138 ; 259.157 ; 259.162 ; 259.166 ; 259.171
208	26.9386	347.2587	[M + H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	THCH	81.0692; 93.0648; 93.0689; 107.084; 109.101; 123.042; 123.117; 135.109; 135.113; 181.119; 181.123; 193.117; 193.121; 193.137; 207.134; 217.12; 221.148; 221.152; 221.158; 231.131; 231.14; 233.146; 233.153; 235.166; 247.166; 259.166; 259.171; 259.178; 315.207; 315.228
257	35.6688	355.1885	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	Acides gras	235.109; 235.118; 239.102; 253.078; 253.083; 253.087; 253.12; 263.105; 267.095; 267.102; 279.098; 281.115; 291.172; 295.161; 295.168; 301.157; 309.181; 309.186; 319.157; 319.167; 337.146; 337.176

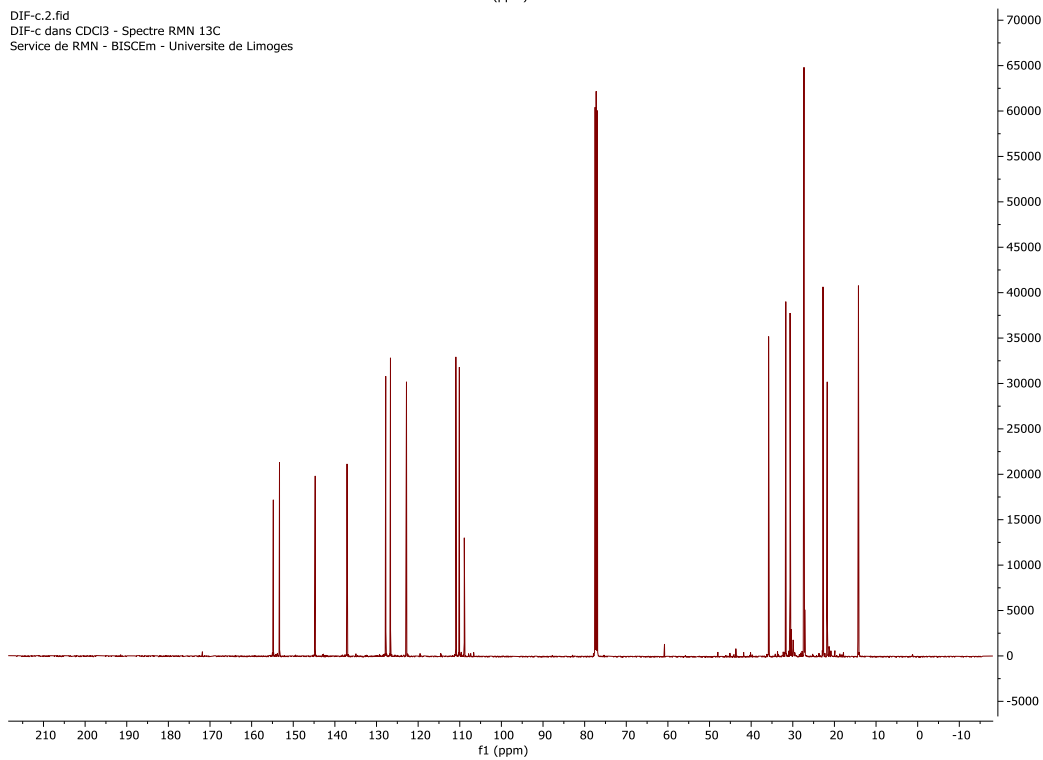
60	15.5748	363.2147	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	Acides gras	105.064; 105.067; 123.078; 123.082; 147.073; 147.078; 165.089; 165.099; 193.119; 193.124; 215.105; 219.095; 219.102; 257.15; 259.164; 259.17; 269.14; 269.149; 269.154; 285.141; 285.146; 285.155; 285.177; 285.182; 285.186; 287.162; 299.195; 299.202; 309.181; 327.186; 327.193; 327.198; 327.211; 345.187; 345.195; 345.2; 345.205; 345.213; 345.218
161	25.2836	373.1988	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	Acides gras	313.157; 313.172; 313.18; 313.194; 355.164; 355.175; 355.188; 355.204
163	25.3928	373.1998	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	Acides gras	219.093; 219.098; 313.125; 313.16; 313.176; 337.184; 355.167; 355.181; 355.186; 355.21
108	20.9697	375.2139	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	Acides gras	297.142; 297.147; 339.18; 339.185; 339.191; 339.196; 339.206; 357.176; 357.181; 357.2; 357.205; 357.213
72	17.5428	375.2147	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	Acides gras	133.098; 297.143; 297.15; 339.191; 339.199; 339.217; 357.187; 357.201; 357.214
314	38.9275	391.2815	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>	Acides gras	57.0695; 57.0716; 71.0836; 71.086; 149.022; 167.029; 167.033
43	12.0006	399.212	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> N <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	5-amino-2-[[5-amino-2-(2,5-diaminopentanoylamino)pentanoyl]amino]pentanoic acid	363.186; 381.153; 381.17; 381.194; 381.2; 381.222
240	35.4555	467.3473	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	b-hydroxy-4b-methyl-5a-cholest-7-ene-4a-carboxylate	287.161; 313.21; 313.215; 313.22; 325.21; 325.215; 343.222; 343.228; 343.235; 399.281; 449.35; 467.327; 467.336; 467.348; 467.354; 467.361

## Annexe 6. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sup>3</sup>) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sup>3</sup>) du CBN

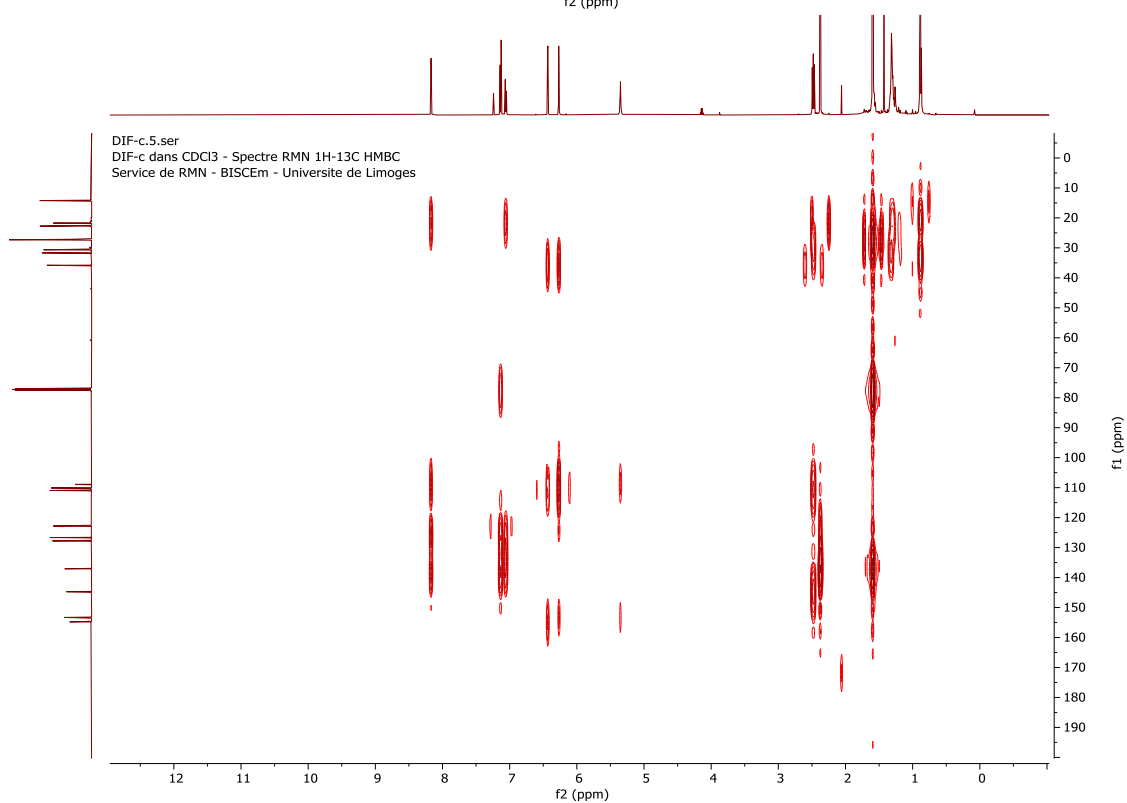
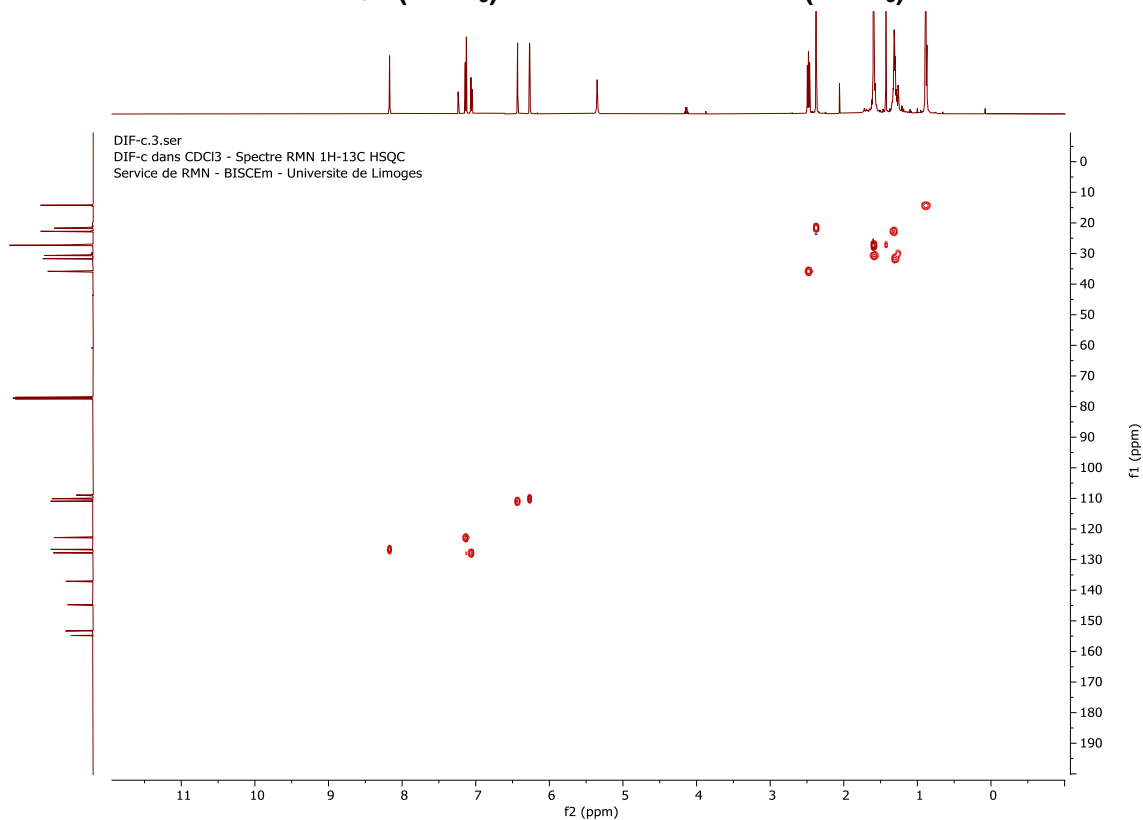
DIF-c.1.fid  
DIF-c dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN 1H  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



DIF-c.2.fid  
DIF-c dans CDCl<sub>3</sub> - Spectre RMN 13C  
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

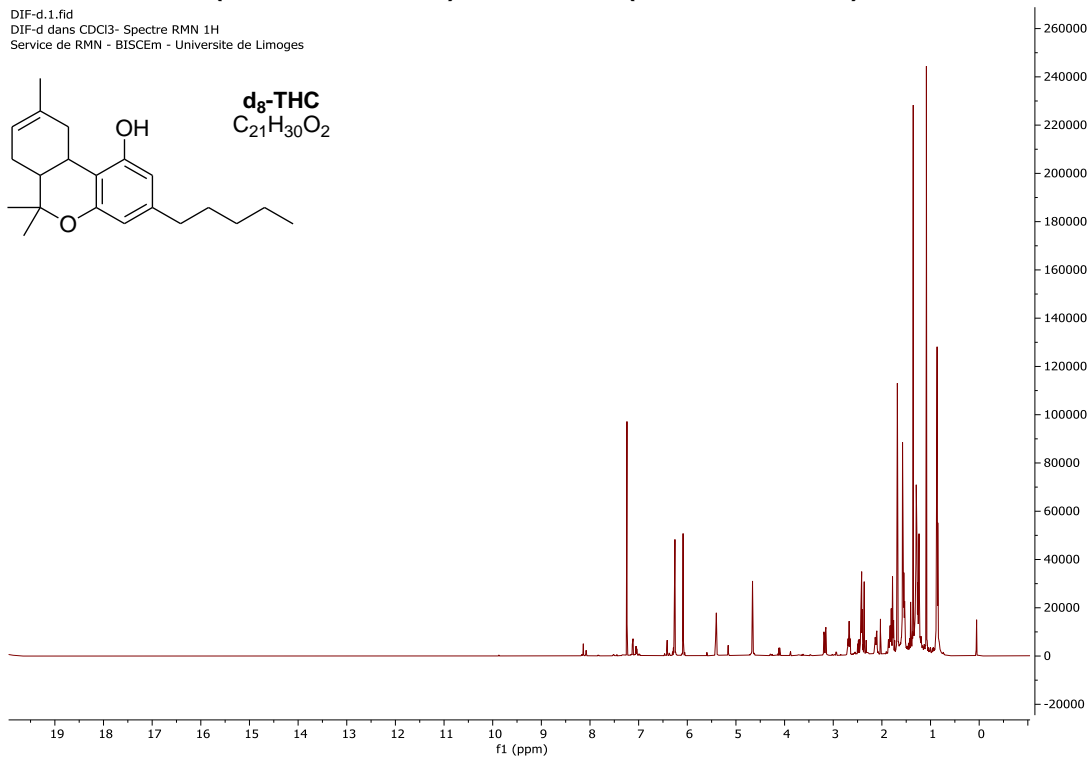
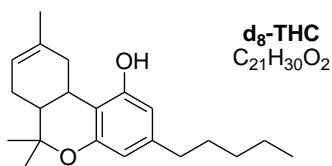


## Annexe 7. RMN $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC ( $\text{CDCl}_3$ ) et RMN $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC ( $\text{CDCl}_3$ ) du CBN

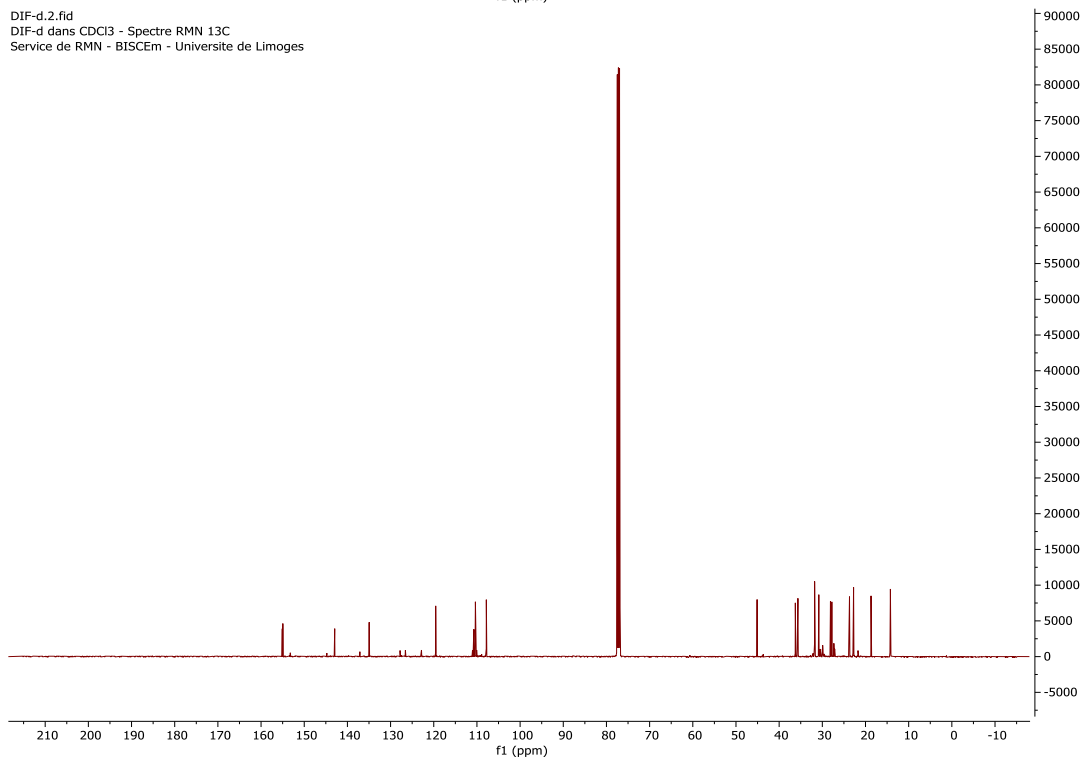


## Annexe 8. RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) et RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du d<sub>8</sub>-THC

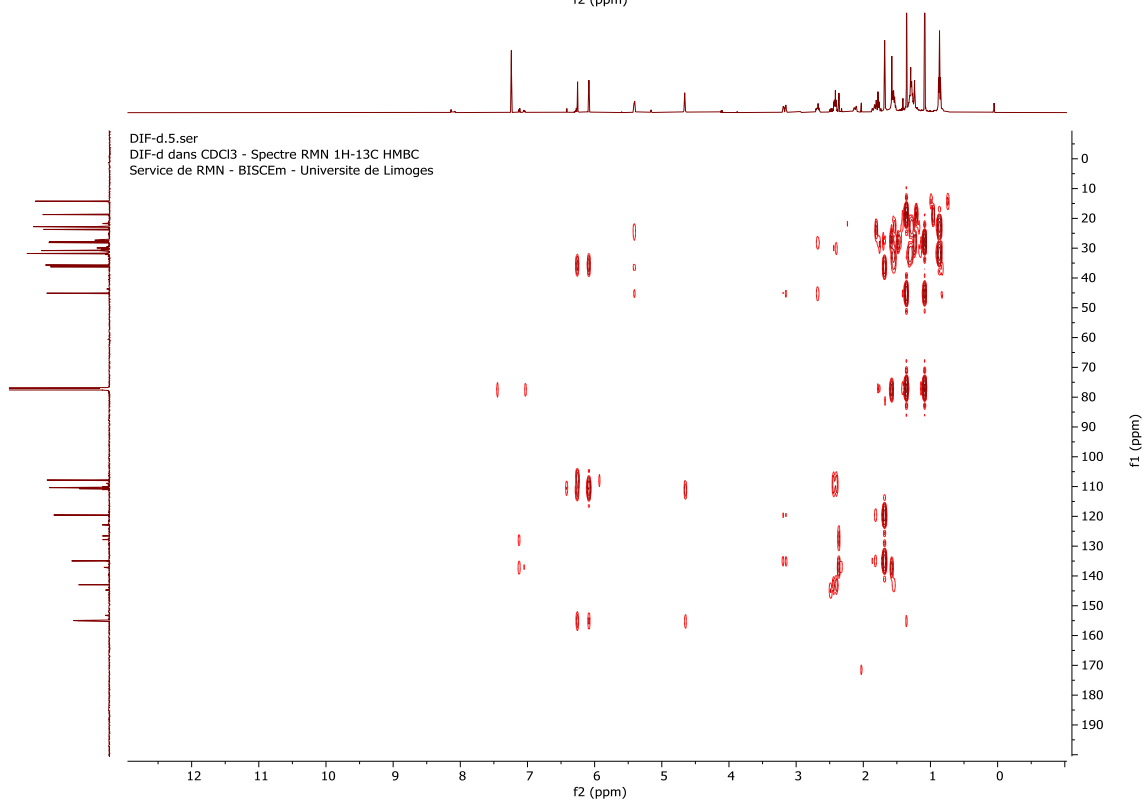
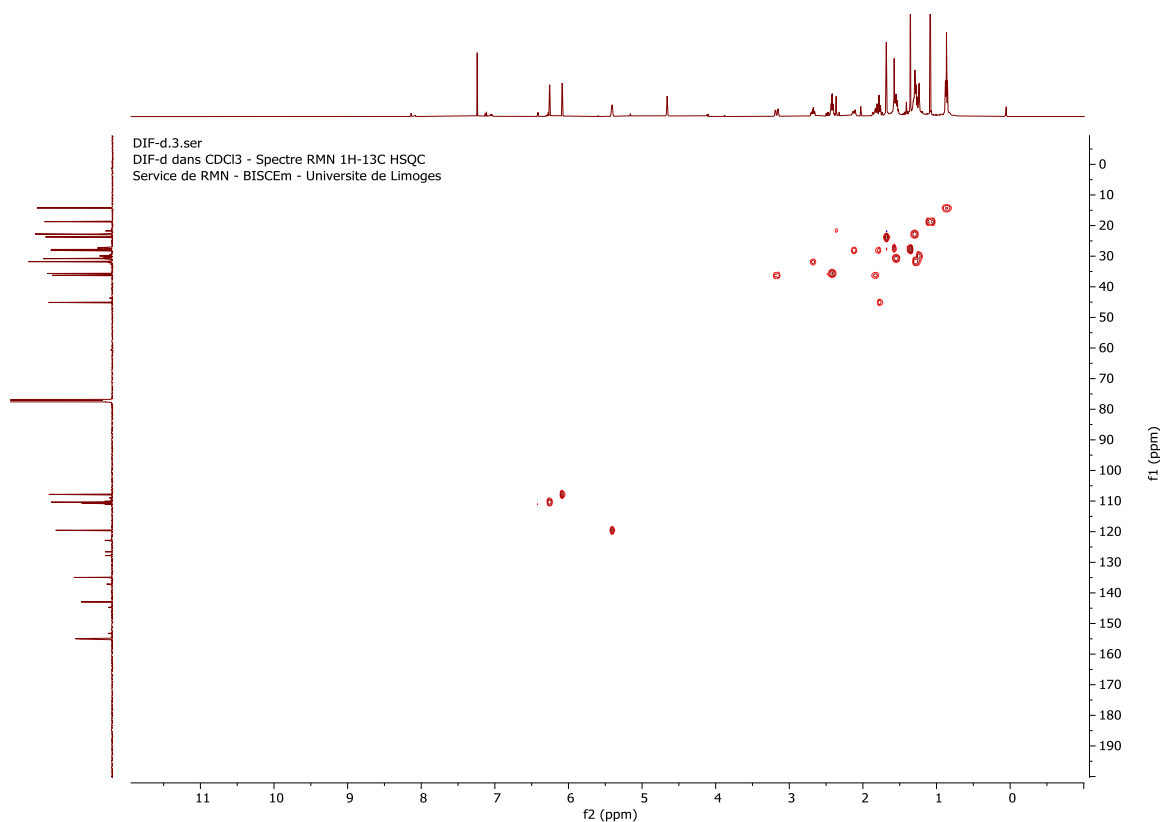
DIF-d.1.fid  
DIF-d dans  $\text{CDCl}_3$  - Spectre RMN  $^1\text{H}$   
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



DIF-d.2.fid  
DIF-d dans  $\text{CDCl}_3$  - Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges

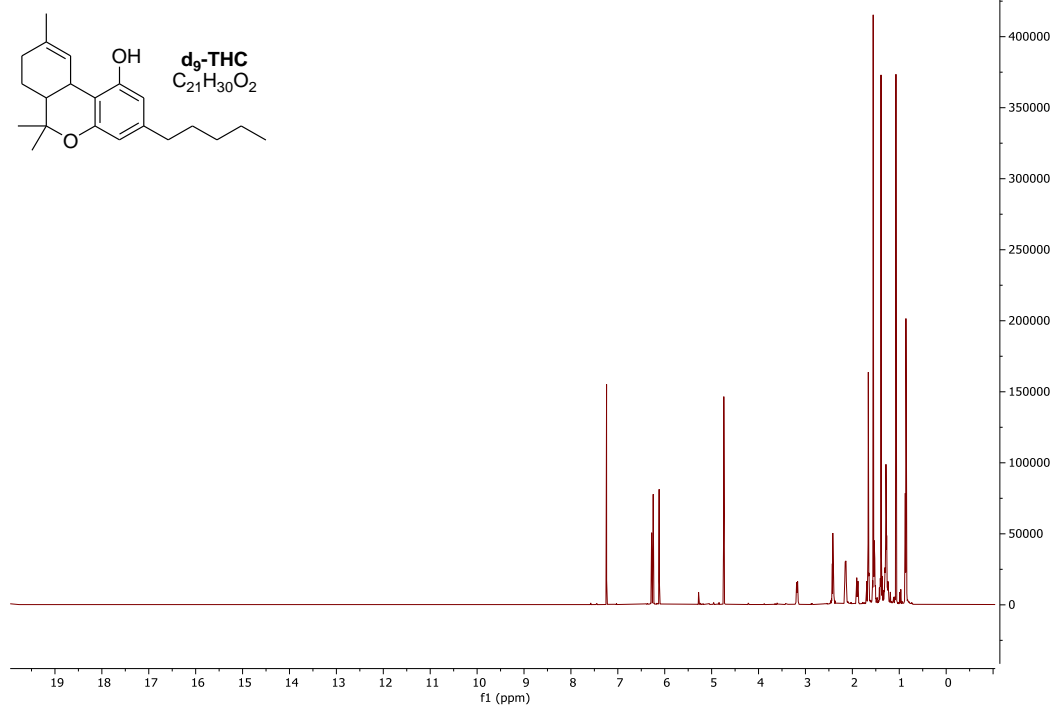


## Annexe 9. RMN $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC ( $\text{CDCl}_3$ ) et RMN $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC ( $\text{CDCl}_3$ ) du d8-THC

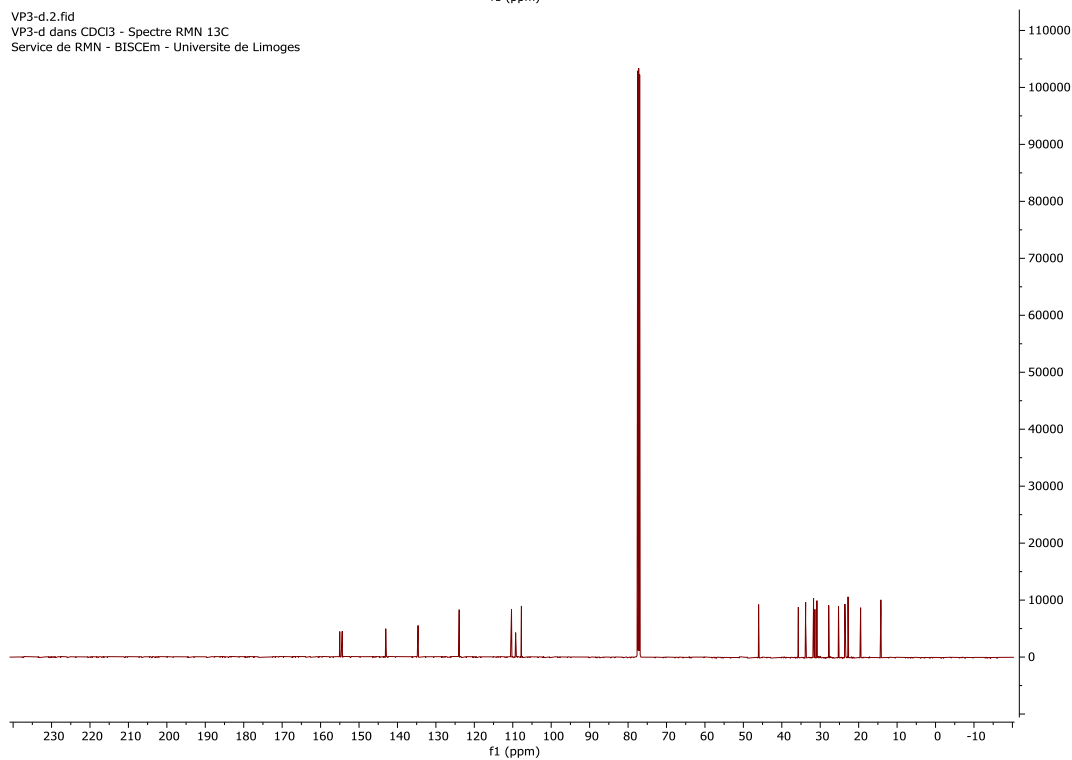


## Annexe 10. RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) et RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du d $_9$ -THC

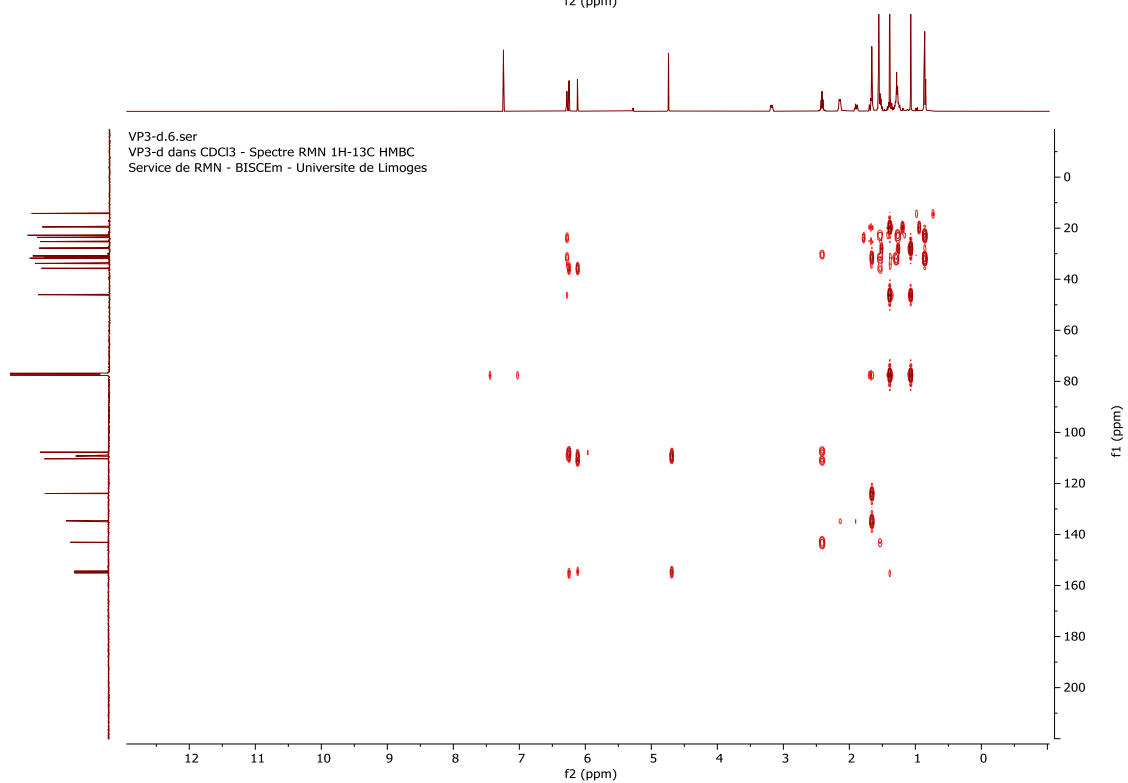
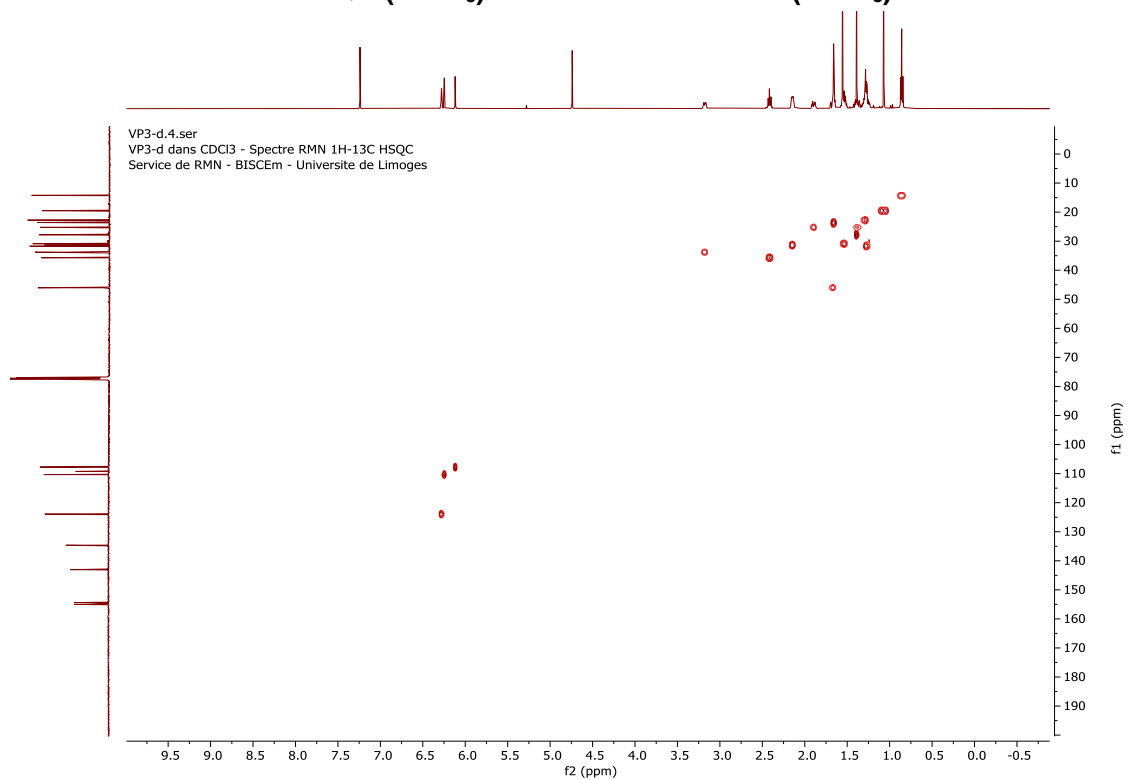
VP3-d.1.fid  
VP3-d dans  $\text{CDCl}_3$  - Spectre RMN  $^1\text{H}$   
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



VP3-d.2.fid  
VP3-d dans  $\text{CDCl}_3$  - Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



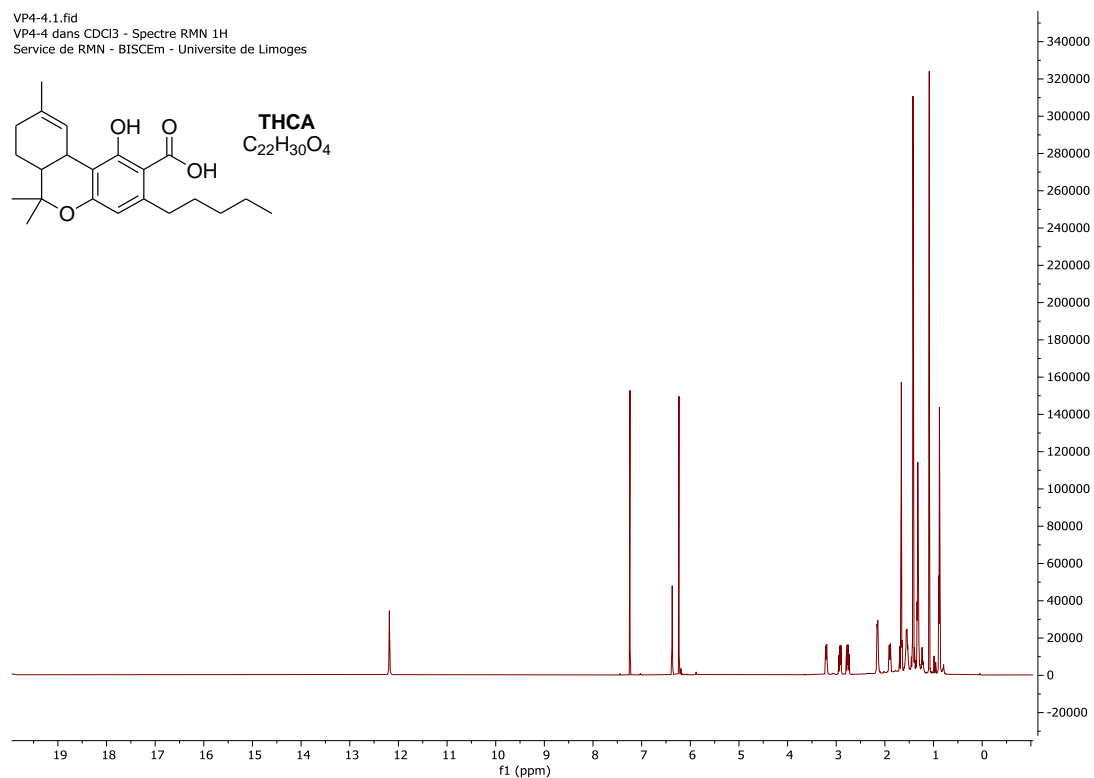
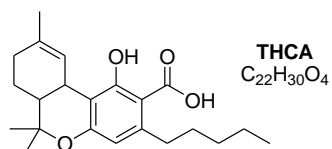
## Annexe 11. RMN $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC ( $\text{CDCl}_3$ ) et RMN $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC ( $\text{CDCl}_3$ ) du d9-THC



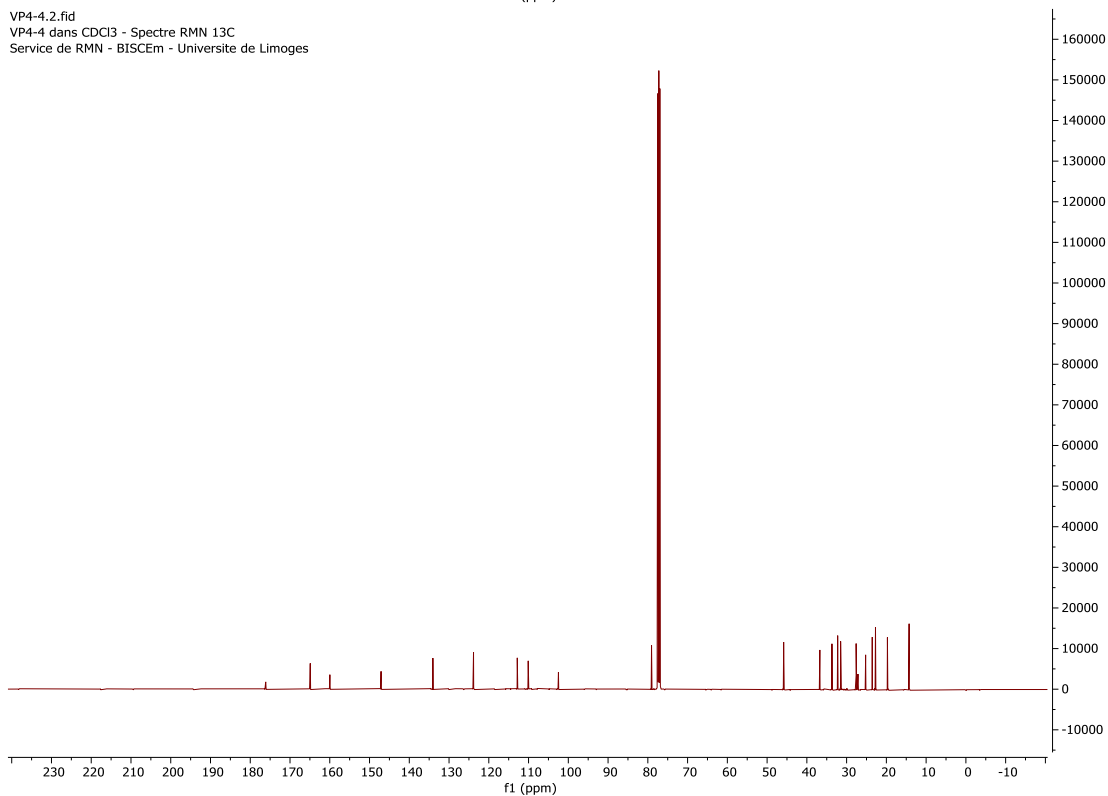


## Annexe 12. RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) et RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) du THCA

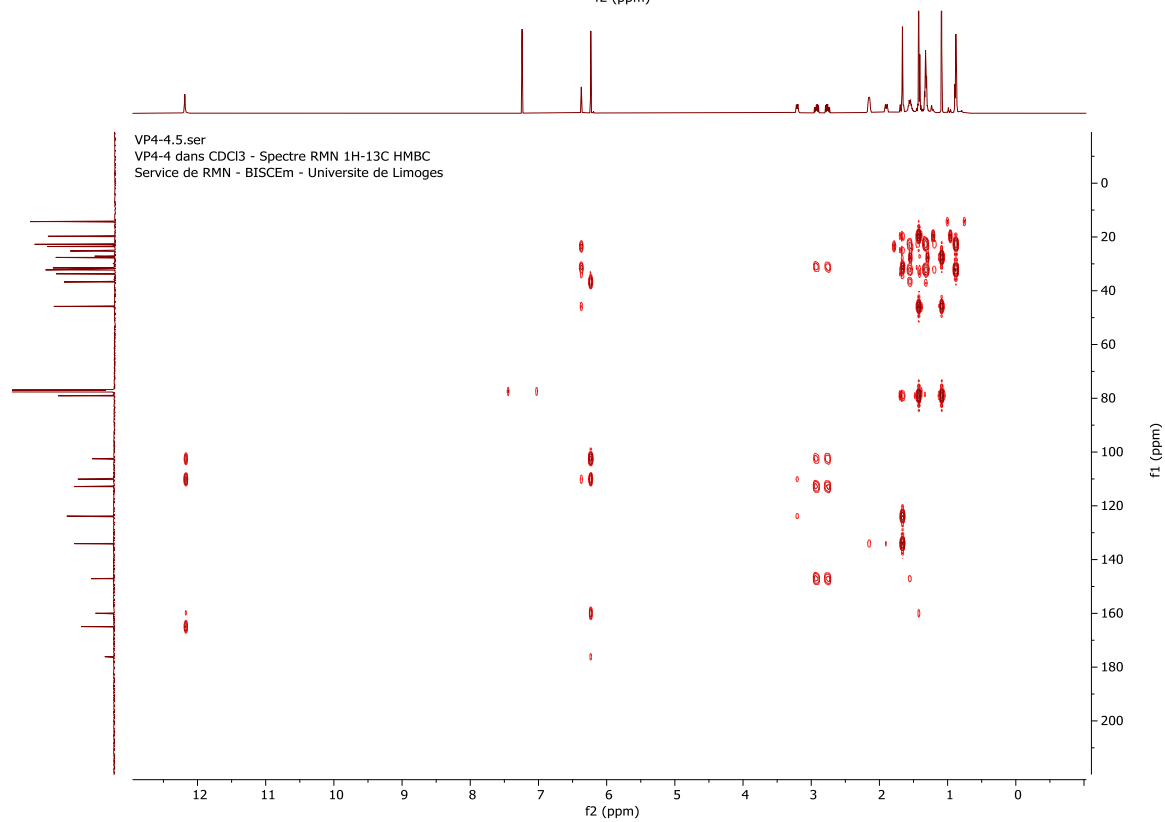
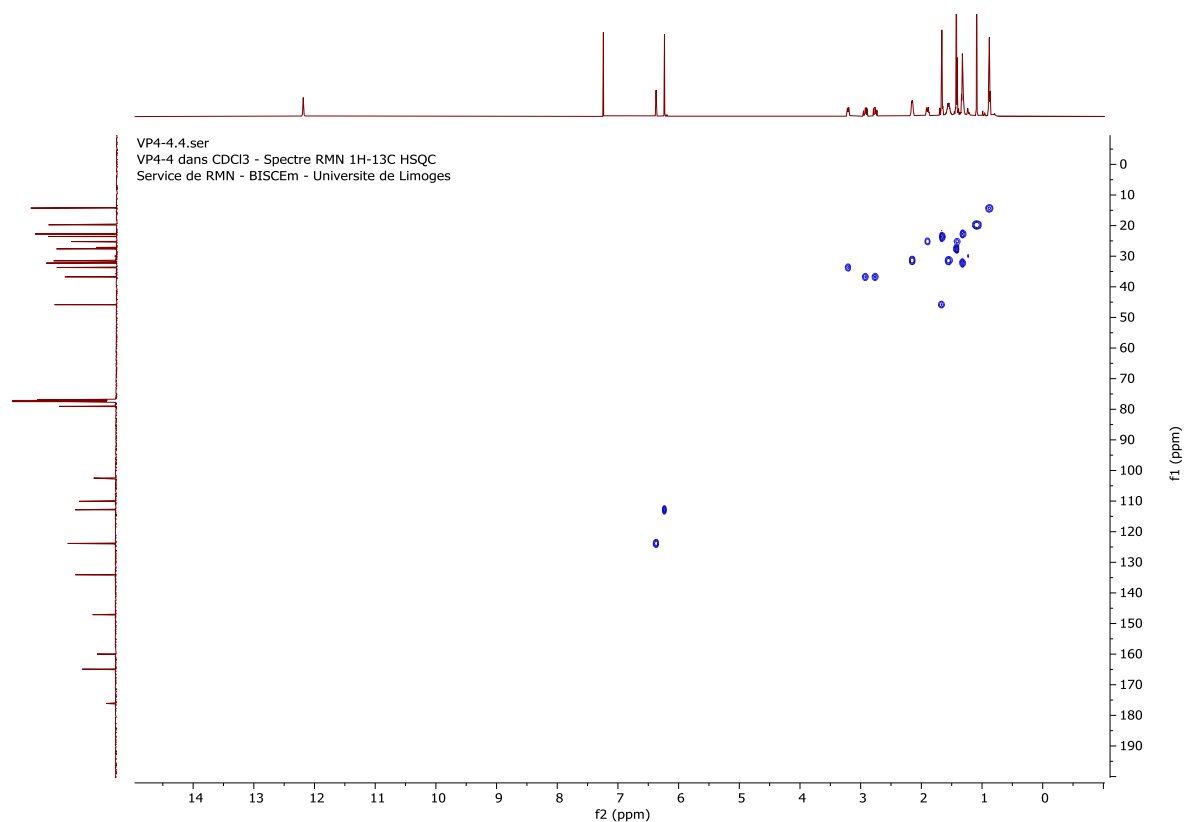
VP4-4.1.fid  
VP4-4 dans  $\text{CDCl}_3$  - Spectre RMN  $^1\text{H}$   
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



VP4-4.2.fid  
VP4-4 dans  $\text{CDCl}_3$  - Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   
Service de RMN - BISCEM - Université de Limoges



### Annexe 13. RMN $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC ( $\text{CDCl}_3$ ) et RMN $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC ( $\text{CDCl}_3$ ) du THCA







## Méthodes extractives, analytiques et d'amélioration de la biodisponibilité des principes actifs contenus dans le *Cannabis sativa* L.

---

Les plantes sont utilisées depuis des millénaires pour les traitements médicaux. *Cannabis sativa* L. est une plante très controversée, classée comme stupéfiants dans la majorité des pays. Les phytocannabinoïdes, métabolites secondaires sécrétés dans ses trichomes, ont la capacité de se fixer sur les récepteurs CB1 et CB2 du système endocannabinoïde de l'homme. Ce système participe à la régulation de multiples fonctions physiologiques de notre organisme, tels que la régulation de la douleur, de l'appétit etc. Le tétrahydrocannabinol (THC) ou cannabidiol (CBD) admettent donc des potentiels thérapeutiques en concentrations contrôlées. Ces travaux de thèse s'inscrivent au sein de l'expérimentation du cannabis thérapeutique sous l'égide de l'ANSM en France. Dans une première partie, une mise au point a été réalisée sur une plante modèle, *Humulus lupulus* L. appartenant aux cannabacées. Dans une seconde partie, une variété « THC dominant » de *Cannabis sativa* L. a été soumise à de multiples méthodes extractives (SE, UAE, MAE, PLE) permettant l'étude des rendements massiques ( $\approx 25\%$ ). Des dosages colorimétriques ont établis les TPC, TFC, TCC, TCCa et le pouvoir antioxydant des extraits. Les molécules volatiles ont été étudiées par HS-SPME-GC-MS et les phytocannabinoïdes par quantifications et déréplications (GNPS et SIRIUS) en LC-MS/MS. Les séparations et purifications ont permis d'obtenir le THCA,  $\Delta 9$ -THC,  $\Delta 8$ -THC et CBN, dont la structure moléculaire a été vérifiée par RMN 1D et 2D. Des études statistiques (Désirabilité globale, TOPSIS) et plan d'expérience (DSD) ont permis d'optimiser les méthodes extractives en fonction des résultats précédents. Enfin, des essais de formulations conformes à la Pharmacopée Européenne ont été réalisés proposant des comprimés sublinguaux de CBD.

---

Mots-clés : *Cannabis sativa* L., *Humulus lupulus* L., Métabolites, Extractions végétales, Quantifications, Purifications, Formulations, Statistiques, LC-MS/MS, Réseaux moléculaires

## Extractive and analytical methods for improving the bioavailability of the active ingredients contained in *Cannabis sativa* L.

---

Plants have been used for medicinal treatments for thousands of years. *Cannabis sativa* L. is a controversial plant, classified as a narcotic in most countries. Phytocannabinoids, secondary metabolites secreted in trichomes, have the ability to bind to CB1 and CB2 receptors in the human endocannabinoid system. This system is involved in regulating many of our body's physiological functions, such as pain and appetite. Tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) therefore have therapeutic potential in controlled concentrations. This thesis work is part of the experimentation with therapeutic cannabis under the aegis of the ANSM in France. In the first part, all the experiments were carried out on a model plant, *Humulus lupulus* L., belonging to the cannabaceae family. In the second part, a 'THC dominant' variety of *Cannabis sativa* L. was subjected to multiple extractive methods (SE, UAE, MAE, PLE) to study mass yields ( $\approx 25\%$ ). Colorimetric assays established the TPC, TFC, TCC, TCCa and antioxidant power of the extracts. Volatile molecules were studied by HS-SPME-GC-MS and phytocannabinoids by quantifications and dereplications (GNPS and SIRIUS) in LC-MS/MS. Separations and purifications yielded THCA,  $\Delta 9$ -THC,  $\Delta 8$ -THC and CBN, whose molecular structure were verified by 1D and 2D NMR. Statistical studies (Global Desirability, TOPSIS) and experimental design (DSD) were used to optimise the extractive methods on the basis of the previous results. Lastly, formulation tests in compliance with the European Pharmacopoeia were carried out on CBD sublingual tablets.

---

Keywords: *Cannabis sativa* L., *Humulus lupulus* L., Metabolites, Plant extractions, Quantifications, Purifications, Formulations, Statistics, LC-MS/MS, Molecular networks

