

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IDENTIFICATION, FRACTIONNEMENT ET PURIFICATION DES POLYPHENOLS DANS DES PLANTES
AQUATIQUES PAR DIFFÉRENTES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

À LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR

LINA DJOUDI

AVRIL 2026

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je rends grâce à Dieu Tout-Puissant pour m'avoir accordé la force, la volonté et la santé nécessaires à l'aboutissement de ce projet, fruit de deux années de travail au sein de l'Université du Québec à Montréal. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de recherche, la professeure Alexandra Furtos-Matei, pour la confiance qu'elle m'a accordée, son accueil au sein de son laboratoire, sa grande disponibilité et ses précieux conseils qui m'ont accompagnée tout au long de ce projet. J'exprime également mes sincères remerciements à ma co-encadrante, la chercheuse Naima El Mehdi, pour son soutien constant, son accompagnement précieux et la pertinence de ses recommandations tout au long de la réalisation de ce travail.

Je tiens à adresser mes remerciements à l'ensemble de l'équipe du CEPROCQ, et tout particulièrement M. Yacine Boumghar, ancien directeur, pour la confiance qu'il m'a témoignée en me permettant de participer à ce projet. Je remercie également nos partenaires industriels de Aplantex, M. Mourad Sabri et M. André Leblanc, pour leur soutien financier et la confiance qu'ils ont témoignée à l'égard de ce projet. Je remercie ainsi mes collègues de laboratoire, Marc-Antoine Vaudreuil et Karine Gilbert, pour leur disponibilité, leurs conseils et l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury, Pr Lekha Sleno et Pr Jacques Lesage qui, par leur corrections et commentaires ont contribué à l'amélioration de la qualité de ce travail. Je remercie par ailleurs Pr Ali Nazemi, directeur du Département de chimie, pour son encouragement et son soutien moral durant le cours de séminaire. Je souhaite également remercier l'ensemble des professeurs auprès desquels j'ai suivi des cours tout au long de ma formation. J'exprime ma profonde gratitude à mes parents, à mes sœurs et mon frère, ainsi qu'à mon époux pour son soutien constant, ses encouragements et sa présence rassurante. Mes remerciements s'adressent également à mes beaux-parents, à l'ensemble de ma famille, ainsi qu'à mes amies, Rana et Farida pour leur appui moral. Je tiens enfin à remercier toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet.

DÉDICACE

Avec ma profonde gratitude, je dédie ce modeste travail :

À mes très chers parents Rabah et Daouia, à qui je ne trouverai jamais assez de mots pour exprimer ma reconnaissance. Merci pour votre amour, vos sacrifices et votre présence tout au long de mon parcours.

À mon époux Ilimas, pour sa patience, sa compréhension et son appui sincère.

À mon cher frère Sofiane, pour son soutien et ses conseils.

À mes chères sœurs Asma, Djamila, Inès, Chaïma et Manar, pour leur affection et leur encouragement.

À toute ma famille sans oublier personne.

À tous ceux et celles qui m'ont soutenue et encouragée.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	x
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xiii
RÉSUMÉ.....	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 Les plantes aquatiques : une ressource renouvelable d'intérêt.....	3
1.1.1 Les plantes aquatiques dans l'environnement	3
1.1.2 Intérêt biotechnologique et valorisation industrielle.....	4
1.1.3 Les métabolites secondaires végétaux	5
1.1.3.1 Définition et rôles biologiques.....	5
1.1.3.2 Classes principales des métabolites secondaires végétaux.....	6
1.2 Les polyphénols.....	7
1.2.1 Structure, activité thérapeutique et intérêt analytique	7
1.2.2 Les flavonoïdes ciblés dans ce projet.....	9
1.3 Les anthocyanines et caroténoïdes dans les plantes aquatiques	11
1.3.1 Rôle des anthocyanines : pigments hydrosolubles.....	11
1.3.2 Les caroténoïdes : pigments lipophiles.....	11
1.4 Techniques d'extractions	12
1.4.1 Limites des méthodes d'extraction conventionnelles	12
1.4.2 L'extraction à l'eau subcritique : principe et avantages	13
1.4.3 L'extraction au CO ₂ supercritique : applications et spécificités.....	15
1.5 Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)	16
1.5.1 Principe de la LC et séparation des composés.....	16
1.5.2 Spectrométrie de masse : identification et quantification des analytes	18
1.6 Objectifs du projet de recherche	22
CHAPITRE 2 DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE SÉPARATION LC-MS POUR LES QUATRE FLAVONOÏDES CIBLÉES ET ADAPTATION À L'ÉCHELLE PRÉPARATOIRE POUR BUT DE PURIFICATION	23

2.1	Sélection des molécules ciblées.....	23
2.2	Préparations des échantillons.....	24
2.3	Optimisation de la méthode analytique LC-MS.....	24
2.4	Adaptation à l'échelle préparatoire.....	26
2.5	Collection des fractions : Collecte préparative et pureté des fractions isolées.....	27
2.6	Conclusion et perspectives.....	30

CHAPITRE 3 OPTIMISATION DE L'EXTRACTION DES POLYPHÉNOLS ET ANTHOCYANINES PAR EAU SUBCRITIQUE SELON UNE APPROCHE DOE.....31

3.1	Introduction.....	31
3.2	Plan d'expérience.....	31
3.2.1	Application du DOE à l'optimisation du procédé.....	31
3.2.2	Principes du DOE.....	32
3.2.3	Application de DOE dans ce projet.....	33
3.3	Méthodologie.....	33
3.3.1	Biomasse végétale.....	33
3.3.2	Étapes du procédé SWE.....	34
3.3.3	Stratégie de plan d'expérience pour l'extraction par l'eau surcritique (SWE).....	34
3.3.4	Extraction au CO ₂ supercritique (SEF).....	35
3.3.5	Étude de la cinétique de l'extraction à l'eau subcritique (SWE) sur les extraits optimaux.....	37
3.3.6	Méthodes conventionnelles de comparaison (macération et Soxhlet).....	37
3.4	Analyses des extraits.....	38
3.4.1	HPLC-DAD (flavonoïde d'intérêt).....	38
3.4.2	LC-MS (profil des composés).....	38
3.4.3	Dosage des polyphénols totaux (UV-Vis, Folin-Ciocalteu).....	39
3.4.4	Dosage des anthocyanes (UV-Vis, pH différentiel).....	40
3.5	Résultats et discussions.....	41
3.5.1	Optimisation des conditions d'extraction par SWE.....	41
3.5.2	Quantification ciblée des flavonoïdes d'intérêt par HPLC et analyse statistique.....	42
3.5.3	Analyse LC-MS des extraits obtenus par SFE.....	44
3.5.3.1	Évolution de l'intensité des molécules ciblées en fonction du temps d'extraction.....	44
3.5.3.2	Comparaison des méthodes d'extraction de 6 h en deux modes.....	46
3.5.3.3	Interprétation générale.....	47
3.5.4	Cinétique de SWE.....	48
3.5.5	Méthodes conventionnelles de référence pour la comparaison : (macération et Soxhlet).....	51
3.6	Conclusion.....	53

CHAPITRE 4 EXTRACTION DES CAROTÉNOÏDES PAR CO₂ SUPERCRITIQUE.....55

4.1	Introduction : Intérêt des caroténoïdes des plantes aquatiques.....	55
4.2	Choix du CO ₂ supercritique comme solvant pour l'extraction des caroténoïdes.....	56
4.3	Conditions expérimentales d'extraction SFE.....	56

4.4	Analyses des extraits par LC-MS	57
4.4.1	Préparation des échantillons	57
4.4.2	Conditions analytiques LC-MS	58
4.4.3	Génération de formules élémentaires à partir des masses exactes.....	59
4.5	Résultats et discussions.....	60
4.6	Conclusions	65
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	67
	ANNEXE A CINÉTIQUE DE L'EXTRACTION SWE	70
	ANNEXE B DONNÉES COMPLÉMENTAIRES.....	74
	BIBLIOGRAPHIE.....	77

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 (A) État physique de l'eau en fonction de la température et de pression; (B) Variation de la constante diélectrique de l'eau en fonction de la température, à (20 MPa) comparée aux valeurs mesurées pour plusieurs solvants organiques courants dans des conditions ambiantes (25 °C; 0,1 MPa).	14
Figure 1.2 Diagramme de phase du CO ₂	15
Figure 1.3 Représentation schématique d'un système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC).	17
Figure 1.4 Schéma d'un spectromètre de masse.	19
Figure 1.5 Schéma illustre le principe de l'ionisation par électrospray (ESI)	20
Figure 1.6 Schéma du Q-TOF Synapt G2S de Waters.	21
Figure 2.1 Chromatogramme UV (210-400 nm, en haut) et chromatogramme ionique total (TIC, en bas) de l'essai initial sur le mélange standard des quatre flavonoïdes, avec un gradient de 10 à 95% de méthanol sur 38 min.	25
Figure 2.2 Gradients d'élution utilisés pour l'optimisation de la séparation chromatographique.....	25
Figure 2.3 Chromatogramme UV (haut) et TIC (bas) d'un extrait brut analysé avec un gradient de 25 à 35% de méthanol sur 16 min, temps total 30 min.	26
Figure 3.1 Schéma du procédé d'extraction par l'eau subcritique.	34
Figure 3.2 Schéma du procédé d'extraction au CO ₂ supercritique.	36
Figure 3.3 Graphique des effets principaux pour la teneur totale en flavonoïdes selon les facteurs opératoires (Température A, Pression B, Ratio C).....	43
Figure 3.4 Graphique de détermination des profils des quatre molécules d'intérêt dans différents extraits de SFE.	45
Figure 3.5 Spectres de masse correspondant aux quatre molécules d'intérêt dans l'échantillon 5 heures en mode négatif (gauche) et positif (droite).	46
Figure 3.6 Comparaison des modes d'extraction continu (APL8) et a intermittence (APL9) pour les quatre molécules d'intérêt au bout de 6 heures, obtenus en mode négatif et positif.....	47
Figure 3.7 Chromatogrammes de base (BPC) des huit fractions obtenues en mode négatif pour l'essai optimisé 9.	49
Figure 4.1 Structure chimique de la zéaxanthine (C ₄₀ H ₅₆ O ₂).....	56

Figure 4.2 Profil du gradient d'élution utilisé pour la chromatographie.	58
Figure 4.3 Chromatogrammes du standard zéaxanthine, du haut vers le bas : chromatogramme ionique total (TIC) et chromatogramme extrait du m/z 568,42, et chromatogrammes UV-VIS à 450 nm, 280 nm, 254 nm.....	60
Figure 4.4 Spectres de masse de la zéaxanthine en haut, et celui de son isomère en bas, dans un standard de zéaxanthine.	61
Figure 4.5 Chromatogrammes de l'extrait SFE, présentant le TIC (haut) et le chromatogramme UV à 450 nm (bas) mettant en évidence les caroténoïdes.	62
Figure 4.6 Structure de β -carotène.	64
Figure 4.7 Chromatogramme ionique totale (TIC) et chromatogramme UV à 450 nm de l'extrait conventionnel.....	64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Structures, formules chimiques et poids moléculaires des flavonoïdes d'intérêt.	10
Tableau 2.1 Paramètres chromatographiques utilisés pour l'analyse ciblée.	27
Tableau 2.2 Pourcentage de pureté et masse collectée pour chaque fraction purifiée des quatre flavonoïdes extraits de Lemna minor.	29
Tableau 3.1 Conditions opératoires du plan d'expériences subcritique : masse de matière première, température, pression, ratio et débit appliqués pour chaque essai, incluant un point central en triplicata.....	35
Tableau 3.2 Rendement brut et teneur en polyphénols totaux des extraits obtenus par extraction subcritique selon les conditions expérimentales.	41
Tableau 3.3 Teneur en flavonoïdes dans les extraits subcritiques selon les conditions expérimentales...	43
Tableau 3.4 Identification des molécules les plus abondantes de l'essai 9 en mode négatif.....	50
Tableau 3.5 Résultats d'analyse des polyphénols totaux et des anthocyanes dans les extraits obtenus par macération hydroalcoolique selon différentes conditions de solvant.	51
Tableau 4.1 Identification des pics chromatographiques détectés par LC-MS en mode positif dans l'extrait SFE.	63
Tableau 4.2 Identification des pics chromatographiques détectés par LC-MS en mode positif dans l'extrait conventionnel.....	65

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AP-1	Activator Protein-1
AP7Glu	Apigénine-7-O-glucoside
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Ionisation chimique à pression atmosphérique)
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization (Photo-ionisation à pression atmosphérique)
BPC	Base Peak Chromatogram (Chromatogramme des pics de base)
Calc	Calculé
CÉPROCQ	Centre d'étude des procédés chimiques du Québec
CI	Chemical Ionization (Ionisation chimique)
CID	Collision Induced Dissociation (Dissociation induite par collision)
CO ₂	Dioxyde de carbone
CO ₂ -SC	Dioxyde de carbone supercritique
COX-2	Cyclooxygenase-2
COV	Composés organiques volatils
DAD	Diode Array Detector (Détecteur à barrette de diodes)
Diff	Différence
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOE	Design of Experiments (plan d'expériences)
EI	Electron Ionization (Ionisation électronique)
ESI	Electrospray Ionization (Ionisation par électronebulisation)
EtOH	Éthanol
Exp	Expérimentale
Fr	Fraction

FT-ICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (Résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier)
GAE	Gallic Acide Equivalents (Équivalents en acide gallique)
HCl	Acide Chlorhydrique
HCT116	Human Colorectal Carcinoma cell line (Lignée cellulaire humaine de carcinome colorectal)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie liquide à haute performance)
IL-6	Interleukin-6 (Interleukine-6)
KCl	Chlorure de potassium
LC	Liquid Chromatography (Chromatographie liquide)
LC-HRMS	Liquide Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution)
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LC/MS-MS	Liquid Chromatography-Tandem Masse Spectrometry (Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem)
LC-TOF-MS	Chromatographie liquide couplée à un analyseur temps de vol
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation (Désorption et ionisation laser assistée par matrice)
MeOH	Méthanol
Mp	Matière première
MS	Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse)
NF-KB	Facteur nucléaire Kappa B
pH	Potentiel hydrogène
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
Q	Quadripôle
Q-TOF	Quadrupole Time-of-Flight (Analyseur quadripôle-temps de vol)

ROS	Reactive Oxygen Species (Espèces réactives de l'oxygène)
RP-HPLC	Reversed-Phase HPLC (Chromatographie liquide en phase inverse)
SFE	Supercritical Fluid Extraction (Extraction par fluide supercritique)
SWE	Subcritical Water Extraction (Extraction à l'eau subcritique)
TIC	Total Ion Chromatogram (Chromatogramme ionique total)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha (Facteur de nécrose tumorale alpha)
TOF	Time of Flight (Temps de vol)
Tr	Temps de rétention
UHPLC-MS	Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (Chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse)
UV	Ultraviolet
UV-Vis	Spectroscopie ultraviolet-visible

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

°C	Degré Celsius
C	Carbone
cm	Centimètre
g	Gramme
h	Heure
kg	Kilogramme
l	Litre
λ	Langueur d'onde
m	Masse
m/z	Rapport masse/charge
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mm	Millimètre
mol	Mole
MPa	Mégapascal
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μm	Micromètre
nm	Nanomètre
ppm	Parties par million
T	Température

% Pourcentage

≈ Environ

RÉSUMÉ

Les plantes aquatiques de la famille des Lemnaceae notamment *Lemna minor*, représentent une biomasse renouvelable prometteuse en raison de leur croissance rapide et de leur richesse en composés bioactifs, en particulier les polyphénols tels que les flavonoïdes. Dans un contexte de développement durable, l'objectif de ce travail était de développer, optimiser et comparer différents procédés d'extraction écologiques, de fractionnement et de purification de composés d'intérêt. Deux approches vertes ont été explorées : l'extraction par CO₂ supercritique (SFE) et l'extraction par eau subcritique (SWE). Ces techniques sont reconnues pour leur capacité à moduler la sélectivité d'extraction tout en limitant l'utilisation de solvants organiques. Elles ont été comparées à des méthodes conventionnelles notamment la macération et l'extraction Soxhlet, afin d'évaluer leurs performances respectives. Dans une seconde étape, l'extraction par eau subcritique a été optimisée à l'aide d'une approche expérimentale basée sur le plan d'expérience (DOE), permettant de mettre en évidence l'influence de la température, de la pression et du ratio entre la masse solide et le solvant sur la composition chimique des extraits. Cette approche a permis d'identifier les conditions optimales favorisant l'extraction sélective des composés d'intérêt. Les résultats ont notamment mis en évidence l'importance du ratio solide/solvant et l'effet de la température sur l'efficacité d'extraction. Par ailleurs, l'extraction des caroténoïdes par CO₂ supercritique a révélé une meilleure diversité et intensité des composés détectés par la chromatographie liquide couplée à un analyseur temps de vol (LC-TOF-MS) par rapport aux extraits obtenus par la méthode classique. L'utilisation de la chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC-MS) a permis d'améliorer la résolution chromatographique et la sensibilité analytique, facilitant ainsi la caractérisation des biomolécules présentes dans l'extrait. Ces techniques offrent une identification fiable des composés grâce à leur haute résolution et leur précision de masse. Dans l'ensemble, les résultats obtenus démontrent l'intérêt de combiner des procédés d'extraction écologiques avec des techniques analytiques de haute résolution pour la valorisation des biomasses aquatiques. Cette approche ouvre la voie à des applications potentielles dans les domaines pharmaceutiques, nutraceutique, et de cosmétique. Elle répond également aux enjeux actuels liés au développement durable et à l'innovation dans les procédés d'extraction.

Mots clés :

Plantes aquatiques, polyphénols, flavonoïdes, caroténoïdes, eau subcritique, CO₂ supercritique, UHPLC-MS, plan d'expérience, procédés verts.

ABSTRACT

Aquatic plants of the Lemnaceae family, notably *Lemna minor*, represent a promising renewable biomass due to their rapid growth and their richness in bioactive compounds, particularly polyphenols such as flavonoids. In a context of sustainable development, the objective of this work was to develop, optimize, and compare different eco-friendly extraction, fractionation, and purification processes for compounds of interest. Two green approaches were explored: supercritical CO₂ extraction (SFE) and subcritical water extraction (SWE). These techniques are recognized for their ability to modulate extraction selectivity while reducing the use of organic solvents. They were compared with conventional methods, notably maceration and Soxhlet extraction, in order to evaluate their respective performance. In a second step, subcritical water extraction was optimized using a design of experiments (DOE) approach, to evaluate the influence of temperature, pressure, and the solid-to-solvent ratio on the chemical composition of the extracts. This strategy allowed the identification of optimal conditions favoring the selective extraction of compounds of interest. The results notably highlighted the importance of the solid-to-solvent ratio and the effect of temperature on extraction efficiency. Furthermore, the extraction of carotenoids by supercritical CO₂ revealed a greater diversity and higher signal intensity of compounds detected by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry (LC-TOF-MS), compared to extracts obtained by the conventional method. The use of ultra-high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UHPLC-MS) improved chromatographic resolution and analytical sensitivity, thus facilitating the characterization of biomolecules present in the extracts. These analytical techniques provide a reliable identification of compounds due to their high resolution and mass accuracy. Overall, the results obtained demonstrate the relevance of combining eco-friendly extraction processes with high-resolution analytical techniques for the valorization of aquatic biomass. This approach opens the way to potential applications in the pharmaceutical, nutraceutical, and cosmetic fields. It also addresses current challenges related to sustainable development and innovation in extraction processes.

Keywords:

Aquatic plants, polyphenols, flavonoids, carotenoids, subcritical water, supercritical CO₂, UHPLC-MS, design of experiments, green processes.

INTRODUCTION

Depuis des milliers d'années, les plantes jouent un rôle principal dans la vie sur terre en étant utilisées par l'être humain pour se soigner, souvent sans en maîtriser l'origine moléculaire (Petrovska, 2012). Avec l'introduction de la chimie moderne et le développement des techniques analytiques avancées, il est devenu possible d'isoler, d'identifier et de caractériser les métabolites secondaires. Ces progrès ont permis de reconnaître ces composés comme les principales molécules bioactives responsables des effets bénéfiques observés sur la santé (Dias et al., 2012). Ces substances naturelles sont cruciales afin de protéger les plantes contre les agressions environnementales et biotiques, et présentent un intérêt pharmacologique important pour la santé humaine (Elshafie et al., 2023; Reshi et al., 2023).

Parmi les végétaux étudiés, les plantes aquatiques représentent une biomasse renouvelable très prometteuse, mais leur exploitation reste encore limitée dans les études actuelles. Ces plantes se distinguent par une croissance extrêmement rapide, avec une doublure de la biomasse toutes les 2 à 3 jours sous des conditions optimales, ce qui démontre leur potentiel de productivité élevé (Xu et al., 2023). De plus, ces plantes montrent une grande adaptabilité, se développant également dans les milieux riches en azote et en phosphore tels que les stations d'épuration urbaines (Seferli et al., 2025), ce qui les rend utiles à la fois pour la dépollution naturelle et comme engrais dans le domaine agricole (Baldi et al., 2025; Zhou et al., 2023). Leur culture ne nécessite pas de terres arables spécifiques, ce qui n'interfère pas avec les pratiques agricoles traditionnelles. Cela est considéré comme un atout majeur dans une perspective de durabilité et de bioéconomie circulaire (Yao et al., 2017).

Ces plantes produisent naturellement des métabolites secondaires comme les polyphénols, et les caroténoïdes qui leur permettent de résister aux stress oxydatifs (Maoka, 2020; Panche et al., 2016). Ces substances possèdent également des propriétés pharmacologiques intéressantes. Plusieurs études ont montré qu'elles ont des effets antioxydants, anti-inflammatoires, antimicrobiens et même anticancéreux, ce qui ouvre la voie à des perspectives importantes pour leur intégration dans des produits de santé naturels, des compléments alimentaires ou des produits cosmétiques (Panche et al., 2016). Malgré leur richesse métabolique, ces biomasses restent peu exploitées à l'échelle industrielle, principalement en raison des limitations techniques liées à leur extraction. Les méthodes classiques souffrent d'un manque de sélectivité et de plus, elles utilisent des solvants toxiques, et ont une efficacité parfois faible dans le cas de matrices végétales complexes (Azmir et al., 2013). Par ailleurs, certains solvants organiques posent des

problèmes de sécurité, de coût et de compatibilité réglementaire pour des applications alimentaires ou pharmaceutiques. De ce fait, des méthodes durables et respectueuses de l'environnement ont été développées, incluant l'extraction à l'eau subcritique (SWE) et l'extraction au dioxyde de carbone supercritique (SFE). Ces techniques peuvent être utilisées de manière durable et efficace pour extraire une large gamme de composés, à la fois polaires et apolaires, en fonction des paramètres choisis (Herrero et al., 2006). Ces méthodes permettent de préserver la structure des métabolites sensibles à la chaleur tout en diminuant l'impact du procédé sur l'environnement. La caractérisation de ces extraits repose sur la capacité à analyser et à séparer les mélanges complexes de matrices végétales. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), est devenue un outil de référence dans ce domaine qui permet la séparation, et l'identification des métabolites présents même à très faible concentration. Cette approche analytique constitue un outil essentiel pour assurer la fiabilité et la reproductibilité des analyses de composés bioactifs (Kumar, 2017).

Dans le contexte de durabilité et de valorisation des ressources naturelles, les plantes aquatiques se distinguent aujourd'hui comme une source particulièrement prometteuse (Ujong et al., 2025). Leur richesse en biomolécules d'intérêt, associée à l'utilisation de procédés d'extraction écologiques et de technologies d'analyses avancées, ouvre la voie au développement de nouvelles approches durables intégrées à la bioéconomie verte.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Les plantes aquatiques : une ressource renouvelable d'intérêt

1.1.1 Les plantes aquatiques dans l'environnement

Les macrophytes aquatiques représentent une composante écologique majeure des écosystèmes d'eau douce, et ne se limitent pas à un seul rôle dans l'écosystème (J. Liu et al., 2025). Elles participent fortement aux processus du cycle des nutriments, à la purification naturelle de l'eau et aussi à la création d'habitats pour de nombreuses espèces. Plusieurs travaux ont mis en évidence leur capacité à éliminer efficacement divers polluants organiques et inorganiques, ce qui renforce la performance des systèmes de traitement des eaux usées basés sur les zones humides. Ces plantes sont réparties en quatre catégories différentes : émergentes (*Typha* spp), submergées (*Elodea canadensis*), à feuilles flottantes (*Nymphaea* spp) et flottantes (*Lemna* sp). Elles favorisent la capture des particules en suspension et contribuent à la stabilisation des sédiments, ce qui réduit la turbidité et améliore la clarté de l'eau. Elles sont aussi impliquées dans l'activité microbienne au sein du système de traitement, ce qui renforce leur efficacité globale. Leur capacité à absorber et transformer une large gamme de polluants en fait des candidates idéales pour la phytoremédiation des milieux aquatiques. Elles ont montré une efficacité remarquable dans l'élimination de nutriments tels que l'azote et le phosphore présents dans les eaux usées. Elles éliminent aussi les métaux lourds grâce à des mécanismes de phytoextraction et de phytotransformation. Par exemple, *Lemna minor* (matière première utilisée dans ce projet), *Eichhornia crassipes* et *Pistia stratiotes* ont démontré qu'elles ont une grande capacité à éliminer le chrome, le cuivre, le nickel, le plomb et le fer présent dans l'eau (Maranho & Gomes, 2024).

Grâce à une gestion adéquate des paramètres de culture, *Lemna minor* peut produire entre 10 et 30 tonnes de matière sèche par hectare dans une année, avec une composition nutritionnelle riche en protéines, en lipides et en éléments minéraux, ce qui en fait une biomasse prometteuse tant pour la valorisation agricole qu'industrielle (Leng et al., 1995). Cette croissance est influencée par divers facteurs tels que la température, la photopériode, l'intensité lumineuse, la biodisponibilité des nutriments et le pH (Pasos-Panqueva et al., 2024). Les macrophytes jouent un rôle fondamental dans les écosystèmes aquatiques à l'échelle mondiale, où elles contribuent à préserver la biodiversité, à maintenir l'équilibre écologique et à soutenir le bien-être humain. Elles assurent des services écosystémiques majeurs,

notamment la purification de l'eau, la séquestration du carbone, la création d'habitats pour une large diversité d'organismes aquatiques, ainsi que la régulation des inondations grâce à la stabilisation des sédiments par leurs systèmes racinaires. Ces fonctions sont essentielles à la santé environnementale et au développement humain durable (J. Liu et al., 2025). Leur usage dans les systèmes de traitement écologiques a fait ses preuves dans le traitement des eaux usées municipales, et ce procédé présente l'avantage supplémentaire de générer une biomasse valorisable dans divers domaines (Kotoula et al., 2020).

1.1.2 Intérêt biotechnologique et valorisation industrielle

L'intérêt pour les plantes aquatiques ne se limite pas à leur fonction environnementale. Leur potentiel biotechnologique est très vaste. Ces plantes possèdent une composition biochimique riche en protéines, acides gras polyinsaturés, antioxydants naturels et métabolites secondaires bioactifs, notamment flavonoïdes et acides phénoliques, ainsi que diverses vitamines et minéraux. Ces composés trouvent de nombreuses applications industrielles dans l'alimentation humaine, animale et piscicole, ainsi que dans les domaines des nutraceutiques, des cosmétiques et pharmaceutiques (Yadav et al., 2024).

Dans le secteur alimentaire, certaines espèces comme *Wolffia globosa* sont déjà commercialisées comme superaliments en Asie pour leur forte teneur en protéines (jusqu'à 26,76 g/ 100 g de matière sèche), fibres alimentaires, glucides et composés phytochimiques (Boonarsa et al., 2024). D'autres, comme *Spirodela polyrhiza*, ont été étudiées aussi pour leur richesse en protéines végétales, avec un profil en acides aminés essentiels prometteurs pour l'alimentation animale, qui suggère un potentiel nutritionnel comparable à celui de source classique comme le soja (J. Sharma et al., 2019). Leurs extraits sont riches en flavonoïdes, caroténoïdes, anthocyanines et acides phénoliques, aux effets antioxydants, antimicrobiens et anti-inflammatoires (Appenroth et al., 2017; Baek et al., 2021). Ces propriétés sont aujourd'hui exploitées dans le développement de produits cosmétiques ou de compléments alimentaires (Tipnee et al., 2017).

Sur le plan industriel, la biomasse des macrophytes peut être valorisée pour produire des biocarburants, biogaz, bioéthanol, (Jelani et al., 2023; Schutz et al., 2025; Su et al., 2014). Leurs atouts technico-économiques incluent une culture sans sol dans des milieux aqueux, nécessitent peu de nutriments, offrent un cycle de croissance très court, se récoltent facilement, et démontrent une forte adaptabilité à divers environnements, tout en limitant l'usage de produits synthétiques et sans prendre d'espaces agricoles (Hochman & Palatnik, 2022; Y. Song et al., 2025).

1.1.3 Les métabolites secondaires végétaux

1.1.3.1 Définition et rôles biologiques

Les plantes produisent une vaste diversité de composés organiques essentiels à leur croissance, leur développement et leur survie. Ces composés se répartissent en deux grandes catégories : les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Les métabolites primaires tels que les glucides, les lipides et les acides aminés jouent un rôle essentiel dans la croissance et la reproduction, car ils participent directement aux processus essentiels des cellules (Jan et al., 2021). Les métabolites secondaires sont des composés organiques impliqués dans les mécanismes de défense et de résistance des plantes face aux stress biotiques et abiotiques (Elshafie et al., 2023; Jan et al., 2021). Ils agissent comme des substances qui repoussent les herbivores en formant une barrière chimique limitant la pénétration des pathogènes. Ils sont des antioxydants protecteurs qui réduisent les effets du stress oxydatif. Leur accumulation est influencée par les conditions environnementales, notamment la lumière, la température, la disponibilité en eau, la fertilité et la salinité du sol. Chez la majorité des espèces végétales, la variation d'un seul de ces paramètres peut modifier significativement la teneur en métabolites secondaires, même lorsque les autres paramètres restent constants (Jan et al., 2021).

Certaines molécules, telles que les alcaloïdes, les saponines ou les composés phénoliques possèdent des propriétés antimicrobiennes ou insecticides qui aident la plante à limiter les dommages causés par les attaques biologiques (Elshafie et al., 2023). D'autres molécules telles que les composés organiques volatils (COV) permettent aux plantes de communiquer avec les organismes de leur environnement, en ajustant leur croissance, leur défense et leur adaptation. Les COV produits par les plantes proviennent de différentes familles chimiques, notamment les terpénoïdes volatils, les benzénoïdes, les phénylpropanoïdes et les dérivés d'acides gras, ainsi qu'à des classes plus minoritaires comme les nitriles ou les oximes (Bouwmeester et al., 2019). Ils existent, de nombreux métabolites secondaires végétaux qui offrent aux plantes une protection contre les stress abiotiques tels que l'intensité lumineuse, la salinité, la sécheresse ou l'humidité (Ramakrishna & Ravishankar, 2011). Parmi eux, les flavonoïdes par exemple, absorbent les radiations ultraviolettes, et réduisent les dommages oxydatifs aux tissus végétaux (Ferreira et al., 2021). Cela aide les plantes à mieux résister aux variations de leur environnement.

L'étude des métabolites secondaires végétaux constitue un domaine de recherche dynamique, porté par les avancées des approches analytiques modernes. La métabolomique, en particulier, permet une exploration globale et détaillée de la diversité chimique des plantes, permettant d'identifier des profils

métaboliques spécifiques associés à des fonctions physiologiques, et à différentes conditions environnementales (Al-Khayri et al., 2023). Cette discipline offre ainsi de nouvelles perspectives pour l'identification, la caractérisation et la valorisation des métabolites secondaires végétaux, dans l'objectif de durabilité et de santé publique.

1.1.3.2 Classes principales des métabolites secondaires végétaux

Les polyphénols constituent l'une des classes de métabolites secondaires les plus étudiées en raison de leur grande diversité structurale et de leurs nombreuses activités biologiques (Rudrapal et al., 2024). Ils regroupent plusieurs sous-classes, dont les flavonoïdes, caractérisés par une structure de type C6-C3-C6, constituée de deux cycles aromatiques (anneaux A et B) reliés par une chaîne à trois carbones formant un hétérocycle central (anneau C), et cela représente la sous-classe la plus abondante (Rudrapal et al., 2024). Leur biosynthèse repose principalement sur les voies du shikimate et des phénylpropanoïdes, qui mènent à une grande variété de molécules, telles que les flavonols, flavones, les flavanones et les isoflavones (S. Chen et al., 2023). Ils existent aussi d'autres composés non flavonoïdiques, comme les acides phénoliques et les stilbènes, qui dérivent également de ces mêmes voies. Ces substances participent à la défense des plantes et font l'objet d'un intérêt croissant en raison de leurs effets potentiels bénéfiques sur la santé humaine (Crozier et al., 2009; A. Sharma et al., 2019).

Les anthocyanines sont des flavonoïdes hydrosolubles largement présents dans les fruits et légumes tels que les raisins, les pommes, les prunes, les baies ou le chou. Après leur consommation, ces composés seront absorbés au niveau intestinal, et la quantité réellement absorbée dépend de la structure de l'aglycone et du type de sucre auquel il est lié, ce qui influence directement leur biodisponibilité (Mattioli et al., 2020). Leur couleur et leur stabilité varient selon le pH; elles sont rouges en milieu acide et deviennent bleues lorsque le pH augmente (H. E. Khoo et al., 2017).

Les caroténoïdes sont des pigments naturels de couleur rouge, orange et jaune. Ils jouent un rôle fondamental dans la captation de la lumière, la protection contre les dommages photo-oxydatifs, ainsi que dans la stabilisation des structures photosynthétiques. Ils sont répartis en deux grandes classes : les carotènes (comme le β carotène, précurseur de la vitamine A), et les xanthophylles (telle que la zéaxanthine et la lutéine) (Maoka, 2020). Ces pigments interviennent dans la photoprotection et la photosynthèse en dissipant l'excès d'énergie lumineuse, et la protection contre les pathogènes (Demmig-Adams et al., 2025; Maoka, 2020). Leur accumulation dans les tissus végétaux est influencée par des

facteurs génétiques, physiologiques et environnementaux. Chez l'humain, les caroténoïdes sont essentiels à la santé visuelle, à l'immunité, et à la prévention de maladies chroniques dégénératives de la rétine, cardiovasculaires et certains cancers (Crupi et al., 2023; L. Zhang et al., 2012).

Les plantes aquatiques, bien que longtemps négligées, se révèlent aujourd'hui comme des sources exceptionnelles de ces trois grandes familles de métabolites secondaires. Plusieurs études ont identifié dans les espèces de Lemna, Wolffia, Landoltia, et Spirodela une richesse en flavonoïdes, anthocyanines et caroténoïdes et d'autres composés phénoliques, confirmant le potentiel bioactif élevé de ces espèces aquatiques (L. Zhang et al., 2023). Cette richesse fait de ces plantes des candidates prometteuses pour la recherche en phytochimie, la formulation de produits nutraceutiques et l'exploitation industrielle durable (Baek et al., 2021).

1.2 Les polyphénols

1.2.1 Structure, activité thérapeutique et intérêt analytique

Les polyphénols forment une vaste classe de métabolites secondaires végétaux caractérisés par la présence d'au moins un noyau aromatique qui porte un ou plusieurs groupes hydroxyles. Leur structure de base repose sur un squelette phénylpropanoïde, issu de la voie du shikimate, et leur grande diversité résulte d'un enchaînement complexe de réactions enzymatiques telles que les hydroxylations, méthylations, et déglycosylations, modulées par l'espèce végétale et par des facteurs environnementaux tels que la lumière, le stress ou la disponibilité en nutriments (Zagoskina et al., 2023). Cette diversité de structures donne aux polyphénols de multiples fonctions, ce qui explique leur importance dans les domaines de la santé, de l'alimentation, et de la cosmétique (Khan et al., 2019).

Selon leur poids moléculaire et leur degré de polymérisation, les polyphénols se répartissent en composés de bas poids moléculaire (entre 500 et 4000 Da) comme les acides phénoliques (Bolat et al., 2024), et en composés polymériques de masse plus élevée (allant de 500 Da à 20 kDa) (Fabbrini et al., 2022). Les premiers, tels que l'acide chlorogénique et l'acide férulique, sont reconnus pour leur forte capacité de piégeage des radicaux libres, ce qui leur confère un rôle antioxydant important. Les seconds, comme les proanthocyanidines, se distinguent aussi par leur activité antioxydante élevée démontrée in vitro, ainsi que par leurs effets anticancéreux. Cette capacité antioxydante, constitue l'un des fondements principaux de leur intérêt thérapeutique (Fabbrini et al., 2022). Au-delà de leur rôle antioxydant direct, les polyphénols exercent également des effets biologiques profonds sur la modulation de l'inflammation,

l'apoptose, l'angiogenèse et la signalisation cellulaire. Plusieurs flavonoïdes peuvent inhiber l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6) et bloquer l'activation de facteurs de transcription comme NF- κ B et AP-1, jouant ainsi un rôle protecteur dans les maladies inflammatoires chroniques. Par exemple, la quercétine réduit significativement l'inflammation intestinale chez des modèles murins (Al-Khayri et al., 2022).

Ces composés présentent également un potentiel anticancéreux important. Ils peuvent induire l'apoptose des cellules tumorales, bloquer les cycles cellulaires, et limiter la prolifération tumorale. Ces effets sont observés dans divers types de cancers, incluant celui du côlon, et de la prostate (Kopustinskiene et al., 2020). Leur intérêt s'étend aussi au domaine neuroprotecteur : des composés comme la myricétine et la quercétine ont démontré une capacité à réduire le stress oxydatif et l'inflammation neuronale (Oyama et al., 1994). Il existe deux processus clés associés aux maladies neurodégénératives telles qu'Alzheimer et Parkinson : le stress oxydatif et l'inflammation neuronale. Le stress oxydatif provoque des dommages aux neurones à cause d'un excès de radicaux libres, tandis que l'inflammation neuronale résulte d'une activation excessive de cellules immunitaires du cerveau. Ces mécanismes contribuent à la mort progressive des neurones et à la perte de capacités mentales (Butterfield & Halliwell, 2019; Hirsch & Hunot, 2009).

L'étude des polyphénols pose plusieurs défis en raison de leur grande variabilité structurale, de leur faible stabilité, et de leur co-présence dans des matrices complexes. L'identification de ces composés repose principalement sur la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), couplée à des détecteurs UV/Vis ou à la spectrométrie de masse (MS), qui permet à la fois la séparation, la caractérisation structurale et la quantification précise des analytes (Dai & Mumper, 2010). Un autre aspect important de l'analyse des polyphénols concerne la préparation des échantillons. Des techniques comme l'extraction assistée par ultrasons, les micro-ondes ou encore, l'extraction par fluide supercritique, et l'eau subcritique, ont démontré leur efficacité pour préserver l'intégrité des molécules cibles tout en minimisant l'usage de solvants toxiques (Chemat et al., 2020; J. Zhang et al., 2020). L'intégration de ces méthodes d'extraction écologiques avec des outils analytiques de haute précision s'inscrit dans une perspective de recherche durable, conforme aux principes de la chimie verte (Yıldırım et al., 2024). Enfin, la quantification des polyphénols à partir d'extraits végétaux requiert souvent une approche combinée entre méthodes spectrophotométriques (comme le test Folin-Ciocalteu) qui sont utiles pour une estimation globale du

contenu phénolique total, et des méthodes chromatographiques qui permettent une identification précise des composés individuels (Ignat et al., 2011).

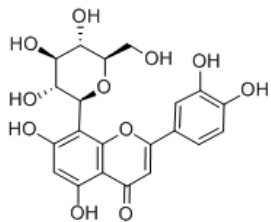
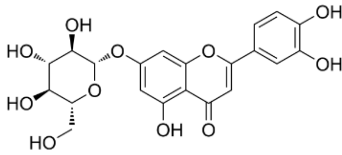
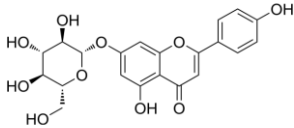
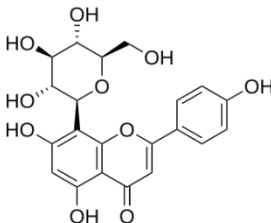
1.2.2 Les flavonoïdes ciblés dans ce projet

Dans le cadre de ce projet, quatre polyphénols de la sous-classe des flavonoïdes ont été sélectionnés pour leur présence abondante dans la plante aquatique (*Lemna minor*) et leurs propriétés biologiques prometteuses : l'orientine, la lutéoline-7-O-glycoside, la vitexine et l'apigénine-7-O-glucoside. Ces composés appartiennent à la classe des flavones glycosylées, connues pour leur activité anti-inflammatoires, antitumorale et antioxydante élevée, leur stabilité chimique en milieu aqueux, ce qui en fait des cibles intéressantes tant pour l'analyse que pour des applications industrielles potentielles (Y. Zhang et al., 2024). L'orientine (lutéoline-8-C-glucoside) se caractérise par sa capacité à réduire la peroxydation lipidique et à réguler les enzymes antioxydantes intracellulaires telles que la superoxyde dismutase, la catalase et glutathion peroxydase (Thangaraj et al., 2018; Tian et al., 2018). Elle offre également une protection aux neurones en réduisant le stress oxydatif et en limitant plusieurs réactions nocives observées dans les modèles de neurodégénérescence, notamment l'excès des espèces réactives de l'oxygène (ROS), les perturbations mitochondriales, l'excitotoxicité et l'inflammation, qui contribuent dans leur ensemble à la mort neuronale (Tian et al., 2018). La vitexine, le 8-C-glucoside de l'apigénine, est un flavonoïde présent en grande quantité dans de nombreuses plantes médicinales. Elle a été étudiée pour ses effets cardioprotecteurs, anticancéreux et anti-inflammatoires. Elle agit notamment en inhibant la formation de radicaux libres et diminue l'expression de NF- κ B, en lien avec les maladies inflammatoires (Babaei et al., 2020; T. Liu et al., 2017). La vitexine a également démontré une activité inhibitrice contre plusieurs enzymes métaboliques humaines telles que l' α -glucosidase, ce qui la rend pertinente dans les contextes de gestion du diabète de type 2 (Choo et al., 2012). La lutéoline-7-O-glycoside, quant à elle, est un flavonoïde O-glycosylé dont la glycosylation en position 7 confère une bonne solubilité dans l'eau tout en maintenant une bonne activité biologique. Elle est reconnue aussi pour son activité anti-inflammatoire par inhibition de la COX-2 (Hu & Kitts, 2004), ainsi que pour ses effets antiprolifératifs sur des cellules endothéliales cultivées in vitro, ce qui en fait un composé prometteur pour des applications thérapeutiques (De Stefano et al., 2021). L'apigénine-7-O-glucoside (AP7Glu) est un flavonoïde naturel qui présente une stabilité accrue et une solubilité supérieure à celle de l'apigénine. Bien que ces deux composés partagent des propriétés anti-inflammatoires comparables, AP7Glu se distingue par la diversité de ses effets biologiques. Elle est utilisée dans le traitement de certaines affections inflammatoires, telles que les infections des voies respiratoires supérieures. Par ailleurs, l'AP7Glu montre un potentiel

antifongique fort et exerce une cytotoxicité importante sur la lignée cellulaire HCT116 à des concentrations plus faibles que l'apigénine (Smiljkovic et al., 2017).

La détection simultanée de ces flavonoïdes dans les extraits végétaux nécessite des méthodes chromatographiques de haute résolution, telles que le couplage de la chromatographie liquide en phase inverse (RP-HPLC) à la spectrométrie de masse en mode d'ionisation électrospray (ESI) négatif et/ou positif. L'étude approfondie de ces flavonoïdes permettra non seulement de mieux comprendre leur répartition dans la biomasse végétale ciblée, mais aussi d'identifier les conditions optimales d'extraction et de purification dans un contexte d'extraction verte.

Tableau 1.1 : Structures, formules chimiques et poids moléculaires des flavonoïdes d'intérêt.

Composés	Structure	Formule chimique	Masse exacte (g/mol)
Orientine		$C_{21}H_{20}O_{11}$	448,1006
Lutéoline-7-O-glucoside		$C_{21}H_{20}O_{11}$	448, 1006
Apigénine-7-O-glucoside		$C_{21}H_{20}O_{10}$	432,1056
Vitexine		$C_{21}H_{20}O_{10}$	432, 1056

1.3 Les anthocyanines et caroténoïdes dans les plantes aquatiques

1.3.1 Rôle des anthocyanines : pigments hydrosolubles

Les anthocyanines sont des flavonoïdes hydrosolubles responsables des couleurs rouges, violettes et bleues dans les tissus végétaux. Elles sont synthétisées via la voie des phénylpropanoïdes et sont majoritairement localisées dans la vacuole des cellules végétales (Buhrman et al., 2022). Chez les plantes aquatiques, ces pigments sont impliqués dans la protection contre les stress lumineux, en particulier les rayonnements UV, souvent plus intenses à la surface des eaux peu profondes. En agissant comme filtres photoprotecteurs (Botes et al., 2025; Buhrman et al., 2022), ils réduisent les dommages oxydatifs causés aux chloroplastes sous une lumière intense et maintiennent l'intégrité des membranes, ainsi réduisant la progression de la sénescence cellulaire (Y. Liu et al., 2018; Zhao et al., 2022). La synthèse des anthocyanines est fortement influencée par l'intensité lumineuse, la température, et les hormones exogènes. La disponibilité en nutriments influence fortement l'expression des gènes biosynthétiques des anthocyanines (An et al., 2020). Dans les milieux aquatiques, plusieurs études ont montré que les espèces telles que *Lemna gibba*, *Azolla filiculoides* accumulent davantage d'anthocyanines lorsqu'elles sont exposées à des stress oxydants, témoignant de leur rôle de réponse adaptative (Costarelli et al., 2021; Leão et al., 2014). Au-delà de leur fonction physiologique, les anthocyanines possèdent une activité antioxydante puissante, leur conférant un intérêt croissant dans les domaines de la santé et agroalimentaire (Mattioli et al., 2020). Leur stabilité, leur biodisponibilité et leurs effets protecteurs contre diverses maladies humaines (maladies cardiovasculaires, maladies chroniques, troubles neurodégénératifs) sont actuellement au cœur de nombreux projets de valorisation (Eker et al., 2020; R. Ullah et al., 2019).

1.3.2 Les caroténoïdes : pigments lipophiles

Les caroténoïdes forment une autre classe majeure de pigments cette fois-ci liposolubles, présents dans les plantes végétales, où ils remplissent des fonctions majeures dans la photosynthèse. Ils agissent en tant que photoprotecteurs en dissipant l'énergie d'excitation excessive nocive via le mécanisme d'extinction non photochimique, et participent à la neutralisation des radicaux de l'oxygène singulet généré en excès sous stress lumineux (Ramel et al., 2012; Ruban, 2016). Dans les plantes aquatiques, les caroténoïdes tels que la zéaxanthine, le bêta-carotène ou la violaxanthine sont essentiels à l'adaptation aux environnements aquatiques, où l'intensité lumineuse varie fortement. Ils contribuent à l'efficacité de la capture de la lumière tout en minimisant les dommages oxydatifs (Sun et al., 2022). Ces plantes ajustent la

concentration des caroténoïdes en fonction des conditions comme la turbidité de l'eau ou la température, ce qui renforce leur résistance aux changements environnementaux (Molner et al., 2024). Sur le plan pratique, les caroténoïdes issus de biomasses aquatiques représentent une alternative durable aux sources traditionnelles. Leur potentiel est activement étudié dans les industries alimentaires comme colorants naturels (lycopène, astaxanthine), dans les compléments nutritionnels (antioxydants, provitamines A) et dans les cosmétiques (protecteurs solaires, produits anti-âge) (Meléndez-Martínez et al., 2022). Ces pigments combinent des fonctions biologiques importantes et un intérêt croissant pour la valorisation industrielle. Leur exploration et leur valorisation s'inscrivent fortement dans une dynamique de développement durable intégrée et la bioéconomie verte (Z. Chen et al., 2023).

1.4 Techniques d'extractions

1.4.1 Limites des méthodes d'extraction conventionnelles

L'extraction des composés bioactifs à partir des plantes repose sur des méthodes classiques telles que la macération et la Soxhlet. Ces techniques, bien que largement utilisées pour leur simplicité et leur faible coût d'équipement, présentent plusieurs limitations majeures dans le cadre d'une recherche moderne basée sur la durabilité et l'efficacité analytique. La première contrainte réside dans l'utilisation de solvants organiques volatils tels que le méthanol, l'acétone, le chloroforme ou l'hexane, qui sont toxiques pour l'utilisateur et l'environnement. De plus, la majorité de ces procédés nécessitent des temps d'extraction longs, ce qui entraîne une consommation énergétique élevée et un rendement limité pour certains composés présents à faible concentration (Azmir et al., 2013). En effet, chaque solvant organique possède une polarité propre qui détermine l'extraction préférentielle de certaines classes de composés, plutôt que d'autres. Cette spécificité empêche souvent la récupération simultanée de composés polaires (comme les glycosides ou les acides phénoliques) et apolaires (tels que les aglycones, les caroténoïdes ou certains lipides), ce qui réduit la diversité des composés présents dans l'extrait final (J.-E. Lee et al., 2024).

La macération est l'une des techniques d'extraction conventionnelles les plus simples. Elle consiste à immerger une matière végétale broyée en poudre dans un solvant approprié, généralement à température ambiante ou légèrement chauffée, pendant une durée prolongée afin de permettre la diffusion des composés vers le liquide d'extraction. Utilisée depuis longtemps en phytothérapie et en chimie des produits naturels, la macération est avantageuse pour l'extraction de composés thermosensibles, du fait qu'elle ne nécessite pas de chauffage intense (Azmir et al., 2013). Toutefois, elle présente des limites importantes : elle repose sur l'utilisation de solvants organiques non écologiques, les

temps d'extraction sont généralement très longs (souvent plusieurs heures), elle conduit souvent à une extraction partielle des composés et à une faible reproductibilité de la teneur en extraits obtenus, ce qui complique la normalisation. Parmi les paramètres qui influencent le rendement d'extraction on retrouve la taille de particule de la matière végétale (plus elle est fine, meilleure est la pénétration du solvant), le rapport solvant/matrice, la température, et le temps de contact relatif (Naviglio et al., 2023).

L'extraction au Soxhlet est souvent présentée comme une technique de référence pour l'extraction exhaustive. Bien qu'elle permette une extraction complète des composés lipophiles, elle exige des quantités importantes de solvant, de longues durées de chauffage et une température constante pouvant altérer certains composés thermolabiles (Belwal et al., 2018). De plus, elle ne répond pas aux exigences actuelles en matière de procédés verts et de sécurité environnementale, qui visent à limiter l'utilisation de solvants toxiques (Chemat et al., 2012). Ces méthodes d'extraction sont associées à des impacts environnementaux importants, car elles utilisent des solvants organiques volatils qui sont souvent inflammables, toxiques et responsables d'émissions contribuant à l'effet de serre (Chemat et al., 2012). Par ailleurs, les déchets générés par ces procédés peuvent contenir des résidus toxiques, qui doivent être traités conformément à des protocoles coûteux et complexes afin de respecter les normes environnementales qui s'appliquent aujourd'hui dans diverses industries (A. Lee et al., 2022).

Face à ces limites, le développement de méthodes alternatives plus écologiques, plus rapides et plus sélectives s'impose comme une priorité. L'intégration de procédés innovants, respectueux de l'environnement et compatibles avec l'analyse instrumentale, représente une avancée significative vers une valorisation durable des ressources végétales. Ces enjeux sont d'autant plus importants lorsque les matrices végétales étudiées, comme les plantes aquatiques, présentent des profils phytochimiques complexes et des teneurs élevées en molécules d'intérêt. Pour cette raison, dans notre projet, nous avons choisi deux techniques plus écologiques : l'extraction à l'eau subcritique et l'extraction au CO₂ supercritique qui offrent une alternative plus performante aux méthodes conventionnelles.

1.4.2 L'extraction à l'eau subcritique : principe et avantages

L'extraction à l'eau subcritique (Subcritical Water Extraction, SWE) est une technique verte et innovante qui exploite les propriétés physico-chimiques uniques de l'eau lorsqu'elle est portée à des températures comprises entre 100 °C et 374 °C et une pression entre 1 et 22 MPa pour la maintenir à l'état liquide (Figure 1.1.a). À ces conditions, les caractéristiques de l'eau se modifient profondément : sa constante diélectrique

diminue (Figure 1.1.b), ce qui accroît sa capacité à solubiliser des composés organiques peu polaires, tout en conservant sa compatibilité avec les composés polaires (J. Zhang et al., 2020). Ce comportement donne à l'eau subcritique un large spectre d'applications pour l'extraction sélective de composés végétaux, tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les anthocyanes et les huiles essentielles (J. Zhang et al., 2020). De plus, la viscosité et la tension superficielle de l'eau diminuent avec l'augmentation de la température, ce qui améliore la diffusion des solvants dans la matrice végétale et accélère le transfert de masse (Cheng et al., 2021).

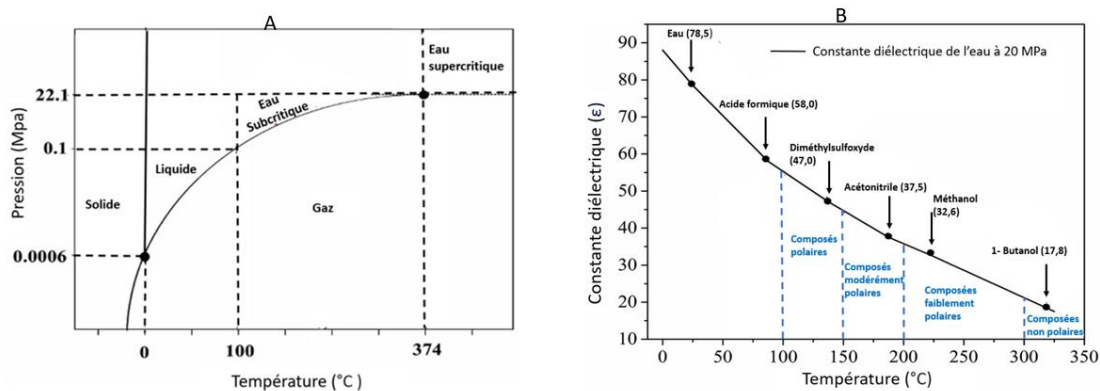


Figure 1.1 (A) État physique de l'eau en fonction de la température et de la pression; (B) Variation de la constante diélectrique de l'eau en fonction de la température, à (20 MPa) comparée aux valeurs mesurées pour plusieurs solvants organiques courants dans des conditions ambiantes (25 °C; 0,1 MPa) (J. Zhang et al., 2020).

Cette méthode permet d'éviter l'utilisation de solvants organiques toxiques, ce qui constitue un atout majeur pour les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques qui cherchent à répondre à des normes environnementales et sanitaires de plus en plus strictes. Son efficacité a été démontrée pour l'extraction de polyphénols à partir de matrices végétales diverses, notamment les sous-produits alimentaires, les algues et champignons en générant des extraits concentrés en composés bioactifs tout en réduisant la consommation énergétique. En outre, cette technique permet d'ajuster la sélectivité de l'extraction selon la température : les composés très polaires sont extraits à basse température, tandis que ceux moins polaires sont extraits à plus haute température (Cheng et al., 2021).

Cette technique d'extraction génère peu ou pas de résidus organiques et limite les émissions de composés volatils dans l'environnement, ce qui la rend parfaitement alignée avec les principes de la chimie verte et du développement durable (Usman et al., 2023). Elle s'intègre également dans les démarches de

valorisation circulaire des biomasses végétales, notamment dans le cadre de la bioéconomie verte (Ferreira et al., 2023). Cependant, elle comporte certaines limitations comme la dégradation des composés thermolabiles à température élevée. Il est donc essentiel d'optimiser les paramètres opératoires (température, pression, temps d'extraction, ratio) afin d'assurer un bon compromis entre rendement, sélectivité et stabilité des composés extraits (Bordoloi & Goosen, 2020).

1.4.3 L'extraction au CO₂ supercritique : applications et spécificités

L'extraction au dioxyde de carbone supercritique (CO₂-SC) est devenue une référence ces dernières années comme une technique innovante dans l'isolement des composés naturels de haute valeur, notamment dans les matrices végétales naturelles. Elle repose sur les propriétés uniques du CO₂ lorsque celui-ci est porté à une température et une pression supérieure à son pont critique (31,1 °C et 7,38 MPa). Dans cet état supercritique, le CO₂ combine des caractéristiques intermédiaires entre un gaz et un liquide : il possède une faible viscosité, une densité élevée et une diffusivité qui lui confère une forte capacité de dissolution (Uwineza & Waśkiewicz, 2020).

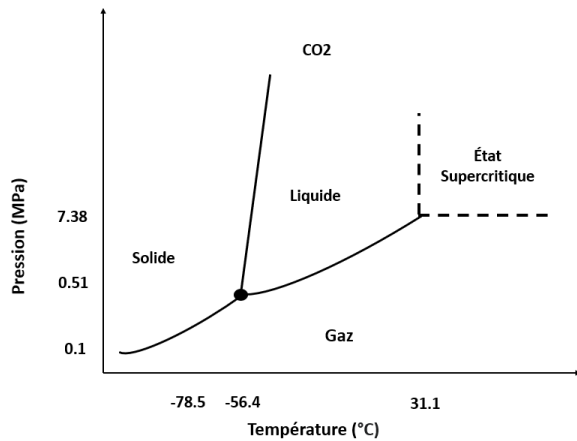


Figure 1.2 Diagramme de phase du CO₂.

L'intérêt principal du CO₂-SC réside dans sa capacité à extraire sélectivement des composés non polaires, tels que les huiles essentielles, les lipides, les caroténoïdes, ou certaines molécules phénoliques faiblement polaires, tout en préservant leur intégrité structurale grâce à l'optimisation des conditions opératoires. Contrairement aux solvants organiques volatils et toxiques utilisés dans les techniques conventionnelles, le CO₂ est non toxique, inerte, non inflammable et facilement éliminable par simple décompression, ce qui permet d'obtenir des extraits sans traces de solvants ou de composés nocifs (Usman et al., 2023).

La polyvalence du CO₂-SC est un autre atout stratégique. En ajustant la pression et la température, on peut modifier la densité du CO₂ et donc adapter sa capacité de dissolution pour cibler des composés spécifiques (Khaw et al., 2017). Par ailleurs, l'ajout de co-solvants (souvent de l'éthanol) permet d'élargir le spectre des composés extraits, notamment ceux plus polaires comme certains flavonoïdes ou acides phénoliques (Uwineza & Waśkiewicz, 2020). Cette technique a déjà été exploitée avec succès dans divers secteurs industriels. Dans l'agroalimentaire, elle permet l'extraction de pigments naturels ou d'arômes sans modifications organoleptique. En pharmacie, et dans le domaine cosmétique, elle favorise l'obtention d'extraits concentrés en composés actifs, utilisée notamment dans la production d'ingrédients alimentaires naturels, des aliments nutraceutiques et de produits pharmaceutiques (Uwineza & Waśkiewicz, 2020). Malgré ces avantages, cette technique présente des défis tels que le coût élevé de l'investissement initial (équipement haute pression, dispositifs de sécurité), et la complexité du paramétrage liée au choix des conditions thermodynamiques, au temps d'extraction, et au prétraitement de la matière première. Cependant, les nouvelles technologies, notamment dans le développement des appareils, l'automatisation et l'intégration de capteurs intelligents, ont permis d'améliorer la stabilité des résultats et une réduction progressive des coûts d'extraction (Khaw et al., 2017).

1.5 Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

L'analyse des métabolites secondaires présents dans les plantes aquatiques, en particulier les composés phénoliques, nécessite des outils analytiques sensibles et sélectifs. Parmi ces outils, le couplage de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) à la spectrométrie de masse (MS) s'impose comme une méthode de référence pour la séparation, l'identification et la quantification de composés bioactifs dans des matrices végétales complexes (Kumar, 2017).

1.5.1 Principe de la LC et séparation des composés

La chromatographie repose sur un principe fondamental : la séparation des constituants d'un mélange en fonction de leur affinité pour une phase mobile et une phase stationnaire (support liquide ou solide). En fonction de la nature de la phase mobile on distingue trois grandes catégories de chromatographie : la chromatographie liquide, la chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie par fluide supercritique (Coskun, 2016; Rouessac & Rouessac, 2004). Étant donnée la structure des molécules ciblées dans ce projet, la chromatographie liquide à haute performance a été choisie pour leurs analyses et séparation.

Un tel système est constitué de plusieurs modules assurant des fonctions complémentaires (figure 1.3). Le système de pompage permet d'envoyer la phase mobile à travers le circuit chromatographique tout en maintenant un débit constant et précis. Il offre généralement la possibilité d'utiliser différents solvants selon la polarité des composés à séparer, avec un gradient constant et reproductible. L'injecteur, souvent intégré à un auto-échantillonneur automatique, injecte dans la colonne des volumes bien définis d'échantillon. La colonne représente le cœur du système de séparation : la nature de sa phase stationnaire détermine le mécanisme de rétention et la sélectivité des analytes. Le détecteur permet de visualiser les composés à leur sortie de la colonne et de générer un signal proportionnel à leur concentration. Enfin, le système de traitement des données contrôle l'ensemble des composantes du système chromatographique et enregistre les signaux issus du ou des détecteur(s) et permet l'analyse qualitative et quantitative des résultats (Sonti, 2023).

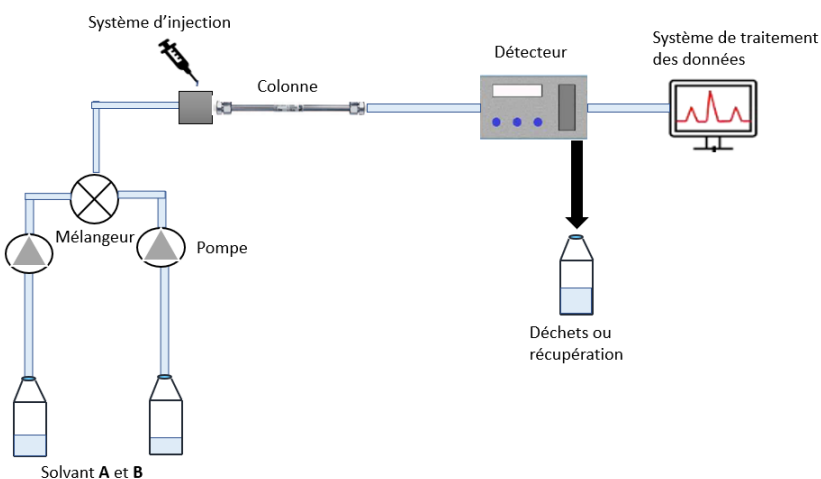


Figure 1.3 Représentation schématique d'un système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Sonti, 2023).

La chromatographie en phase inverse (RP-HPLC) constitue la méthode de séparation la plus utilisée de nos jours. La capacité de cette approche à séparer des molécules de polarité variées en fait une approche de choix pour l'identification des métabolites secondaires des extraits végétaux (Qiao et al., 2011). Dans ce système, la phase stationnaire est hydrophobe (généralement des chaînes C18 greffées sur silice), tandis que la phase mobile est polaire (souvent un mélange d'eau acidifiée et de méthanol ou acétonitrile) (Vaudreuil et al., 2020). Les composés sont séparés en fonction de leur hydrophobicité : les plus polaires éluent rapidement, tandis que les composés hydrophobes interagissent plus longtemps avec la phase stationnaire, ce qui engendre un retard dans leur élution (Dong, 2006). Ce mécanisme permet une

excellente séparation des flavonoïdes, acides phénoliques et anthocyanines, particulièrement lorsque le gradient de solvant est bien contrôlé, ce qui améliore la qualité de la séparation. Dans le cadre de cette étude, les séparations seront effectuées sur des colonnes C18 en phase inverse. Malgré leurs greffons communs, les colonnes C18 ont des sélectivités différentes qui reposent sur la présence ou l'absence de « end-capping », sur la nature chimique du « end-capping », la densité de greffage et le nombre de sites d'attachement des greffons à la silice. Cette diversité structurelle, alliée à leur robustesse et à leur excellente reproductibilité, explique la domination des colonnes C18 utilisées de nos jours dans plus de 70% des applications HPLC (Dong, 2006).

Dans cette étude, les paramètres chromatographiques (nature du solvant, débit, choix de la colonne) sont optimisés pour donner une résolution adéquate des composés ciblés et réduire voire éliminer les interférences. Ce type de chromatographie est non seulement adapté à la grande diversité chimique des extraits végétaux, mais elle est aussi compatible avec le couplage à la spectrométrie de masse.

1.5.2 Spectrométrie de masse : identification et quantification des analytes

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique puissante qui permet d'identifier et de quantifier les composés présents dans un échantillon sur la base de leur masse moléculaire et de leurs profils de fragmentation. Dans le contexte des extraits végétaux complexes, elle offre une résolution et une sensibilité essentielle pour caractériser des métabolites secondaires parfois présents en très faibles quantités (Kumar, 2017).

Un spectromètre de masse est constitué de plusieurs modules essentiels : un système d'introduction de l'échantillon, une source d'ionisation transformant les molécules en ions, un analyseur chargé de séparer les espèces selon leur rapport masse/charge (m/z), un détecteur convertissant le flux d'ions en signaux électriques proportionnels à leur abondance, et enfin un système informatique qui permet le contrôle des différents modules et aussi le traitement des données (Gross, 2017) (figure 1.4).

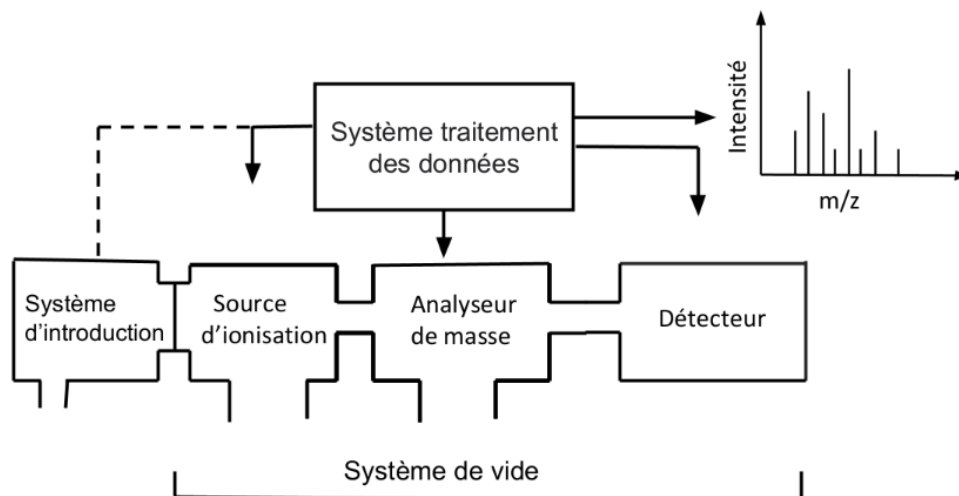


Figure 1.4 Schéma d'un spectromètre de masse (Gross, 2017).

Plusieurs types de sources d'ionisation sont disponibles en spectrométrie de masse, telles que l'ionisation électronique (EI), l'ionisation chimique (CI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), la photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI), le MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) et l'électrospray (ESI) (Mase et al., 2025). Parmi elles, l'ESI occupe une place importante dans l'analyse des extraits végétaux, car elle est facilement utilisable en couplage avec la séparation par chromatographie liquide. Elle est une source dite «douce» qui réduit fortement la fragmentation, couramment utilisée pour produire des ions en phase gazeuse à partir de composés thermiquement labiles (Banerjee & Mazumdar, 2012). Cette caractéristique est essentielle pour préserver l'intégrité structurale des polyphénols et faciliter leur identification lors d'analyses par LC-MS (Chiriac et al., 2021).

Le fonctionnement de l'ESI repose sur l'application d'une haute tension à un capillaire en acier inoxydable par lequel traverse la solution contenant l'analyte. Ceci entraîne la formation au bout du capillaire d'un cône de Taylor et l'émission de fines gouttelettes chargées. L'évaporation progressive du solvant, souvent facilitée par un gaz de séchage tel que l'azote, cause une augmentation de la densité de charge en surface et une diminution de la taille des gouttelettes jusqu'à atteindre la limite de Rayleigh. À ce stade, une explosion coulombienne se produit, qui génère des ions libres en phase gazeuse, et qui sont ensuite introduits dans l'analyseur de masse où ils seront séparés selon leur rapport m/z (Banerjee & Mazumdar, 2012).

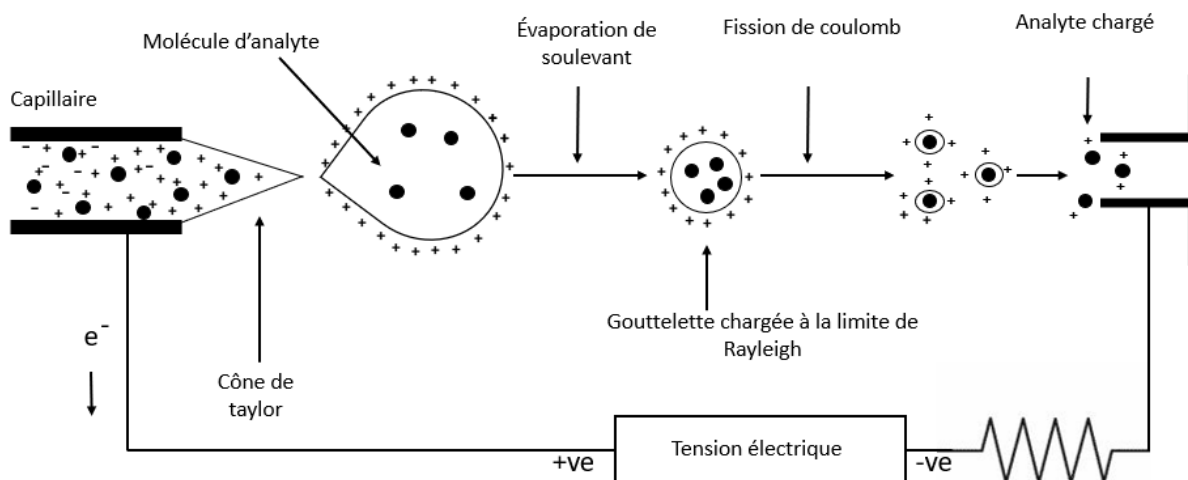


Figure 1.5 Schéma illustre le principe de l'ionisation par électrospray (ESI) (Banerjee & Mazumdar, 2012).

Un aspect fondamental de l'ESI est sa capacité à fonctionner en mode positif ou négatif selon les propriétés chimiques des analytes. Dans le cas des polyphénols, les groupes hydroxyles et carboxyles s'adaptent bien au mode négatif $[M-H]^-$, ce qui facilite leur détection et leur identification. Le mode positif permet d'analyser des composés qui ont une bonne affinité pour les protons, qui peuvent former des adduits ou qui portent déjà des charges positives. Dans cette étude, le mode positif a été utilisé lors de l'analyse des caroténoïdes.

L'analyseur de masse représente le cœur du spectromètre de masse puisqu'il permet de séparer les ions produits en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Plusieurs types d'analyseurs ont été développés au fil du temps, chacun présentant des avantages et des limites qui influencent le choix de l'instrument selon l'application visée. Parmi les plus utilisés, on retrouve les quadripôles, les trappes ioniques, les temps de vol (ToF), les analyseurs de type Orbitrap ou encore la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR) (Gross, 2017). Ces systèmes se différencient par leur résolution, leur exactitude de masse et leur sensibilité. La résolution correspond à la capacité de distinguer deux ions dont les masses exactes sont très proches et est d'autant plus élevée que les pics sont étroits, tandis que l'exactitude de masse reflète la concordance entre la valeur mesurée et la masse théorique. La sensibilité, pour sa part, définit la capacité de détecter des analytes présents en faible abondance (Karpievitch et al., 2010). Parmi ces dispositifs, les analyseurs de type temps de vol (ToF) occupent une place importante. Leur principe repose sur l'accélération simultanée des ions qui ont la même énergie cinétique, puis sur la mesure du

temps nécessaire pour parcourir un tube de vol jusqu'au détecteur (Gross, 2017). Les ions de faible masse se déplacent plus rapidement que ceux de masse plus élevée, ce qui permet de les séparer selon leur temps d'arrivée. Afin d'augmenter encore la sélectivité et la performance analytique, des instruments hybrides combinant différents types d'analyseurs comme le cas du QTOF, qui associe deux quadripôles à un analyseur de type ToF. Le premier quadripôle (Q1) agit comme un filtre permettant de sélectionner les ions précurseurs selon leur m/z et de les transmettre vers la cellule de collision (q2). Dans cette cellule, les ions sont fragmentés par dissociation induite par collision (CID), générant des ions produits. Ces derniers sont ensuite analysés par le ToF, qui fournit une mesure rapide et précise de leur masse (Allen & McWhinney, 2019). Ce couplage permet de bénéficier à la fois de la sélectivité du quadripôle pour la sélection des précurseurs et de la haute résolution et rapidité du ToF pour l'analyse des fragments.

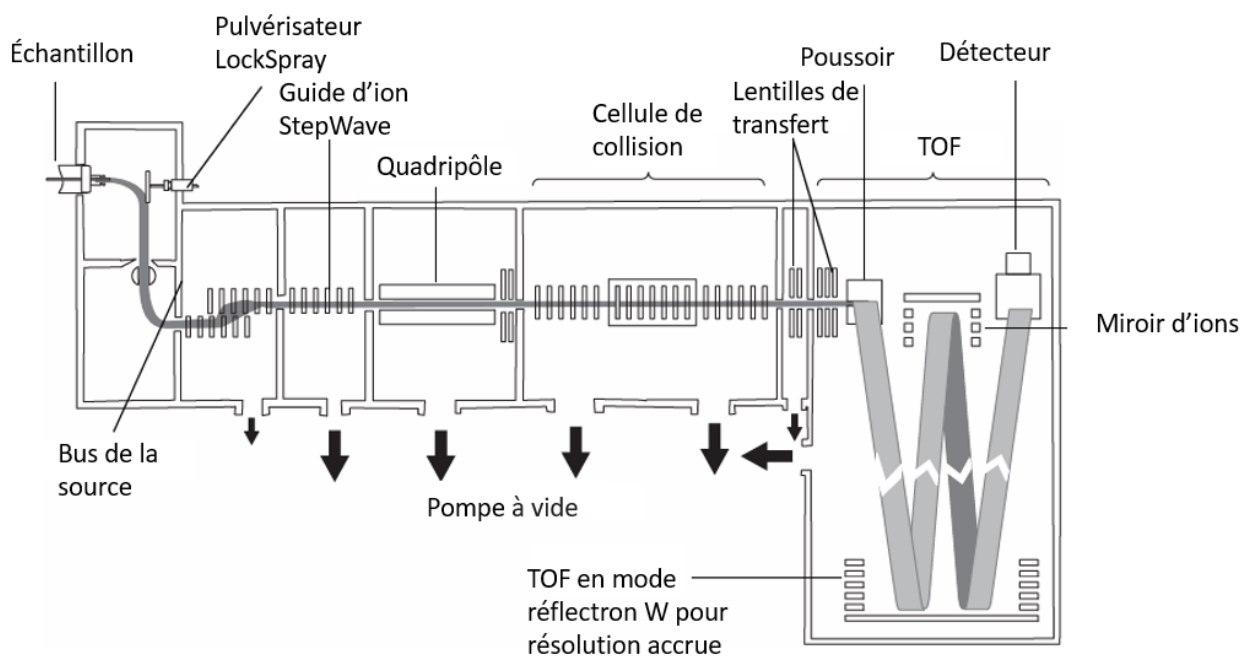


Figure 1.6 Schéma du Q-TOF Synapt G2S de Waters (Waters Corporation, 2016).

Dans le contexte de ce projet, l'utilisation des spectromètres de type TOF et Q-TOF représente un choix pertinent, car il combine la fiabilité, la rapidité et l'exactitude des mesures. Ces types d'instruments permettent non seulement d'obtenir des spectres MS riches en informations structurales, mais également de travailler avec une sensibilité suffisante pour détecter des composés en faible abondance dans des matrices complexes. Ces caractéristiques font un outil de choix pour l'étude de métabolites secondaires

tels que les polyphénols, dont l'analyse exige à la fois une grande exactitude de masse et une sensibilité élevée.

1.6 Objectifs du projet de recherche

L'objectif de ce projet est de développer et d'optimiser des stratégies d'extraction et d'analyse pour la valorisation des composés bioactifs, en particulier les flavonoïdes et caroténoïdes présents dans une biomasse aquatique de la famille des Araceae (*Lemna minor*). Pour ce faire, des méthodes d'extraction écologiques, telles que l'extraction à l'eau subcritique et au dioxyde de carbone supercritique, seront mises en œuvre afin d'obtenir des extraits riches en composés bioactifs. L'approche analytique repose sur le développement des méthodes de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) permettant à la fois l'identification et la séparation des molécules ciblées. Ce projet vise également à adapter la séparation des polyphénols à l'échelle préparatoire pour la purification de quatre composés d'intérêt. Un autre volet porte sur le développement d'une méthode LC-MS adaptée à l'analyse des caroténoïdes, à la suite de leur extraction par CO₂ supercritique. Les mesures de masse exacte sont utilisées pour une première tentative d'identification des composés majoritaires identifiés dans ces extraits.

À travers cette démarche intégrée, le projet vise à contribuer à la valorisation durable des biomasses aquatiques, en combinant efficacité analytique et le respect des principes de la chimie verte.

CHAPITRE 2

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE SÉPARATION LC-MS POUR LES QUATRE FLAVONOÏDES CIBLÉES ET ADAPTATION À L'ÉCHELLE PRÉPARATOIRE POUR BUT DE PURIFICATION

2.1 Sélection des molécules ciblées

Le choix des molécules d'intérêt pour ce projet repose sur une analyse préalable des composés phénoliques majoritairement présents dans les extraits de *Lemna minor*. Parmi les flavonoïdes identifiés, quatre molécules ont été ciblées : l'orientine, la vitexine, la lutéoline-7-O-glucoside et l'apigénine-7-O-glucoside. Ces composés ont été choisis, car leur présence est fréquente dans les lentilles d'eau (*Lemna minor*), comme dans la matière première étudiée, et ils ont des propriétés biologiques intéressantes. Ils présentent une structure flavonique commune, avec des différences concernant les groupements hydroxyles et les types de glycosylation. Ils sont très appropriés pour une séparation par chromatographie liquide haute performance en mode phase inverse couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) (Pagliuso et al., 2020).

L'orientine et la vitexine sont des flavones C-glycosylées, tandis que la lutéoline-7-O-glucoside et l'apigénine-7-O-glucoside sont des flavones O-glycosylées. Cette distinction est importante, car elle influence directement leur stabilité thermique et leur résistance à l'hydrolyse, ainsi que leur comportement chromatographique. Les C-glycosides, comme l'orientine et la vitexine, sont plus résistants aux conditions acides, alcalines et enzymatiques, ce qui peut les rendre plus stables lors de l'extraction et de l'analyse. Les O-glycosides, en revanche, sont facilement hydrolysables au cours de la digestion, ce qui libère des aglycones facilement absorbés au niveau intestinal (Xie et al., 2022). Cette variabilité de structure justifie l'intérêt de développer une méthode d'analyse sensible et spécifique pour les séparer efficacement. La présence de ces quatre flavonoïdes dans les plantes aquatiques a été rapportée dans plusieurs études phytochimiques, confirmant leur abondance relative dans les extraits. Leur identification repose sur des données chromatographiques et spectrométriques, notamment leur temps de rétention et leurs valeurs m/z caractéristiques en mode ESI. Leur présence dans les extraits est confirmée par comparaison avec ces mêmes valeurs obtenues pour des étalons commerciaux (Pagliuso et al., 2020). Cette étape constitue un prérequis essentiel pour le développement d'une méthode LC-MS adaptée à des matrices complexes.

2.2 Préparations des échantillons

Le développement de la méthode LC-MS a été réalisé en utilisant un mélange standard contenant les quatre flavonoïdes ciblés : l'orientine, la vitexine, la lutéoline-7-O-glucoside et l'apigénine-7-O-glucoside. Ces composés ont été acquis sous forme d'étalons analytiques certifiés, avec une pureté supérieure à 98%, et conservés à -20 °C afin de limiter leur dégradation. Ceci est particulièrement important pour les flavonoïdes glycosylés qui sont sensibles aux solvants polaires et à l'exposition à la lumière. Des solutions mères de ces standards ont été préparées dans du DMSO à des concentrations de 5 mg/ml pour l'orientine et la lutéoline-7-O-glucoside, de 4 mg/ml pour la vitexine, et de 3 mg/ml pour l'apigénine-7-O-glucoside. Chaque composé a été dilué à 10 µg/ml avec du méthanol de qualité LC-MS avant les analyses.

En ce qui concerne les échantillons réels, leur extraction a été réalisée à partir de 1,2 g de biomasse séchée et broyée, mélangée à 120 ml d'éthanol 70% dans l'eau avec agitation à température ambiante pendant 20 min. Après centrifugation, le surnageant a été analysé par LC-MS.

2.3 Optimisation de la méthode analytique LC-MS

Les essais analytiques ont été menés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. La nature apolaire des flavonoïdes ciblés nous a conduit vers une chromatographie sur phase inverse, très appropriée pour leur rétention et séparation. Une colonne Xselect CSH C18 (5 µm; 4,6 × 100 mm) de Waters, maintenue à 40 °C a été employée. La phase mobile A était constitué d'eau et la phase mobile B de méthanol, tous deux acidifiées avec 0,1% d'acide formique. Le débit a été fixé à 1 ml/min. Le premier gradient appliqué allait de 10 à 95% de méthanol sur 38 minutes pour une durée d'analyse totale de 50 min (Figure 2.1). Le système était équipé d'un détecteur à barrettes de photodiodes (DA) enregistrant le signal UV entre 210 et 400 nm. Ce détecteur était suivi en série, d'un spectromètre de masse de type SYNAPT G2-Si (Waters), basé sur une configuration hybride quadripôle-temps de vol (Q-TOF). L'analyse par spectrométrie de masse a été effectuée avec une ionisation électrospray (ESI), en mode positif et négatif. Les paramètres opératoires ont été fixés comme suit : une tension de capillaire de 3,0 kV, une température de source de 150 °C, une tension du cône d'échantillonnage de 40 V, et un offset de source de 50 V. Le débit de gaz de cône a été maintenu à 50 L/h, tandis que la pression du gaz de nébulisation était de 6 bars. La température de désolvatation a été réglée à 600 °C, avec un débit de gaz de désolvatation de 1200 L/h. Les données ont été acquises en mode balayage sur une plage de m/z de 60 à 1500 Da.

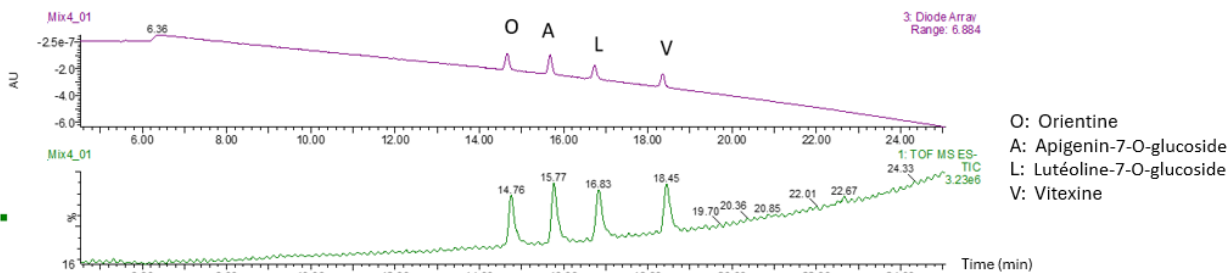


Figure 2.1 Chromatogramme UV (210-400 nm, en haut) et chromatogramme ionique total (TIC, en bas) de l'essai initial sur le mélange standard des quatre flavonoïdes, avec un gradient de 10 à 95% de méthanol sur 38 min.

L'injection individuelle des étalons a permis d'attribuer les pics chromatographiques et le temps de rétention à chacune des quatre molécules ciblées. Ceci a été nécessaire, car les composés partagent deux par deux la même formule moléculaire comme illustrée dans le tableau 1.1. Ces conditions ont conduit à une séparation complète des composés. Néanmoins, cette approche s'est révélée trop longue pour une application analytique courante, ce qui a mené à plusieurs ajustements visant à réduire le temps d'analyse tout en conservant une bonne séparation. Afin d'optimiser la méthode, plusieurs gradients d'élution ont été testés sur le mélange standard ainsi que sur l'extrait brut de *Lemna minor*. Le sommaire des gradients étudiés est présenté à la figure 2.2.

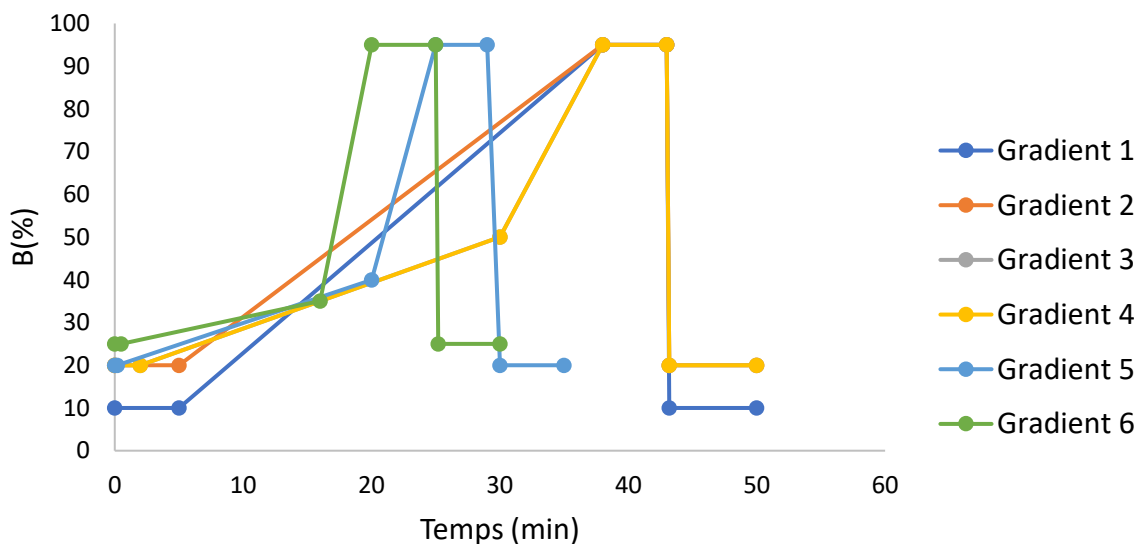


Figure 2.2 Gradients d'élution utilisés pour l'optimisation de la séparation chromatographique.

Les gradients 1 à 3 ont été effectués sur le mélange d'étalons. Les gradients 4 à 6 ont été appliqués à l'extrait brut de Lemna minor. Parmi l'ensemble des conditions testées, un gradient plus court et moins étendu en phase organique a permis d'obtenir une séparation nette et rapide des quatre flavonoïdes dans l'extrait brut (figure 2.3). Ce gradient final, allant de 25 à 35% de méthanol sur 16 minutes pour un temps total de 30 min, a été retenu comme condition optimale.

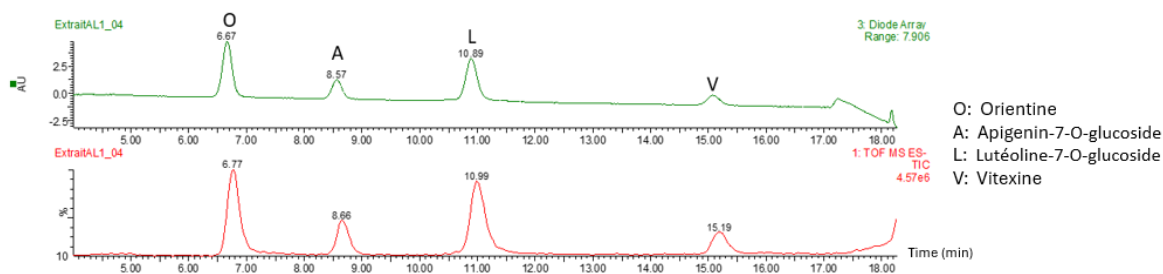


Figure 2.3 Chromatogramme UV (haut) et TIC (bas) d'un extrait brut analysé avec un gradient de 25 à 35% de méthanol sur 16 min, temps total 30 min.

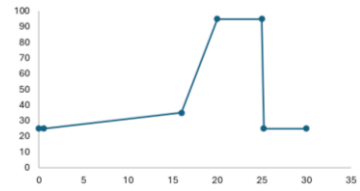

La complexité de l'extrait ne semble pas avoir influencé la qualité de la séparation. Les quatre flavonoïdes d'intérêt ont été facilement détectés aux temps de rétention attendus, sans interférence significatives. La qualité de la séparation observée est comparable à celle obtenue avec le mélange standard, indiquant que la méthode développée est suffisamment sélective et adaptée à l'analyse d'échantillons réels. Les performances de la méthode développée ont été comparées à celles rapportées dans la littérature. Plusieurs études utilisant des approches LC-MS similaires pour l'analyse des flavonoïdes dans des matrices végétales rapportent des temps d'analyse généralement plus longs, souvent supérieurs à 30 minutes, avec des gradients plus étendus (Pagliuso et al., 2020). Dans ce travail, l'optimisation du gradient a permis de réduire significativement le temps d'analyse tout en conservant une séparation efficace des composés ciblés. Cette amélioration constitue un avantage important en termes de rapidité et d'efficacité analytique, particulièrement pour la purification à grande échelle.

2.4 Adaptation à l'échelle préparatoire

Après l'optimisation réussie des conditions chromatographiques en mode analytique, une adaptation à l'échelle préparatoire a été réalisée dans le but d'isoler les quatre flavonoïdes ciblés à partir des extraits de Lemna minor. L'objectif de cette étape était d'obtenir des composés purifiés. Le transfert a été effectué

sur un système LC-UV-MS préparatif de Waters équipé d'une colonne XSelect CSH Prep C18 OBD™ (5 µm, 19 × 150 mm). Les détecteurs étaient de type UV, suivi par un analyseur de masse de type simple quadripôle. Les phases mobiles étaient les mêmes que celles utilisées à l'échelle analytique. Le choix de cette colonne s'est fondé sur sa compatibilité avec la méthode analytique précédemment développée, ce qui garantit une conservation de la résolution et une répétabilité des séparations. Le débit a été augmenté à 24 ml/min et le volume d'injection a été de 800 µL afin de correspondre à cette nouvelle échelle. Le gradient optimisé en mode analytique, allant de 25 à 35% de méthanol sur 16 minutes, a été ajusté de 30 à 35% pour son application à l'échelle préparatoire, pour un temps d'analyse total de 30 minutes par injection (Tableau 2.1). Ce gradient a été sélectionné en raison de sa capacité à séparer efficacement les quatre flavonoïdes dans des conditions de débit plus élevées, sans chevauchements chromatographiques.

Tableau 2.1 Paramètres chromatographiques utilisés pour l'analyse ciblée.

	Méthode de séparation	Méthode préparatoire
Mode d'ionisation	ESI positif et négatif	ESI négatif
Colonne	XSelect CSH C18 (5 µm, 4,6 × 100 mm)	XSelect CSH Prep C18 OBD™ (5 µm, 19 × 150 mm)
Température de la colonne	40 °C	Température ambiante
Volume d'injection	2 µl	800 µl
Débit de la phase mobile	1ml/min	24 ml/min
Phases mobiles	A : Eau+0,1% acide formique B : Méthanol 0,1% acide formique	A : Eau+0,1% acide formique B : Méthanol 0,1% acide formique
Gradient d'élution		

2.5 Collection des fractions : Collecte préparative et pureté des fractions isolées

À l'échelle préparatoire, les composés ont été collectés en quatre fractions principales (FR1 à FR4) (Figure 2.7). La collection des fractions a été déclenchée par la présence des *m/z* ciblés des quatre molécules d'intérêt. Un exemple représentatif du fonctionnement du système de purification automatique est

présenté à la Figure 2.4. Plusieurs tubes de collection ont été obtenus pour chaque fraction et regroupés comme illustré.

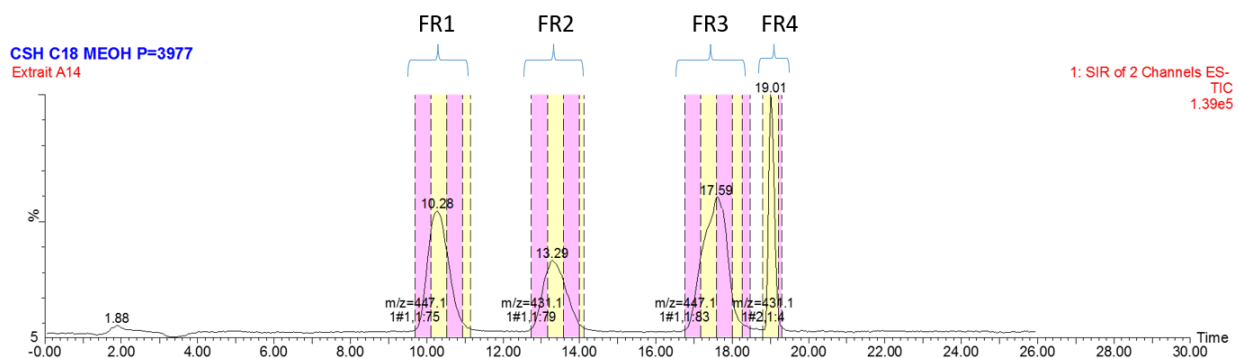


Figure 2.4 Fractionnement préparatif des quatre flavonoïdes cibles à partir de l'extrait réel, selon leur temps de rétention et leur rapport m/z spécifique.

Vingt injections successives ont été effectuées pour collecter une quantité suffisante de matériel dans chacune des fractions, pour permettre de déterminer leur pureté et leur rendement. Pour ce faire, les fractions FR1 à FR4 ont été évaporées sur un rotavap et pesées afin de mesurer la masse collectée de l'orientine (FR1), l'apigénine-7-O-glucoside (FR2), la lutéoline-7-O-glucoside (FR3), et la vitexine (FR4). Une image de ces fractions séchées est présentée à la Figure 2.5.

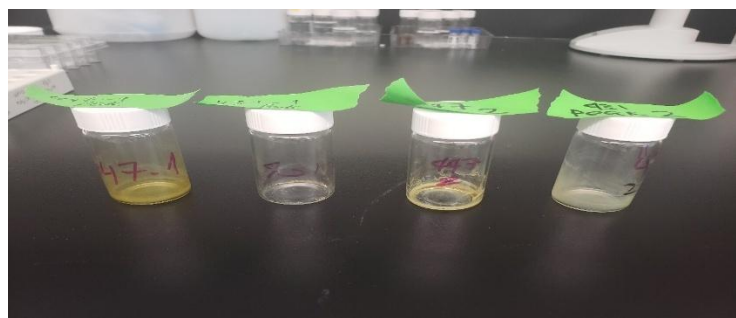


Figure 2.5 Aspect visuel des quatre fractions après la purification.

La pureté de chacune de ces fractions a été évaluée par LC-UV-MS et les résultats sont regroupés dans le Tableau 2.1. La pureté a été estimée à partir des aires relatives des pics obtenus à partir du signal UV, en tenant compte de l'ensemble des composés présents dans chaque fraction et non uniquement des quatre

molécules ciblées. Les chromatogrammes UV de chacune des fractions sont présentés à la figure 2.6 et présentent des profils majoritairement purs, avec des pics dominants correspondant aux molécules ciblées.

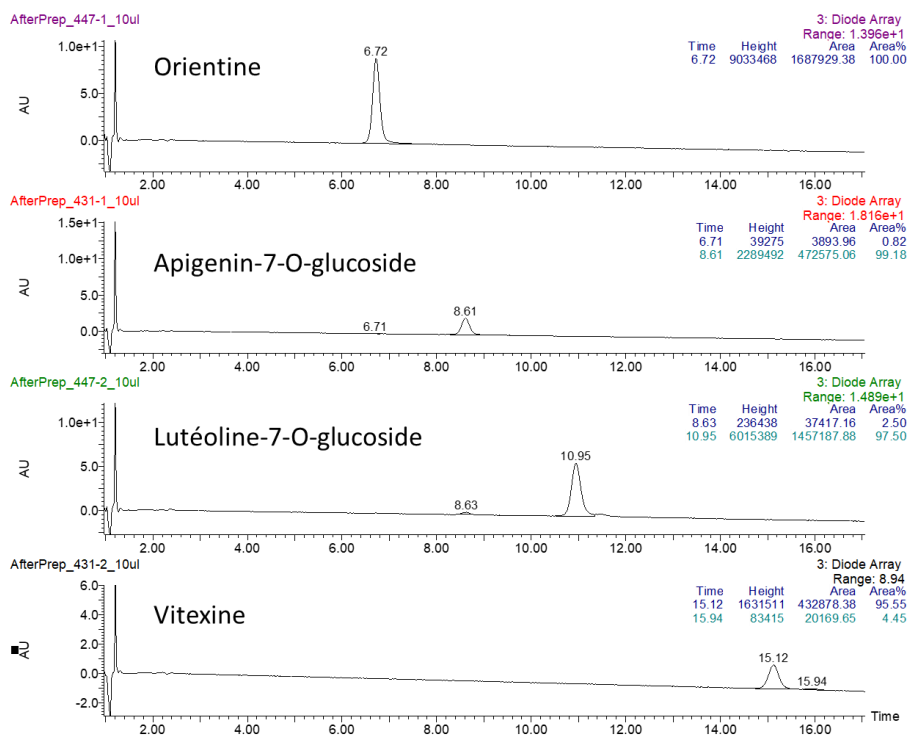


Figure 2.6 Chromatogrammes UV (210-400 nm) des fractions purifiées FR1 à FR4 obtenus par LC-UV-MS.

Tableau 2.2 Pourcentage de pureté et masse collectée pour chaque fraction purifiée des quatre flavonoïdes extraits de *Lemna minor*.

Nom de composé	FR1	FR2	FR3	FR4
Orientine	100	0,00	0,00	0,00
Apigenin7-O- glycoside	0,82	99,18	0,00	0.00
Luteoline7-O- glycoside	0.00	2,50	97.50	0,00
Vitexine	0.00	0.00	0.00	95.55
Poids collecté (mg)	4.20	18.61	7.85	6.41

2.6 Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus démontrent qu'une stratégie de séparation reposant sur des gradients courts et étroits peut être adaptée à la purification ciblée de flavonoïdes en matrice végétale. Le succès du transfert analytique vers un système préparatif à haut débit confirme la robustesse et la reproductibilité de la méthode. La complexité de l'extrait n'a pas empêché la récupération des composés majeurs. Cette méthode de séparation a ainsi constitué une étape clé dans le développement d'une procédure robuste pour la purification et l'analyse quantitative des molécules ciblées. Elle représente un bon point de départ pour une purification à grande échelle qui serait applicable dans le cadre de l'isolement de composés bioactifs pour des applications en nutraceutique, en cosmétique ou pour des essais biologiques *in vitro*.

Malgré les résultats obtenus, certaines limites doivent être considérées. La séparation repose sur une optimisation spécifique à la matrice étudiée, ce qui peut limiter l'applicabilité de la méthode à d'autres extraits végétaux plus complexes. De plus, bien que les fractions obtenues présentent une pureté élevée, la présence de composés mineurs dans certaines fractions, indique que la séparation n'est pas totalement sélective. Enfin le passage à l'échelle préparatoire implique une augmentation du volume injecté et du débit, ce qui peut affecter la résolution chromatographique et introduire une variabilité supplémentaire.

CHAPITRE 3

OPTIMISATION DE L'EXTRACTION DES POLYPHÉNOLS ET ANTHOCYANINES PAR EAU SUBCRITIQUE SELON UNE APPROCHE DOE

3.1 Introduction

L'extraction des polyphénols et des anthocyanines à partir de matrices végétales repose sur le choix de conditions opératoires capables d'optimiser à la fois le rendement et la préservation de l'intégrité chimiques des composés ciblés. Dans ce travail, l'approche expérimentale a été orientée vers l'utilisation de l'eau subcritique comme technique verte et durable, appliquée sur *Lemna minor*. L'objectif principal a été de mettre en œuvre un plan d'expérience (Design of Experiments, DOE) afin d'identifier les conditions optimales permettant de maximiser l'extraction de ces composés.

L'étude a également intégré des méthodes d'extractions complémentaires, permettant de situer les performances de l'eau subcritique dans un contexte comparatif plus large. Des extractions supercritiques au dioxyde de carbone (SFE) ont été conduites dans des conditions adaptées à l'extraction de polyphénols, afin de comparer les profils d'extraits obtenus, avec ceux issus de l'eau subcritique. De plus, deux méthodes conventionnelles, à savoir l'extraction au Soxhlet à l'hexane et la macération à l'éthanol, ont été mises en œuvre comme référence. Ces approches traditionnelles, bien que moins durables, permettent d'obtenir des points de comparaison utiles pour interpréter les performances des techniques innovantes. Cette approche intégrée, associant méthodes d'extraction vertes, techniques conventionnelles et analyses multi-instrumentales, permet de dresser une vue d'ensemble, de l'efficacité de l'eau subcritique pour extractions de polyphénols à partir d'une biomasse aquatique, et d'ouvrir la voie à des perspectives d'optimisation à l'échelle industrielle.

3.2 Plan d'expérience

3.2.1 Application du DOE à l'optimisation du procédé

Lors de processus de valorisation des composés bioactifs, il est fréquent de réaliser un grand nombre d'essais afin d'optimiser l'extraction des composés d'intérêt, notamment en vue d'obtenir un rendement d'extraction maximal. Toutefois, ces tests reposent souvent sur une approche basée sur l'expérience dite « essais-erreurs », qui implique la répétition de nombreuses manipulations, ce qui entraîne une consommation importante de ressources, de temps, ainsi qu'un coût de développement plus élevé pour

surmonter ces limites. La méthodologie du DOE s'impose comme une alternative stratégique efficace. Elle permet de planifier précisément les facteurs et leurs interactions, tout en réduisant le nombre total d'essais requis. Cette approche vise à déterminer les conditions opératoires optimales à l'aide d'outils statistiques adaptés. En ce sens, le DOE consiste à définir d'une façon structurée, les expériences pertinentes à réaliser afin de mettre en évidence les facteurs ayant un effet significatif sur le procédé étudié, et à ajuster les paramètres expérimentaux pour obtenir de meilleurs résultats. (Leyva-Jiménez et al., 2022).

3.2.2 Principes du DOE

Afin de bien comprendre les avantages liés à l'utilisation des plans d'expériences et interpréter adéquatement les résultats obtenus, il est essentiel de maîtriser les principaux types de plans ainsi que les paramètres statistiques utilisés pour leur évaluation. Un plan expérimental repose fondamentalement sur trois composantes clés : la variable réponse, les facteurs et leurs niveaux. La variable réponse, également appelée variable dépendante, représente le paramètre mesuré à l'issue des différentes conditions expérimentales appliquées par les facteurs étudiés (Durakovic, 2017). L'objectif est de maximiser, minimiser ou atteindre une valeur cible de cette réponse en fonction des besoins du procédé (Anderson-Cook et al., 2016). Les facteurs, ou variables indépendantes représentent les paramètres contrôlés par le chercheur afin d'en évaluer l'influence sur la réponse (Collins et al., 2009), le choix du nombre et de la nature des facteurs dépendent généralement du type d'étude menée (criblage, caractérisation ou optimisation), du procédé visé ainsi que des ressources disponibles (Jankovic et al., 2021). Chaque facteur est défini par un ensemble de niveaux, correspondant aux valeurs testées. Ces niveaux sont souvent codés selon une échelle normalisée allant de -1 (niveau bas), à $+1$ (niveau haut), avec 0 représentant un niveau intermédiaire (centre de domaine) (Szpisják-Gulyás et al., 2023).

En combinant les différents niveaux des facteurs selon un plan expérimental bien défini, il est possible de réaliser un ensemble d'expériences visant à évaluer l'efficacité de la technique étudiée. Chaque point expérimental correspond à une combinaison spécifique de niveaux de facteurs. Cette approche permet d'identifier les paramètres les plus influents et d'optimiser efficacement les conditions du procédé étudié (Leyva-Jiménez et al., 2022). Pour garantir l'efficacité de cette approche expérimentale, il est essentiel de définir avec précision les variables de réponse, les facteurs ainsi que les niveaux à prendre en compte. En effet, le nombre total d'expériences à réaliser dépend directement du nombre de facteurs choisis et du nombre de niveaux attribués à chacun d'eux (Jankovic et al., 2021).

3.2.3 Application de DOE dans ce projet

Dans le cadre de cette étude, l'optimisation des conditions d'extraction par eau subcritique a été réalisée en suivant l'approche DOE ce qui permet d'évaluer simultanément l'influence de plusieurs facteurs opératoires et d'identifier leurs interactions, afin de déterminer les conditions les plus favorables à l'extraction des polyphénols, cela constitue un avantage majeur par rapport aux approches classiques basées sur la variation d'un seul facteur à la fois. Le DOE a été appliqué uniquement aux extractions effectuées sur la biomasse sèche. Ce choix repose sur la nécessité de travailler avec un matériau dont la teneur en eau est constante, ce qui permet de limiter la variabilité expérimentale et de mieux comparer les effets des paramètres étudiés. Les variables retenues pour l'optimisation comprenaient la température, le temps d'extraction, la pression et le ratio qui est la quantité de biomasse par volume d'eau (solide/solvant), tandis que les réponses mesurées correspondaient aux rendements bruts et au taux de polyphénols déterminés par spectrophotométrie UV-Vis.

Ce procédé a permis d'établir un plan expérimental structuré couvrant un domaine de variation représentatif, avec une interprétation fiable des effets principaux. Les conditions optimales identifiées par cette approche ont ensuite été sélectionnées pour un suivi par LC-MS, dans le but d'analyser l'évolution des composés extraits au cours du temps.

3.3 Méthodologie

3.3.1 Biomasse végétale

La biomasse utilisée dans cette étude provient de plantes aquatiques (*Lemna minor*), présente un taux d'humidité de 5% et a été cultivée en bassins intérieurs dans des conditions contrôlées (température, pH, lumière) afin d'assurer une croissance optimale et une qualité homogène de la matière première. La culture a été réalisée dans un milieu aquatique à composition physico-chimique maîtrisée, avec un suivi régulier des paramètres de l'eau et une récolte effectuée au moment optimal pour maximiser la teneur en composés bioactifs d'intérêt. Cette biomasse correspond à la matière sèche obtenue par lyophilisation. Pour chaque expérience subcritique, environ 4 g de matière ont été pesés avec précision et introduits dans un réacteur d'une capacité de 100 ml.

3.3.2 Étapes du procédé SWE

Le schéma d'un système d'extraction à l'eau subcritique est présenté à la Figure 3.1 (Usman et al., 2023). On y retrouve un réservoir d'eau, une pompe et un système de chauffage qui augmente la température de l'eau jusqu'à atteindre les conditions subcritiques. Cette eau entre dans la chambre d'extraction qui contient la matière première. À cette étape, l'eau subcritique circule dans la matrice et permet de libérer et dissoudre les composés d'intérêt. Enfin, l'extrait est récupéré dans un flacon comme dernière étape du procédé.

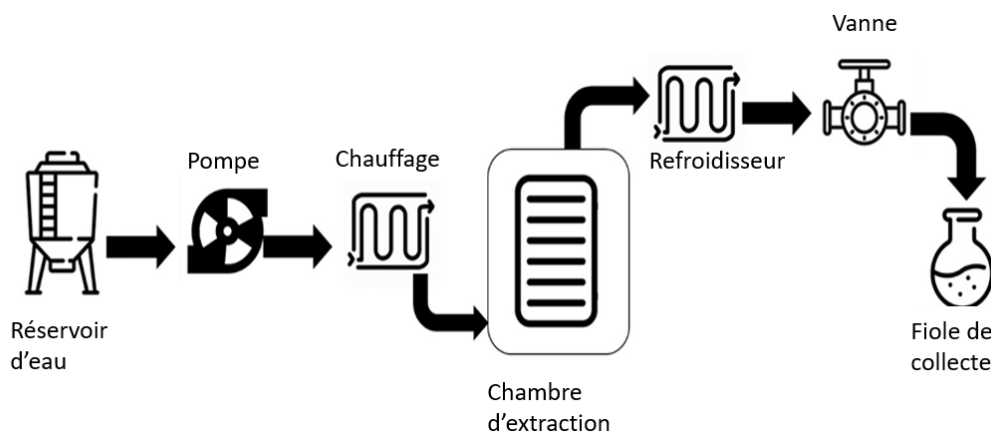


Figure 3.1 Schéma du procédé d'extraction par l'eau subcritique.

3.3.3 Stratégie de plan d'expérience pour l'extraction par l'eau surcritique (SWE)

Un plan factoriel 2^3 a été conçu afin d'évaluer l'influence de la température, de la pression et du débit du solvant sur le rendement en polyphénols. Chaque facteur a été étudié à deux niveaux, correspondant à une valeur basse et une valeur haute : la température a été fixée à 110 et 150 °C, la pression à 80 et 160 bar, et le débit de l'eau à 3,3 et 6,7 ml/min. Afin d'évaluer la reproductibilité des résultats, un point central correspondant à des conditions intermédiaires (température 130 °C, pression 120 bar, débit 5 mL/min) a aussi été intégré et effectué en triplicata. Ainsi, le plan expérimental a comporté huit essais correspondant aux combinaisons extrêmes des facteurs et trois essais réalisés au centre du domaine, soit un total de onze expériences. Les conditions opératoires appliquées pour chaque essai sont présentées dans le Tableau 3.1.

Tableau 3.1 Conditions opératoires du plan d'expériences subcritique : masse de matière première, température, pression, ratio et débit appliqués pour chaque essai, incluant un point central en triplicata.

Essai	Paramètres					
	Masse MP (g)	Température (°C)	Pression (bar)	Ratio (solide/solvant)	Temps (h)	Débit (ml/min)
1	4	130	120	1 / 75	1	5
2	4	130	120	1 / 75	1	5
3	4	130	120	1 / 75	1	5
4	4	110	80	1 / 50	1	3,3
5	4	110	80	1 / 100	1	6,7
6	4	110	160	1 / 50	1	3,3
7	4	110	160	1 / 100	1	6,7
8	4	150	80	1 / 50	1	3,3
9	4	150	80	1 / 100	1	6,7
10	4	150	160	1 / 50	1	3,3
11	4	150	160	1 / 100	1	6,7

Les cellules en bleu correspondent aux points centraux de DOE en triplicata

Le procédé de l'extraction par eau subcritique (SWE) a été conduit dans un système fermé permettant de maintenir l'eau sous forme liquide à des températures supérieures à 100 °C grâce à l'application d'une pression contrôlée. À l'issue de chaque extraction, l'ensemble de l'extrait a été collecté en une seule portion, à température ambiante. Puis les extraits ont été lyophilisés, ce qui a permis d'obtenir des poudres sèches stables, préservant les composés sensibles à la chaleur. Les poudres obtenues ont été pesées afin de déterminer les rendements d'extraction puis conservées à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'aux analyses.

3.3.4 Extraction au CO₂ supercritique (SEF)

Le procédé d'extraction au CO₂ supercritique repose sur une circulation contrôlée du fluide à travers Lemna minor, afin de solubiliser et récupérer les composés d'intérêt. Comme l'indique la figure 3.2, le CO₂ stocké dans un cylindre est acheminé vers une pompe à haute pression, souvent précédée d'un système de refroidissement permettant de maintenir le gaz à l'état liquide. Le fluide comprimé est ensuite dirigé vers un échangeur thermique, où la température est ajustée afin d'atteindre les conditions supercritiques. Le CO₂ supercritique est ensuite envoyé dans le réacteur de l'unité qui contient la biomasse. Dans un premier temps, il pénètre dans la matrice végétale (phase statique), puis circule à travers l'échantillon pour solubiliser les composés dissous (phase dynamique). Lorsque nécessaire, un co-solvant peut être ajouté à l'aide d'une pompe spécifique pour faciliter l'extraction de molécules plus difficiles à solubiliser

(Chemat et al., 2020). Dans notre cas, nous avons ajouté de l'éthanol pour augmenter la polarité du CO₂ supercritique afin d'augmenter le rendement d'extraction des polyphénols. Ceci a aussi aidé à récupérer l'extrait qui avait tendance à rester collé dans les lignes. À la fin pour récupérer l'extrait, on baisse la pression au fur et à mesure, puis on récupère l'extrait dans un récipient bien propre (Chemat et al., 2020).

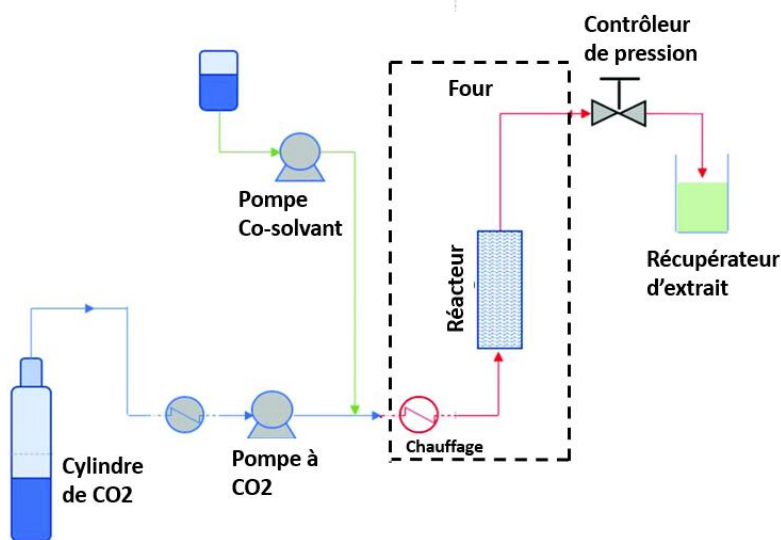


Figure 3.2 Schéma du procédé d'extraction au CO₂ supercritique.

Un total de 20,1 g de matière sèche a été introduit dans le réacteur de l'unité (SFE) d'une capacité de 230 ml. Les conditions opératoires appliquées étaient une température de 60 °C et une pression de 95 bar. Le CO₂ supercritique a été injecté à un débit constant de 4 g/min, tandis que l'éthanol a été utilisé comme co-solvant à un débit de 6 ml/min. La phase de remplissage de CO₂ a duré 20 minutes, suivie d'une extraction en continu d'une durée totale de 7h. Des fractions d'extraits ont été collectées chaque heure, de 1h à 7h, ce qui permet d'évaluer l'évolution du rendement au cours de temps. Les rendements cumulés ont montré une augmentation progressive jusqu'à atteindre environ 25,99 % après 7 heures d'extraction, correspondant à une masse totale d'extrait de 5,22 g. Ce rendement est calculé comme le rapport entre la masse d'extrait récupérée et la masse initiale de biomasse introduite dans le réacteur tel que présenté en annexe B (tableau B.1).

Les mêmes conditions d'extraction ont été appliquées pour les échantillons APL8 et APL9. Ainsi, l'extraction de l'échantillon APL8 a été réalisée en mode continu, c'est-à-dire avec une circulation permanente du CO₂ supercritique dans la cuve d'extraction tout au long du procédé. En revanche,

l'échantillon APL9 a été extrait en mode intermittent (on/off), caractérisé par une alternance de phases d'injection de CO₂ (on) et de phases d'arrêt (off). Cette alternance favorise la désorption de certains composés de la matrice et leur transfert lors de la reprise du flux. Dans les deux cas, la durée d'extraction a été fixée à 6 heures. Les extraits obtenus ont ensuite été récupérés puis concentrés sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif, afin d'éliminer l'éthanol. Les rendements sont de 14,42% pour APL8 et 13,56% pour APL9 (annexe B).

3.3.5 Étude de la cinétique de l'extraction à l'eau subcritique (SWE) sur les extraits optimaux

Afin d'étudier la cinétique de l'extraction par eau subcritique (SWE), les trois essais identifiés comme optimaux à partir du plan d'expériences (DOE) ont été reproduits et analysés par LC-MS. La récupération des extraits a été effectuée sous forme de fractions successives de 40 ml, collectées toutes les 6 à 8 min pendant une durée totale d'une heure. Chaque fraction a été ensuite filtrée à travers une membrane PTFE 0,2 µm, puis analysées directement, sans étapes de concentration ni de lyophilisation.

3.3.6 Méthodes conventionnelles de comparaison (macération et Soxhlet)

À titre comparatif, deux méthodes d'extraction conventionnelles ont été mises en œuvre afin d'évaluer les performances des procédés innovants (SFE et SWE) par rapport à des approches plus conventionnelles. La première série a consisté en trois expériences de macération réalisées sur la biomasse séchée et broyée. Ce type d'extraction a été conduit à température ambiante dans un mélange eau/ éthanol (50:50, v/v) pendant 24 heures, sous agitation douce, ce qui a permis d'obtenir un rendement de 17,13%. Une deuxième macération a été réalisée avec un mélange eau/éthanol (30:70; v/v) pour une durée de 24h, a conduit à un rendement de 28,08%, tandis qu'une troisième expérience a été effectuée dans un mélange éthanol/eau/acide acétique (70 : 29,5 : 0,5; v/v/v), mais sur une durée réduite de 4 heures avec un rendement de 31,44%. L'ajout d'acide acétique dans ce dernier mélange de solvants avait pour objectif de favoriser l'extraction et la détection des anthocyanes, connus pour être instables en conditions neutres et mieux préservés en milieu légèrement acide. À l'issue de chaque macération, les extraits ont été filtrés, puis évaporés sous vide. Ils sont présentés sous la forme d'une poudre, qui a ensuite été conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'aux analyses. En parallèle, une extraction à l'hexane a été réalisée dans un appareil Soxhlet classique, sur une durée de 4 heures. Cette méthode est reconnue pour son efficacité dans l'extraction exhaustive des composés lipophiles. Le solvant a ensuite été éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif, permettant d'obtenir un extrait représentatif de la fraction hydrophobe de la biomasse avec un rendement de 7%. L'ensemble de ces méthodes conventionnelles a fourni des extraits

de référence permettant d'établir une base de comparaison directe avec les procédés à haute performance super et sub-critiques (SFE et SWE).

3.4 Analyses des extraits

3.4.1 HPLC-DAD (flavonoïde d'intérêt)

La quantification ciblée des flavonoïdes d'intérêt orientine, vitexine, lutéoline-7-O-glucoside et apigénine-7-O-glucoside a été réalisée par chromatographie liquide à haute performance équipé d'un détecteur à barrette de diodes (DAD), tous deux de la série 1260 Infinity de Agilent Technologies. Cette méthode a permis à la fois la séparation et l'identification spectrale des composés, sur la base de leurs temps de rétention et de leurs absorptions UV caractéristiques à 350 nm.

Les analyses ont été effectuées sur un système HPLC équipé d'une colonne Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 × 100 mm, 3,5 µm) de Agilent Technologies, maintenue à température ambiante. La phase mobile A était composée d'eau/méthanol (94,9 : 5,0, v/v) acidifiée à 0,1% d'acide formique, tandis que la phase mobile B était composée d'éthanol contenant 0,1% d'acide formique. Le gradient d'élution a commencé à 25% B, puis a augmenté progressivement jusqu'à 100% B en 35 minutes, ce qui permet une séparation optimale des quatre flavonoïdes. Le débit a été fixé à 0,4 ml/min, et le volume d'injection à 5 µl. La détection a été réalisée par UV à 350 nm. L'identification des composés a été effectuée par comparaison des temps de rétention et des spectres UV avec ceux des standards analytiques de référence. La quantification est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage externe établie à partir de solutions standards préparées à différentes concentrations, couvrant la plage linéaire de la réponse du détecteur. Cette méthode a permis de déterminer la teneur en flavonoïdes ciblés dans les différents extraits, et d'évaluer l'influence des conditions d'extraction sur la récupération sélective de ces métabolites.

3.4.2 LC-MS (profil des composés)

Le profilage des composés dans les extraits a été réalisé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS), en utilisant un spectromètre de masse TOF 6224 couplé à un système HPLC 1260 (les deux d'Agilent Technologies). La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne XSelect CSH™ C18 (3,5 µm, 2,1 × 100 mm), de Waters. Le système de phase mobile comprenait (A) de l'eau contenant 0,1% acide formique et (B) du méthanol contenant 0,1% acide formique. Le volume d'injection était fixé à 1 µL et la détection UV réalisée aux longueurs d'onde de 210,

254 et 280 nm. L'acquisition spectrométrique a été effectuée en mode ESI positif et négatif, avec un balayage de m/z 100 jusqu'à 1200.

Avant injection, les extraits secs ont été dissous dans 10 ml d'un mélange méthanol/eau (30:70, v/v), puis filtrés à travers une membrane PTFE de 0,2 μm . L'identification des composés se repose sur une approche ciblée, fondée sur l'interprétation des temps de rétention, des masses exactes et des profils chromatographiques obtenus par LC-MS, en s'appuyant sur les données antérieurement acquises à partir des standards des quatre molécules d'intérêt.

3.4.3 Dosage des polyphénols totaux (UV-Vis, Folin-Ciocalteu)

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Cette méthode repose sur un mécanisme de transfert d'électrons dans lequel le réactif de Folin-Ciocalteu agit comme un agent oxydant, tandis que les composés phénoliques jouent le rôle de donneurs d'électrons. Ce réactif est généralement considéré comme un mélange d'acides phosphomolybdique et phosphotungstique. En milieu alcalin, les composés phénoliques réduisent les ions molybdène (VI) en molybdène (V), conduisant à la formation d'un complexe bleu dont l'intensité est proportionnelle à la capacité réductrice des composés présents. L'absorbance de ce complexe est mesurée par spectrophotométrie UV-Vis, généralement dans une plage de 740 à 765 nm. Toutefois cette méthode présente certaines limitations, notamment une faible spécificité, le réactif pouvant également réagir avec d'autres composés réducteurs, ce qui peut entraîner une surestimation de la teneur en polyphénols totaux (Majewska & Drużyńska, 2025). Pour chaque analyse, 0,5 ml de la solution d'extrait ont été prélevés et introduits dans une fiole jaugée de 50 ml. Un volume de 30 ml d'eau déionisée a été ajouté, suivi de 2,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu préalablement dilué, puis de 7,5 ml de solution de carbonate de sodium (0,7 M). Le volume a ensuite été complété à 50 ml avec de l'eau déionisée. Les solutions ont été homogénéisées par inversion puis incubées pendant 2 h à température ambiante et à l'abri de la lumière afin de permettre le développement complet de la coloration. L'absorbance a été mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (UV-1700, Shimadzu), en utilisant un contrôle blanc préparé dans les mêmes conditions sans extrait.

La quantification a été réalisée en comparant les valeurs d'absorbance à une courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique comme standard de référence. Les résultats ont été exprimés en mg équivalents acide

gallique (GAE) par gramme d'extrait sec (mg GAE/g), ce qui permet de comparer directement les teneurs en polyphénols totaux entre les différents procédés d'extraction.

3.4.4 Dosage des anthocyanes (UV-Vis, pH différentiel)

La teneur en anthocyanes totaux a été déterminée par la méthode du pH différentiel couplée à la spectrophotométrie UV-Visible. Ce procédé repose sur la réversibilité structurale des anthocyanes : ils apparaissent colorés et stables en milieu fortement acide (pH 1), tandis qu'ils deviennent quasi incolores à pH plus modéré (pH 4,5). La différence d'absorbance mesurée entre ces deux conditions permet ainsi d'évaluer directement la concentration totale en anthocyanes.

Dans ce cadre, les extraits secs obtenus ont d'abord été dissous dans de l'eau distillée à l'aide d'ultrasons afin d'assurer une solubilisation complète, puis centrifugés pour éliminer les particules en suspension. Le surnageant a été utilisé pour les analyses spectrophotométriques. Pour chaque échantillon, deux solutions parallèles ont été préparées : l'une dans un tampon KCl/HCl à pH 1 et l'autre dans un tampon acétate de sodium/HCl à pH 4,5. Les spectres d'absorbance ont été enregistrés à 510 nm, correspondant au maximum d'absorption des anthocyanes, et à 700 nm utilisé comme valeur de correction afin de compenser les perturbations possibles liées à la turbidité de l'échantillon.

La valeur d'absorbance corrigée a ensuite été calculée comme suit :

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}4,5}$$

La valeur trouvée sera introduite dans l'équation de la loi de Beer-Lambert pour convertir l'absorbance en concentration. Les calculs ont été réalisés en considérant la cyanidine-3-glucoside comme molécule de référence, en utilisant sa masse molaire (449,2 g/mol) et son coefficient d'extinction molaire (26 900 L·mol⁻¹·cm⁻¹). Les résultats ont finalement été exprimés g/100 g d'extrait, ce qui permet de comparer la teneur en anthocyanes des différents échantillons obtenus par les diverses méthodes d'extraction.

3.5 Résultats et discussions

3.5.1 Optimisation des conditions d'extraction par SWE

Le tableau 3.2 regroupe les résultats obtenus lors des différents essais du plan d'expérience (DOE) appliqué à l'extraction par eau subcritique. Pour chaque essai, la masse de matière première (MP) introduite, les conditions opératoires (température, pression et débit moyen), ainsi que les rendements bruts et la teneur en polyphénols totaux (déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu en spectrophotométrie UV-Vis) ont été consignés. Les résultats montrent une forte influence des paramètres opératoires sur l'efficacité d'extraction, tant en termes de rendement global que de rendement en polyphénols. Les rendements des extraits bruts varient entre 18,55% et 36,99%, ce qui confirme la sensibilité du procédé aux conditions de température et de pression. Concernant la teneur en polyphénols totaux, les valeurs oscillent entre 13,11 et 23,89 mg GAE/g d'extrait sec, avec une nette amélioration observée pour certaines conditions optimisées. Dans ce contexte, l'évolution du rendement brut et de la teneur en polyphénols suit la même tendance, ce qui confirme qu'un rendement élevé s'accompagne d'une augmentation de la concentration en composés bioactifs. Ceci met en évidence la cohérence entre le rendement brut et la teneur en polyphénols totaux, et souligne l'intérêt du plan d'expérience pour identifier les conditions opératoires les plus performantes. En résumé, le plan d'expérience (tableau 3.1) a permis d'identifier des conditions optimales d'extraction subcritique (essais 7,9 et 11), offrant une combinaison intéressante entre le rendement global et le rendement en polyphénols. Ces conditions seront retenues pour la suite des analyses afin d'évaluer plus en détail la composition chimique des extraits.

Tableau 3.2 Rendement brut et teneur en polyphénols totaux des extraits obtenus par extraction subcritique selon les conditions expérimentales.

Essai	Paramètres					
	Masse MP pesée (g)	T moyenne (°C)	Pression moyenne (bar)	Débit moyen (ml/min)	Rendement brut (%)	Polyphénols (mg GAE/g d'extrait)
1	4,01	128,6 ± (0,5)	114,5 ± (1,6)	5,1 ± (5,0)	23,0	15,1
2	4,04	129,2 ± (0,4)	121,7 ± (2,5)	5,0 ± (7,4)	29,9	17,3
3	4,05	128,9 ± (0,3)	118,6 ± (2,0)	4,9 ± (4,0)	20,6	14,2
4	4,03	109,5 ± (0,1)	77,7 ± (4,2)	3,5 ± (12,7)	20,1	15,2
5	4,05	108,3 ± (1,0)	79,1 ± (2,5)	6,8 ± (4,8)	18,6	13,1
6	4,05	109,6 ± (0,1)	158,8 ± (2,0)	3,3 ± (3,8)	27,3	17,0
7	4,04	109,2 ± (0,2)	163,4 ± (2,0)	6,7 ± (2,1)	32,6	23,9
8	4,04	148,9 ± (0,7)	80,6 ± (4,3)	3,3 ± (3,6)	31,5	17,9
9	4,06	148,0 ± (0,7)	79,4 ± (5,3)	6,8 ± (8,5)	34,7	23,3
10	4,03	149,1 ± (0,5)	161,4 ± (5,0)	3,0 ± (4,9)	22,9	14,5
11	4,03	147,2 ± (1,2)	160,5 ± (2,0)	6,7 ± (3,8)	37,0	22,6

Parmi l'ensemble des essais, trois conditions apparaissent particulièrement intéressantes les essais 7, 9 et 11 (en gras dans le tableau 3.2). Ces essais combinent à la fois des rendements d'extraction élevés (32,6, 34,7 et 37%) et des teneurs importantes en polyphénols (22,6, 23,3 et 23,9 mg GAE/g d'extrait). Ces résultats indiquent que l'augmentation de la température (≈ 150 °C) avec des débits élevés ($\approx 6,7$ ml/min) favorise la solubilisation et l'extraction des polyphénols, tout en maximisant le rendement brut.

À l'inverse, certaines conditions (essais 4 et 5), caractérisées par des pressions plus faibles (≈ 80 bar) et des températures modérées (≈ 110 °C), se traduisent par des rendements réduits ($\approx 18-20\%$) et des teneurs en polyphénols plus faibles ($\approx 13-15$ mg GAE/g d'extrait). Cela confirme que la combinaison de haute température et ratio élevé est nécessaire pour exploiter au mieux le pouvoir solvant de l'eau subcritique. Ces résultats sont cohérents avec la littérature, où l'augmentation de la température en conditions subcritique améliore la solubilité des polyphénols en réduisant la polarité de l'eau et en facilitant leur diffusion hors de la matrices végétale (Cheng et al., 2021).

3.5.2 Quantification ciblée des flavonoïdes d'intérêt par HPLC et analyse statistique

Les extraits obtenus dans le cadre du plan d'expérience ont été analysés par HPLC afin de quantifier les quatre flavonoïdes ciblés : l'orientine, la vitexine, la lutéoline-7-O-glucoside et l'apigénine-7-O-glucoside. La quantification repose sur l'établissement de courbes de calibration externes pour chaque composé, permettant de relier la réponse (aire des pics) à la concentration par le biais des équations de régression. Les courbes de calibration (fournies en Annexe B) présentent une bonne linéarité sur les domaines de concentration étudiés. Les résultats de ses calculs sont présentés dans le tableau 3.3. Les teneurs totales en flavonoïdes varient de manière notable selon les conditions opératoires, avec des valeurs comprises entre 6,28 mg d'extrait/g MP et 17,87 mg d'extrait /g MP. Les essais 7, 9 et 11 se distinguent particulièrement en affichant des teneurs plus élevées, confirmant leur intérêt déjà mis en évidence lors de l'analyse globale des polyphénols totaux.

L'essai 2 semble donner de très bons résultats aussi. Ce point fait cependant partie des triplicata réalisés pour le centre de domaine. La moyenne des triplicatas donne 10,2 mg extrait/ g MP de flavonoïdes totaux, ce qui reste plus bas que l'essai 11.

Tableau 3.3 Teneur en flavonoïdes dans les extraits subcritiques selon les conditions expérimentales.

Essai	Orientin (mg extrait/g MP)	Vitexin (mg extrait/g MP)	Luteolin-7-O-glucoside (mg extrait /g MP)	Apigenin-7-O-glucoside (mg extrait /g MP)	Totale 4 flavonoïdes (mg extrait /g MP)
1	3,5	1,4	3,9	0,9	9,7
2	4,4	2,0	4,7	1,1	12,2
3	3,4	1,3	3,4	0,7	8,8
4	3,0	1,1	3,0	0,6	7,7
5	3,6	1,2	3,7	0,7	9,3
6	4,1	1,5	4,0	0,9	10,5
7	6,7	2,4	7,3	1,5	17,9
8	3,4	1,2	3,5	0,8	8,8
9	4,5	1,8	5,0	1,1	12,3
10	2,6	0,9	2,3	0,5	6,3
11	4,2	1,4	4,1	0,8	10,6

Le traitement statistique des résultats a été réalisé à l'aide du logiciel Minitab (version 19). L'objectif de cette étape était d'analyser l'influence relative des paramètres étudiés dans le plan d'expérience, à savoir la température, la pression et le ratio, sur le total des quatre molécules d'intérêt. Pour ce faire, les données issues des différents essais ont été introduites dans le logiciel afin de générer des représentations graphiques des effets principaux (figure 3.3). Ces graphiques permettent de comparer visuellement la réponse moyenne obtenue à chaque niveau d'un facteur et de déterminer ainsi son importance relative.

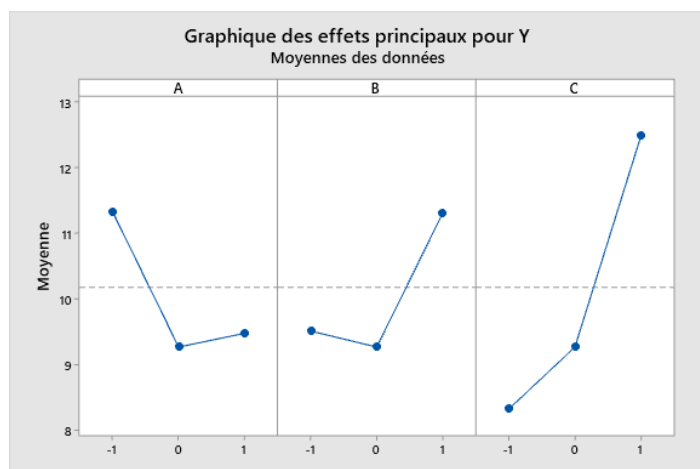


Figure 3.3 Graphique des effets principaux pour la teneur totale en flavonoïdes selon les facteurs opératoires (Température A, Pression B, Ratio C).

L'analyse statistique montre que le ratio solide/solvant (facteur C) exerce une influence importante par rapport à la température et à la pression. Une augmentation du ratio conduit à une amélioration significative de l'extraction, en favorisant la solubilisation et le transfert de matière. En comparaison, la température et la pression présentent des effets moins importants : la température influence de manière non linéaire, comme le montre la variation de la réponse entre les niveaux -1, 0 et 1 tandis que la pression joue surtout un rôle secondaire, en maintenant l'eau à l'état liquide sous conditions subcritiques.

En résumé, cette analyse confirme que l'optimisation de l'extraction des flavonoïdes ciblés dépend principalement du ratio solide/solvant, tandis que la température et la pression jouent un rôle complémentaire. Ces résultats confirment que les conditions des essais 7, 9 et 11 représentent les meilleures conditions pour obtenir des extraits riches et bonne quantité en composés phénoliques.

3.5.3 Analyse LC-MS des extraits obtenus par SFE

Après l'analyse des extraits obtenus par extraction à l'eau subcritique (SWE), l'étude a été étendue aux extraits issus de l'extraction au CO₂ supercritique (SFE) afin de comparer les performances de ces deux approches d'extraction verte. En effet, la SWE est particulièrement efficace pour l'extraction de composés polaires, en raison de l'augmentation de la température qui modifie les propriétés de l'eau. À l'inverse, l'extraction avec le CO₂ supercritique est mieux adaptée à l'extraction de composés moins polaires ou lipophiles, grâce à la faible polarité de CO₂ supercritique et à sa sélectivité modulable par les conditions opératoires.

3.5.3.1 Évolution de l'intensité des molécules ciblées en fonction du temps d'extraction

L'évolution des aires de pics a été suivie en fonction du temps d'extraction relative de ces composés au cours du procédé comme présentée à la Figure 3.4. Les aires ont été obtenues à partir des chromatogrammes LC-MS pour chaque temps d'extraction, en considérant les ions spécifiques de chaque molécule.

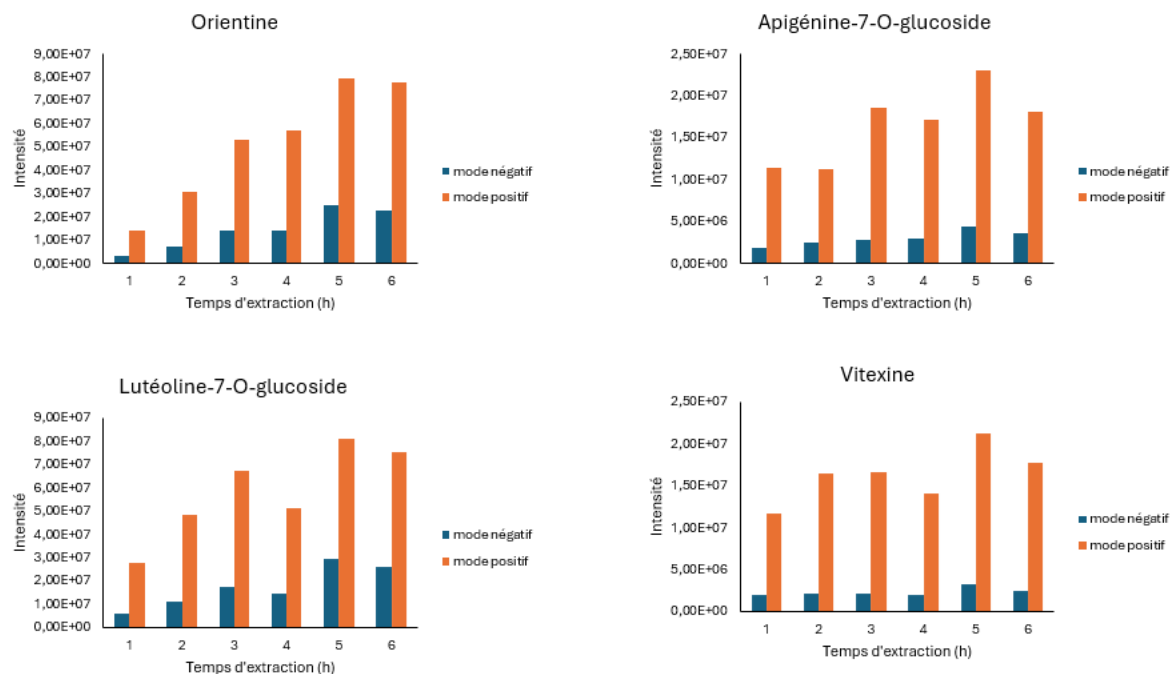


Figure 3.4 Graphique de détermination des profils des quatre molécules d'intérêt dans différents extraits de SFE.

Dans l'ensemble, dans les deux modes d'ionisation, les intensités augmentent graduellement entre 1 h et 5 h d'extraction, ce qui indique que l'efficacité du procédé s'améliore avec le temps. Pendant cette période, le CO₂ supercritique, en présence du co-solvant l'éthanol, pénètre graduellement la matrice végétale et dissout de plus en plus facilement les composés d'intérêt. Après cinq heures, les intensités des pics arrêtent d'augmenter. On observe même, à 6 heures, une petite baisse d'intensité qui peut venir d'une dégradation de certaines molécules sensibles à la chaleur ou à une exposition prolongée aux conditions supercritiques. Elle peut aussi être liée à une saturation du solvant, qui extrait moins efficacement les composés restants. Cela signifie qu'augmenter le temps d'extraction au-delà de cinq heures ne génère pas de meilleurs résultats et peut même réduire la stabilité des flavonoïdes. En résumé, les résultats indiquent que cinq heures représentent une durée d'extraction optimale, suffisante pour obtenir une bonne quantité de composés sans risquer leur dégradation. Ce temps permet donc d'obtenir un bon équilibre entre rendement et stabilité des molécules étudiées.

La figure 3.5 montre les spectres de masse des 4 molécules d'intérêt dans l'échantillon de 5 heures en deux modes d'ionisation.

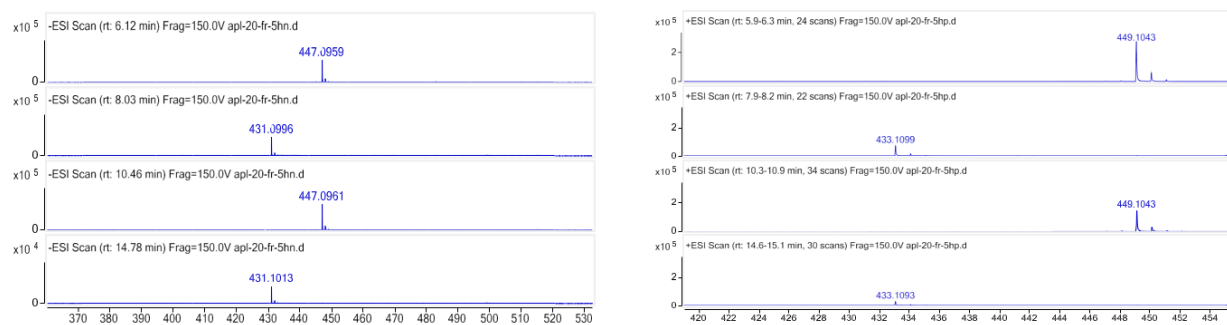


Figure 3.5 Spectres de masse correspondant aux quatre molécules d'intérêt dans l'échantillon 5 heures en mode négatif (gauche) et positif (droite).

Ces spectres de masse confirment la présence claire des quatre molécules d'intérêt, et ce, dans les deux modes d'ionisation. Les masses exactes mesurées pour les ions caractéristiques sont en accord avec les masses théoriques attendues en mode négatif : m/z 431,0984 et 447,0933; ainsi qu'en mode positif : m/z 433,1130 et 449,1079, confirmants ainsi l'identification des composés ciblés

3.5.3.2 Comparaison des méthodes d'extraction de 6 h en deux modes

Les échantillons APL8 et APL9 ont été extraits pendant 6 heures, mais dans des conditions différentes. Le mode d'extraction continu a été appliqué pour l'échantillon APL8, tandis que le mode on/off a été utilisé pour l'échantillon APL9. L'influence de ces conditions sur l'extraction est illustrée sur la figure 3.6.

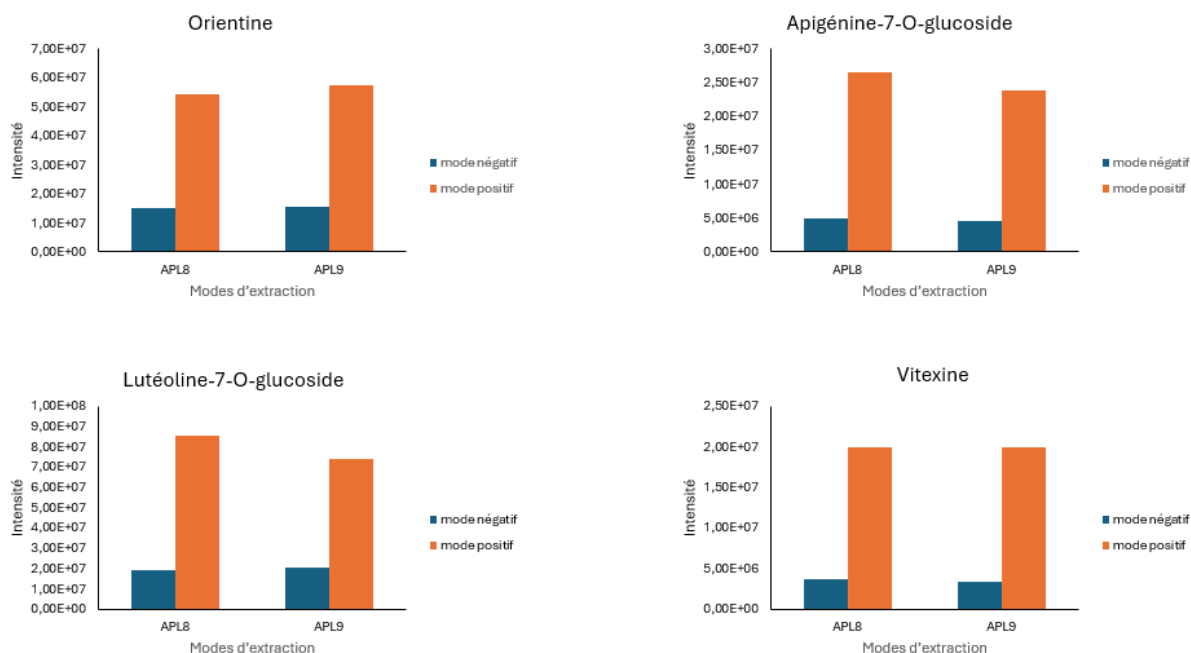


Figure 3.6 Comparaison des modes d'extraction continu (APL8) et a intermittence (APL9) pour les quatre molécules d'intérêt au bout de 6 heures, obtenus en mode négatif et positif.

La lutéoline-7-O-glucoside et l'apigénine-7-O-glucoside semble être légèrement mieux extraites en mode continu, tandis que les deux autres molécules ne présentent pas de différence marquée entre les deux modes.

3.5.3.3 Interprétation générale

Dans l'ensemble, les résultats LC-MS des extraits supercritiques mettent en évidence plusieurs tendances majeures. Le temps d'extraction optimal se situe autour de 5 heures, correspondant au maximum des intensités des signaux observés. En revanche, un allongement de la durée d'extraction à 6 heures n'apporte pas d'amélioration significative et entraîne même une diminution des intensités, probablement liée à la dégradation de certains analytes sensibles. Par ailleurs, les modes d'ionisation positif et négatif conduisent à des tendances similaires, ce qui renforce la fiabilité des observations. Leur complémentarité demeure essentielle, car elle permet une confirmation plus robuste des identités moléculaires. Les conditions opératoires, qu'elles soient continues ou en mode on/off, influencent très peu la sélectivité de l'extraction. Les résultats de la cinétique s'accordent avec la littérature sur l'extraction au CO₂ supercritique, qui souligne l'importance de trouver un compromis entre la durée d'extraction et la stabilité

chimique des composés bioactifs (Yıldırım et al., 2024). Ils confirment aussi que l'optimisation des paramètres expérimentaux est indispensable pour équilibrer rendement brut et préservation des composés bioactifs.

À titre de comparaison, les procédés d'extraction par eau subcritique (SWE) et par CO₂ supercritique (SFE) ont permis d'obtenir des rendements élevés dans cette étude. La SWE a conduit, dans les conditions optimales, à un rendement de 36,99 % (dont 17,87 mg/g de matière première en flavonoïdes, tandis que la SFE, réalisée en présence d'un co-solvant, a permis d'atteindre un rendement global d'extraction de 25,99 %. Ceci confirme l'efficacité de ces procédés verts en termes de récupération des composés d'intérêt.

3.5.4 Cinétique de SWE

La Figure 3.7 montre l'analyse de la cinétique d'extraction par eau subcritique effectuée avec les conditions de l'essai 9 du tableau 3.2. Les chromatogrammes des pics de base (BPC) ont été tracés à partir des fractions allant de t1, moment où l'extraction devient stable sous les conditions réelles, jusqu'à t8, la dernière fraction avant la fin du procédé. La première fraction (t1) présente les signaux les plus forts, ce qui indique que les composés les plus solubles sont extraits dès le début, tel qu'illustré dans la figure 3.8. Les fractions t2 et t3 gardent encore des intensités élevées, montrant que l'extraction reste efficace pendant cette période. Ensuite, à partir de t4, les pics commencent à diminuer graduellement jusqu'à t8, signe que la matrice devient plus pauvre en composés à extraire.

En général, on voit que la plupart des molécules d'intérêt sont récupérées dans les premières fractions, ce qui laisse penser qu'un temps d'extraction plus court pourrait être suffisant pour récupérer l'essentiel de composés. Les analyses LC-MS des extraits obtenus dans les conditions 7 et 11 montrent le même comportement. Leur chromatogrammes BPC respectifs sont présentés dans l'annexe A, d'autant que les tableaux des composés présents dans chaque essai.

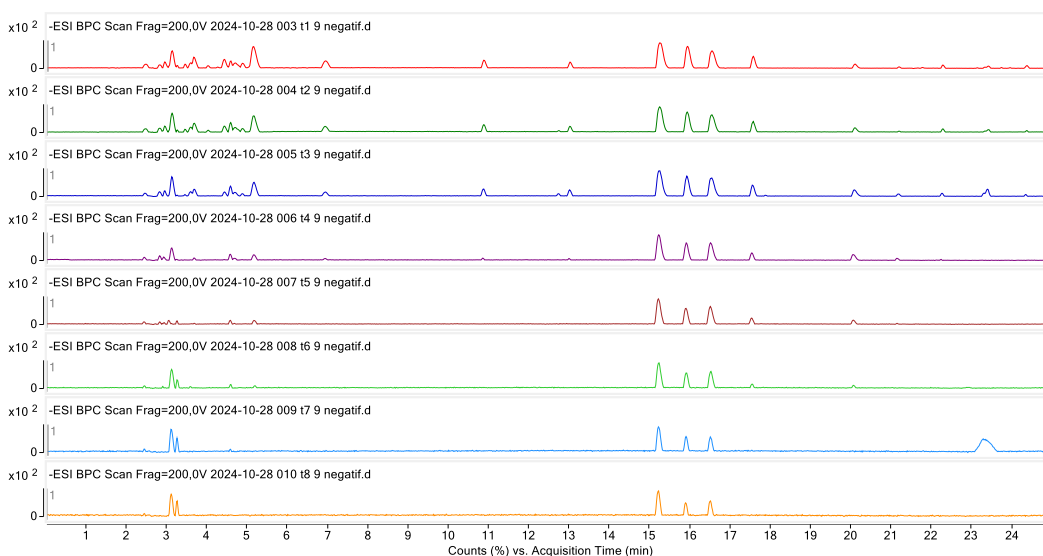


Figure 3.7 Chromatogrammes de base (BPC) des huit fractions obtenues en mode négatif pour l'essai optimisé 9.

Pour compléter l'analyse de l'essai 9, les principaux composés présents dans les chromatogrammes combinés (fractions t1 à t8) ont été classifiés à partir des données LC-MS acquises en mode négatif. Bien que le mode positif ait montré des intensités de signal globalement plus élevées, le mode négatif a été privilégié pour l'identification en raison de sa meilleure sélectivité vis-à-vis des composés phénoliques et du fait que le rapport signal sur bruit est plus élevé. Le tableau 3.4 présente les molécules les plus abondantes détectées, dont l'identification a été réalisée à partir des données fournies par le logiciel MassHunter (Agilent), tel que la masse exacte mesurée. Celle-ci conduit à une formule moléculaire suggérée. La différence entre le m/z théorique calculée pour cette formule et le m/z expérimental reflète la confiance dans l'attribution de la composition élémentaire. Ces paramètres ont permis de proposer des identifications plausibles des composés détectés.

Tableau 3.4 Identification des molécules les plus abondantes de l'essai 9 en mode négatif.

Tr (min)	m/z (exp)	m/z (calc)	diff (ppm)	Formule ionique suggérée	Potentiel identification	Niveau d'ident.	Intensité
2,97	339,0306	339,0299	2,07	C ₂₁ H ₇ O ₇	Composé non identifié	4	1,53E+05
3,14	191,0133	191,0197	-2,88	C ₆ H ₇ O ₇	Acide citrique	2a	1,12E+06
3,25	365,0659	365,0667	-2,12	C ₂₀ H ₁₃ O ₇	Composé phénolique	3	1,04E+05
3,29	587,082	587,0831	-1,89	C ₃₀ H ₁₉ O ₁₃	Composé non identifié	4	4,09E+04
3,27	647,1743	647,1770	-4,19	C ₃₄ H ₃₁ O ₁₃	Composé polyphénolique oxygéné	3	3,51E+04
4,73	554,0606	554,0585	3,86	C ₄₀ H ₁₀ O ₄	Composé non identifié	4	1,18E+05
6,96	565,1768	565,1774	-1,07	C ₂₃ H ₃₃ O ₁₆	Glycoside oxygéné	3	6,05E+04
10,88	353,0891	353,0878	3,66	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	Acide phénolique	3	4,76E+05
15,25	447,0931	447,0933	-0,41	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	Orientine	1	1,42E+06
15,38	609,1458	609,1461	-0,51	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	Flavonoïde glycosylé	3	5,58E+04
15,62	593,1509	593,1512	-0,49	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	Flavonoïde glycosylé	3	2,66E+04
15,94	431,0983	431,0984	-0,16	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	Apigénine-7-O-glucoside	1	1,08E+06
16,23	505,0989	505,0988	0,27	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₃	Composé phénolique	3	1,05E+05
16,55	447,0936	447,0933	0,70	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	Lutéoline-7-O-glucoside	1	1,04E+06
16,85	487,3045	487,3065	-4,12	C ₂₉ H ₄₃ O ₆	Composé polyphénolique oxygéné	3	6,66E+04
17,56	431,0982	431,0984	-0,39	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	Vitexine	1	6,77E+05
22,28	489,2702	489,2705	-0,65	C ₂₄ H ₄₁ O ₁₀	Composé non identifié	4	2,51E+05
23,40	293,1765	293,1758	2,27	C ₁₇ H ₂₅ O ₄	Composé non identifié	4	4,64E+05

Les identifications proposées ont ensuite été classées selon les niveaux de confiance proposés par Schymanski (Schymanski et al., 2014), qui définit différents niveaux de confiance en fonction des données analytique disponibles. Le niveau 1 correspond à une identification confirmée par comparaison directe avec un standard pur analysé dans les mêmes conditions chromatographiques et spectrométriques (sans fragmentation MS/MS). Dans ce travail, ce niveau a été attribué uniquement aux composés pour lesquels un étalon de référence était disponible, comme l'orientine, apigénine-7-O-glucoside, lutéoline-7-O-glucoside et la vitexine. Le niveau 2 correspond à une identification probable de la structure. Le niveau 2a est basé sur la comparaison du spectre obtenu avec des spectres de référence provenant de bases de données ou de la littérature, lorsque la correspondance est claire. Le niveau 2b repose sur des indices caractéristiques, comme des fragments MS/MS spécifiques ou un comportement d'ionisation particulier, lorsqu'aucun spectre de référence n'est disponible. Le niveau 3 correspond à une identification au niveau de la classe chimique. Il est attribué lorsque la masse exacte mesurée, combinée aux informations

disponibles, permet de proposer une structure possible et d'associer le composé à une famille chimique probable, telle que les composés phénoliques et les composés aromatiques oxydés, sans confirmation formelle de la structure exacte. Le niveau 4 correspond à une identification limitée à la seule formule moléculaire, lorsque les données ne permettent pas d'attribuer d'une manière fiable une classe précise. Ce niveau a été retenu pour les composés dont la structure restait incertaine pour proposer une famille chimique. Cette approche permet d'obtenir une vue d'ensemble des composés majoritaires présents dans l'extrait, tout en tenant compte du degré de confiance associé à leur identification. Enfin le niveau 5 correspond à une identification limitée à une masse exacte, sans information suffisante pour attribuer une formule moléculaire ou une structure. Il s'agit donc d'un composé non identifié.

3.5.5 Méthodes conventionnelles de référence pour la comparaison : (macération et Soxhlet)

Afin de disposer d'un point de référence, des extractions conventionnelles ont été réalisées et comparées aux procédés innovants (SFE et SWE). Trois conditions de macération ont été mises en œuvre et une extraction Soxhlet à l'hexane. Leur performance en termes de polyphénols totaux et de anthocyanes sont regroupés dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5 Résultats d'analyse des polyphénols totaux et des anthocyanes dans les extraits obtenus par macération hydroalcoolique selon différentes conditions de solvant.

Type d'extraction	Solvant	Rendement brut (%)	Polyphénols totaux (mg GAE/g extrait)	Anthocyanes (g/100 g d'extrait)
Macération	Eau/éthanol 50:50	28,65	17,13	0,0000
Macération	Eau/éthanol 30:70	28,08	21,02	0,0096
Macération	Eau/éthanol/acide acétique 29,5:70:0,5	31,44	28,78	0,1022
Soxhlet	Hexane	2,54	n.d	n.d

La première expérience de macération réalisée avec un mélange EtOH/eau à 50:50 (v/v) a conduit à un rendement d'extraction élevé de 28,65% pour une teneur en polyphénols totaux de 17,13 mg GAE/g d'extrait. Ces résultats confirment que la polarité du solvant exerce une influence significative : une proportion équilibrée d'eau et d'éthanol permet d'extraire une quantité importante de polyphénols. Toutefois, cette méthode n'a permis d'extraire aucune quantité détectable d'anthocyanes (0%), ce qui met

en évidence la probabilité de la faible stabilité de ces pigments en conditions neutres et la nécessité d'un environnement acide pour être préservés.

La deuxième expérience, réalisée avec un mélange EtOH/eau 70:30 (v/v), a donné un rendement comparable de 28,08%, légèrement inférieur à celui du premier essai, mais avec une teneur en polyphénols totaux plus élevée (21,02 mg GAE/g d'extrait). Cette différence illustre que l'augmentation de la proportion d'éthanol dans le solvant favorise la solubilisation des composés phénoliques. Néanmoins, la teneur en anthocyanes reste très faible (0,0096%), ce qui confirme que, même avec une polarité plus adaptée, l'absence d'acidification ne permet pas de stabiliser efficacement ces pigments sensibles.

La troisième expérience a été réalisée dans un mélange EtOH/eau/acide acétique (70:29,5:0,5, v/v/v) pendant 4 heures. Elle a permis d'obtenir un rendement légèrement plus élevé de 31,44%, associé à une teneur en polyphénols totaux de 28,78 mg GAE/g d'extrait. Cette condition s'est révélée la plus favorable parmi les trois macérations. La présence d'acide acétique a non seulement amélioré l'efficacité globale de l'extraction, mais également permis la stabilisation et la récupération des anthocyanes, avec une valeur mesurée de 0,102%. Cette observation est confirmée par l'aspect visuel des extraits : la solution acidifiée présente une couleur rouge caractéristique, alors que les autres extraits conservent une teinte verte.

Enfin, l'extraction Soxhlet à l'hexane (4h) a été réalisée en parallèle, non pas dans le but d'étudier les polyphénols ou les anthocyanes, mais afin de disposer d'un extrait de référence représentatif de la fraction lipophile de la biomasse. Cette méthode, reconnue pour son efficacité exhaustive vis-à-vis des composés hydrophobes, s'avère particulièrement pertinente pour l'analyse comparative et sera utilisée comme point de référence dans les analyses analytiques ainsi que dans l'étude des caroténoïdes présentée dans le chapitre suivant (chapitre 4).

Dans l'ensemble, les résultats obtenus avec les méthodes conventionnelles (tableau 3.5) montrent que la macération hydroalcoolique reste une approche efficace en termes de rendement global. La macération dans le mélange de solvant (Eau/éthanol/acide acétique 29,5:70:0,5) donne un rendement en Polyphénols totaux de 28,78 mg GAE/g extrait versus 23,89 mg GAE/g extrait obtenue par l'extraction à l'eau subcritique. Cependant, la macération présente certaines limites, notamment des temps d'extraction longs, une sélectivité réduite et une dépendance forte à la composition du solvant. Par comparaison, les procédés SWE, sont caractérisés par un temps plus court (1 h) et l'absence de solvants organiques. Les approches conventionnelles sont donc utiles comme référence, mais elles confirment l'intérêt des

procédés verts pour obtenir rapidement des extraits à la fois riches, sélectifs et respectueux de l'environnement.

3.6 Conclusion

Dans ce chapitre, l'extraction des composés phénoliques à partir de *Lemna minor* a été abordée selon une stratégie intégrée combinant procédés verts (SWE et SFE), méthodes conventionnelles (macération et Soxhlet) suivie d'analyses instrumentales avancées. L'utilisation d'un plan d'expérience a permis d'optimiser les conditions de l'extraction par eau subcritique, en évaluant l'effet de la température, de la pression, du ratio (solide/solvant) sur les rendements bruts, la teneur en polyphénols et la récupération ciblée de quatre flavonoïdes d'intérêt. Les résultats obtenus montrent que l'eau subcritique permet d'atteindre des rendements d'extraction plus élevés que ceux obtenus avec les autres méthodes testées, compris entre environ 18 et 37%, avec des teneurs en polyphénols pouvant dépasser 23 mg GAE/g d'extrait dans les conditions optimales. Le plan factoriel a montré que le ratio solide/solvant est le facteur principal d'optimisation du procédé. La température et la pression, bien que moins déterminantes, contribuent à définir des conditions opératoires permettant d'assurer une extraction efficace et reproductible. Les essais 7, 9 et 11 se sont distingués comme les conditions les plus performantes, ce qui a justifié leur sélection pour l'étude cinétique et le profilage LC-MS. Ces analyses ont montré que la majorité des composés d'intérêt est extraite dans les premières fractions, suggérant qu'un temps d'extraction plus court pourrait suffire à concentrer l'essentiel des polyphénols, tout en limitant la consommation énergétique.

En parallèle, l'extraction au CO₂ supercritique, réalisée en présence d'un co-solvant polaire (éthanol) a permis de confirmer l'intérêt d'un procédé vert complémentaire, capable de générer des extraits riches en flavonoïdes avec un temps optimal autour de cinq heures. Au-delà, les molécules commencent à devenir moins stables. Les macérations ont fourni des points de référence pertinents : elles présentent des rendements globaux compétitifs et une bonne récupération des polyphénols, mais demandent des temps d'extraction plus longs, et une utilisation de solvants organiques non respectueux à l'environnement. L'ajout d'acide pour stabiliser les anthocyanes illustre bien à quel point le choix des conditions joue sur les résultats finaux. L'extraction Soxhlet a donné le rendement brut le plus faible, à 2,54%. Elle n'est pas souhaitable pour l'extraction des polyphénols mais plutôt pour l'extraction des caroténoïdes, composés très hydrophobes, comme illustré au chapitre 4. L'ensemble de ces résultats confirme que les procédés SWE et SFE constituent des alternatives robustes et durables aux méthodes conventionnelles, capables de

produire des extraits à la fois concentrés, sélectifs et compatibles avec une valorisation à plus grande échelle. Ces résultats s'inscrivent dans l'objectif global du projet visant à développer des procédés d'extraction efficaces et durables pour la valorisation de biomasse aquatiques. Ainsi, ce chapitre pose les bases méthodologique et expérimentales nécessaires pour la suite de travail.

Malgré la pertinence des résultats obtenus, certaines limites restent à considérer. La méthode de dosage des polyphénols totaux par Folin-Ciocalcu présente une faible spécificité et peut conduire à une surestimation des teneurs en raison de la présence d'autres composés réducteurs. Par ailleurs, l'identification des composés par LC-MS repose principalement sur les masses exactes, ce qui limite la confirmation structurale en l'absence d'analyses MS/MS systématique. Afin de pallier ces limitations, des analyses complémentaires par LC-MS/MS ainsi que l'utilisation de standards supplémentaires permettraient d'améliorer la fiabilité des identifications et de mieux caractériser les composés présents dans les extraits.

CHAPITRE 4

EXTRACTION DES CAROTÉNOÏDES PAR CO₂ SUPERCRITIQUE

4.1 Introduction : Intérêt des caroténoïdes des plantes aquatiques

Les caroténoïdes constituent une vaste famille de pigments lipophiles naturellement présents dans de nombreuses plantes, algues et organismes photosynthétiques. Chez les plantes aquatiques, ces composés jouent un rôle central dans le processus de photosynthèse, en complément de la chlorophylle. Ils interviennent dans l'absorption de la lumière dans les longueurs d'onde que la chlorophylle ne capte pas efficacement, tout en assurant une protection contre les dommages oxydatifs générés par l'exposition à une lumière excessive (Sun et al., 2022).

Dans les écosystèmes aquatiques, les conditions environnementales telles que l'intensité lumineuse et la température influencent considérablement la composition et la concentration des caroténoïdes. Chez les plantes flottantes comme *Lemna minor*, les caroténoïdes jouent un rôle adaptatif clé pour maintenir l'efficacité de la photosynthèse malgré les fluctuations de l'intensité lumineuse ou la présence d'agents stressants. Parmi les caroténoïdes les plus courants, on trouve la lutéine, la zéaxanthine, le β -carotène, l'astaxanthine, canthaxanthine et la fucoxanthine, chacun remplissant des fonctions photoprotectrices spécifiques ou agissant comme précurseurs de composés bioactifs (Takács et al., 2025). D'un point de vue écologique, les caroténoïdes influencent les réseaux trophiques aquatiques. En tant que précurseurs de la vitamine A (provitamine A) et d'antioxydants essentiels, ils doivent être obtenus par l'alimentation chez les animaux aquatiques. Leur importance biologique est telle qu'en aquaculture, ils sont ajoutés systématiquement aux régimes alimentaires afin de soutenir la croissance, la santé de poissons tels que le saumon, la truite et la pagre rouge, ainsi que de crustacés comme la crevette et le homard (de Carvalho & Caramujo, 2017). Enfin, l'intérêt biotechnologique pour les caroténoïdes extraits de plantes aquatiques ne cesse de croître. Grâce à leur profil métabolique riche et à leur production rapide en milieu contrôlé, des espèces comme *Lemna minor* ou *Spirodela polyrhiza* sont désormais considérées comme des sources renouvelables prometteuses pour la production de caroténoïdes à haute valeur ajoutée, destinés à des applications pharmaceutiques et agroalimentaires (Takács et al., 2025). Dans cette étude, la zéaxanthine a été choisie comme molécule ciblée (figure 4.1) en raison de son importance physiologique et de sa structure dihydroxylée représentative des xanthophylles.

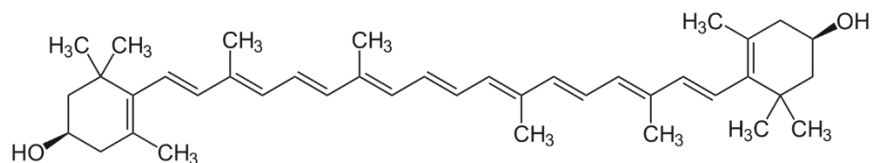


Figure 4.1 Structure chimique de la zéaxanthine (C₄₀H₅₆O₂).

4.2 Choix du CO₂ supercritique comme solvant pour l'extraction des caroténoïdes

Les caroténoïdes étant des composés majoritairement lipophiles, leur solubilité dans le CO₂ supercritique est naturellement favorable, en particulier pour les structures non oxygénées comme le β-carotène. Toutefois, pour les xanthophylles oxygénées comme la zéaxanthine ou la lutéine, plus polaires, l'ajout d'un co-solvant tel que l'éthanol devient essentiel pour améliorer l'efficacité d'extraction (de Andrade Lima et al., 2019; Tirado & Calvo, 2019). Dans ce projet, la SFE a été envisagée comme une alternative verte aux extractions classiques. Elle permet non seulement de limiter l'utilisation de solvants organiques toxiques, mais aussi d'extraire les caroténoïdes à des températures basses, ce qui contribue à préserver leur structure et leur activité biologique (Viñas-Ospino et al., 2023). L'ajustement précis de la pression, de la température et du débit CO₂/éthanol permet de moduler la sélectivité du procédé, en ciblant des familles de caroténoïdes selon leur polarité. Ce type d'approche, déjà validée dans de nombreux travaux appliqués à des matrices algales et végétales (de Andrade Lima et al., 2019; Sun et al., 2022), confirme la pertinence de la SFE pour une extraction ciblée des caroténoïdes.

4.3 Conditions expérimentales d'extraction SFE

L'optimisation de l'extraction des caroténoïdes de *Lemna minor* par CO₂ supercritique a été réalisée au préalable dans le laboratoire CÉPROCQ et sera utilisée sans modification dans ce projet. Brièvement, l'extraction a été réalisée à l'aide d'un système supercritique opérant au CO₂, avec ajout de l'éthanol comme co-solvant. La matière première utilisée est constituée de *Lemna minor* séchées et finement broyées, sans prétraitement chimique. Des aliquotes de 20 g de cette biomasse ont été introduites dans le récipient d'extraction. Une pression de 2,5×10⁷ (Pa) a été appliquée pendant une durée d'extraction de 3h. Le débit de CO₂ a été maintenu à 10 ml/min. Le co-solvant, l'éthanol, a été introduit à un débit de 0,5 ml/min dans le but d'améliorer la récupération de l'extrait. L'ajout d'éthanol a aussi permis de faciliter la solubilisation et l'évacuation des composés lipophiles extraits.

À la fin du procédé, l'éthanol a été évaporé pour récupérer l'extrait sec. La masse obtenue était de 0,59 g ce qui correspond à un rendement d'extraction de 2,93% qui a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{masse de l'extrait} \times 100}{\text{masse initiale de la biomasse}}$$

En parallèle, une extraction conventionnelle a été réalisée à titre comparatif à l'aide d'un système Soxhlet. Cette méthode repose sur une extraction continue par reflux à température d'ébullition du solvant. Dans ce cas, nous avons effectué l'extraction sur 7,28 g de biomasse sèche à l'aide de l'hexane pendant 4 heures. La masse d'extrait obtenue a été de 0,53 g, ce qui correspond à un rendement de 7,3%, soit plus de deux fois, supérieur à celui obtenu par SFE. Toutefois, cette technique implique l'utilisation de solvants organiques volatils et de températures élevées, ce qui peut détériorer la stabilité des composés sensibles à la chaleur comme certains caroténoïdes. Ainsi, malgré un rendement plus faible, le SFE présente un avantage en termes de sélectivité, de respect de l'intégrité structurale des analytes et d'éco-compatibilité.

4.4 Analyses des extraits par LC-MS

L'objectif principal de cette étape analytique était de détecter et d'identifier les caroténoïdes présents dans les extraits de *Lemna minor*, en mettant particulièrement l'accent sur la zéaxanthine. Pour ce faire, une méthode couplant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la spectrométrie de masse (LC-MS) a été mise en œuvre. Cette approche permet à la fois la séparation chromatographique des composés et leur identification grâce à l'analyse de leur masse exacte.

4.4.1 Préparation des échantillons

Trois types d'échantillons ont été préparés : un standard pur de zéaxanthine et deux extraits obtenus respectivement par extraction conventionnelle et par CO₂ supercritique. La zéaxanthine a été préservée à -20 °C en tant que solution à 0,5 mg/ml dans l'éthanol. Cette solution a été diluée à 5 µg/ml pour les analyses LC-MS. Quant aux extraits, environ 13 mg de l'extrait ont été pesés et dissous dans l'éthanol pour une concentration finale de 0,5 mg/ml. Ces solutions ont été filtrées à l'aide de filtre en PTFE (0,2 µm, diamètre 15 mm) avant l'analyse LC-MS. Cette étape est essentielle pour éviter toute obstruction de la colonne et préserver l'intégrité de l'instrument.

4.4.2 Conditions analytiques LC-MS

Les caroténoïdes étant des molécules hautement hydrophobes, leur séparation nécessite des conditions chromatographiques adaptées à leur structure. Ce choix vise à améliorer l'élution des composés lipophiles et à optimiser leur détection par LC-MS. Cette approche s'inspire des méthodes déjà appliquées à l'analyse des lipides, en raison de similarité de polarité entre ces classes de molécules (Isaac et al., 2021)

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un système HPLC 1260 couplé à un spectromètre de masse de type TOF 6230B, tous les deux de Agilent Technologies. La séparation des analytes a été effectuée sur une colonne CSH C18 (Waters, 3,5 μm , 2,1 \times 100 mm), en utilisant un mélange eau/acétonitrile (60 :40) acidifié avec 0,1% d'acide formique pour la phase mobile A et un mélange isopropanol/acétonitrile (90 :10), également acidifié avec 0,1% d'acide formique pour la phase B. Le gradient d'élution appliqué est illustré dans la figure 4.2. Ce gradient a été conçu pour assurer une bonne séparation des pigments hydrophobes, en augmentant progressivement la proportion de solvant organique B jusqu'à 100% avant de revenir à la condition initiale pour reconditionner la colonne. Le volume d'injection a été de 1 μl et le signal UV-VIS a été enregistré simultanément à trois longueurs d'onde spécifiques : 254 nm, 280 nm, et 450 nm. Cette dernière est particulièrement adaptée pour le suivi des caroténoïdes.

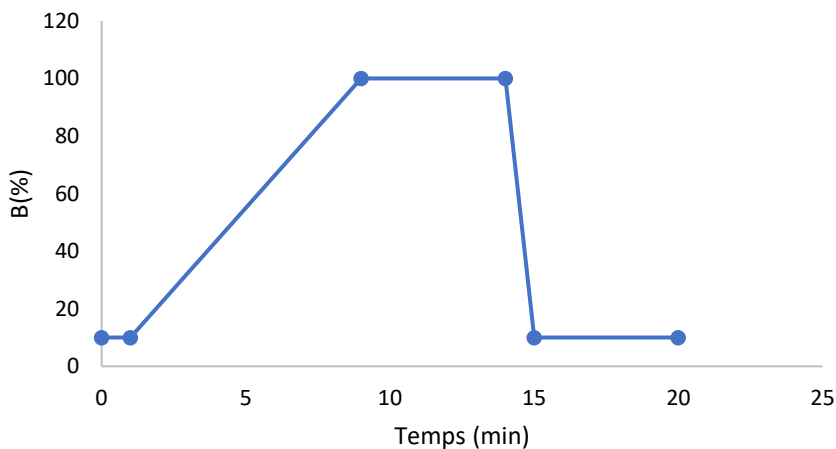


Figure 4.2 Profil du gradient d'élution utilisé pour la chromatographie.

L'ionisation a été réalisée en mode ESI (Électrospray) en polarité positive. Le choix de ce mode est justifié par la capacité des caroténoïdes à former des ions moléculaires $[M]^+$ ou des espèces protonées $[M+H]^+$ stables, facilitant leur détection. Les spectres de masse ont été enregistrés entre m/z 100 et 2000, permettant une détection des masses typiques des caroténoïdes ainsi que leurs dérivés oxydés.

4.4.3 Génération de formules élémentaires à partir des masses exactes

La détermination des formules moléculaires des composés présents dans les extraits de *Lemna minor* a été effectuée à partir des masses exactes obtenues par spectrométrie de masse à haute résolution (TOF). Cette approche repose sur la mesure très précise de la masse ionique de chaque espèce détectée dans le spectre, permettant d'en déduire sa composition élémentaire avec une marge d'erreur très faible (généralement inférieure à 5 ppm).

L'analyse des spectres MS a été réalisée à l'aide du logiciel MassHunter (Agilent Technologies), qui permet de proposer automatiquement les formules élémentaires probables en fonction des masses mesurées, du profil isotopique, et les critères de cohérence chimique (valence, éléments présents, charge). Les éléments pris en compte dans les calculs sont : le carbone (C), l'hydrogène (H), et l'oxygène (O), avec des intervalles fixés respectivement entre C (30-70), H (30-100), et O (0-10), en cohérence avec la structure typique des caroténoïdes. Lorsqu'aucune formule probable n'était obtenue avec ces paramètres, la recherche était élargie en ajoutant l'azote N (0-4). Cette étape permettait de vérifier si certains composés détectés peuvent contenir cet élément.

Il est important de préciser que les formules proposées par le logiciel restent des identifications supposées, et une identification certaine nécessite l'injection d'étalons purs. Dans le cas de la zéaxanthine, utilisée comme étalon, une très bonne correspondance a été obtenue avec la formule moléculaire $C_{40}H_{56}O_2$ (m/z théorique 568,4275 et m/z expérimental 568,4265). Les autres composés détectés ont été assignés à des structures compatibles avec la famille des xanthophylles et des carotènes, dont les formules présentent un nombre élevé d'atomes de carbone et d'hydrogène, avec parfois un ou deux atomes d'oxygène suggérant la présence de groupes fonctionnels hydroxyles ou époxydes. Cette analyse a permis de confirmer la diversité chimique des pigments extraits par SFE, tout en excluant la présence de composés majeurs n'appartenant pas à la famille ciblée. La haute résolution du détecteur TOF a également permis de séparer les isobares potentiels (molécules ayant la même masse nominale mais des masses exactes et de ce fait des formules différentes), ce qui est essentiel dans l'étude des extraits complexes issus de

matrices végétales. Ainsi, la génération des formules élémentaires s'est avérée être une étape déterminante pour l'identification des composés. En complément, des analyses futures par LC-MS/MS et une validation avec des standards commerciaux pourraient confirmer l'identité des composés détectés.

4.5 Résultats et discussions

Des essais préliminaires ont été réalisés afin d'optimiser les conditions chromatographiques, conduisant à la sélection finale d'une colonne C18 utilisée avec les conditions décrites dans la partie expérimentale. Cette optimisation a permis d'obtenir des résultats reproductibles, qui sont présentés dans cette section.

Les chromatogrammes obtenus pour le standard de zéaxanthine dans les conditions expérimentales décrites à la section 4.4.2 sont présentés dans la Figure 4.3.

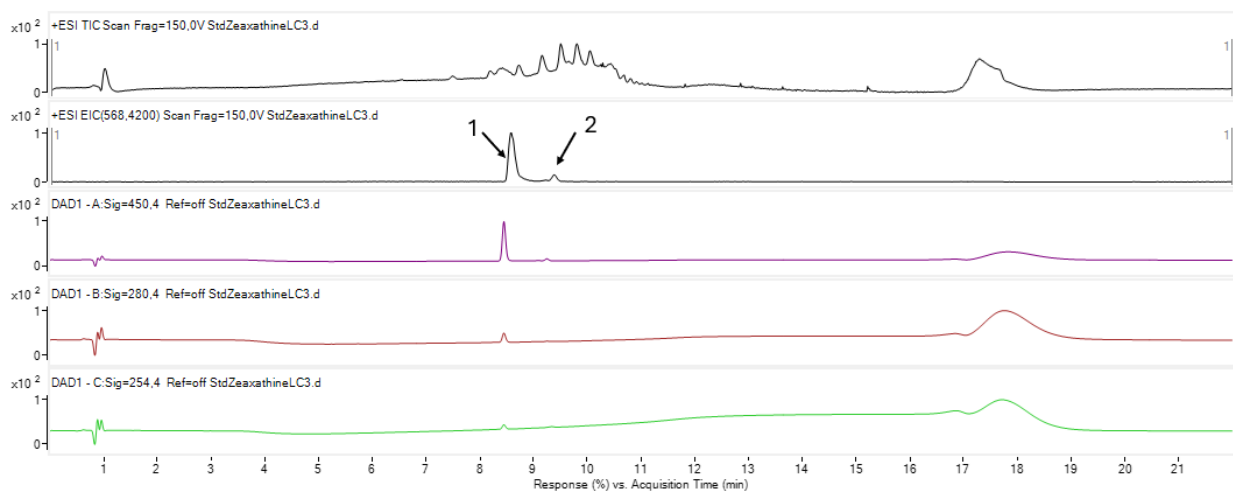


Figure 4.3 Chromatogrammes du standard zéaxanthine, du haut vers le bas : chromatogramme ionique total (TIC) et chromatogramme extrait du m/z 568,42, et chromatogrammes UV-VIS à 450 nm, 280 nm, 254 nm.

Les résultats montrent que le pic de la molécule d'intérêt, la zéaxanthine, apparaît à un temps de rétention d'environ 8,45 minutes (pic 1). Une autre espèce observée à 9,25 minutes (pic 2), présente aussi une bonne absorption à 450 nm. Cette deuxième espèce partage le même m/z avec la zéaxanthine ce qui signifie qu'elle est un isomère, possiblement la lutéine.

Les spectres de masse des molécules zéaxanthine (haut) et de son isomère (bas) dans le standard, en mode positif, sont présentes dans la figure 4.4.

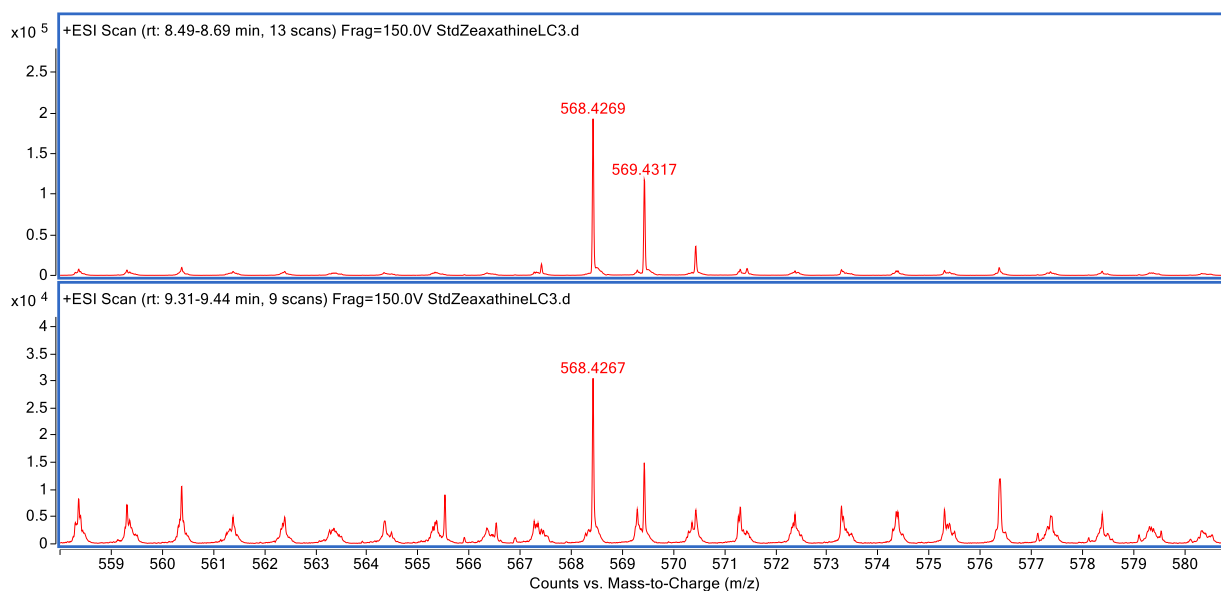


Figure 4.4 Spectres de masse de la zéaxanthine en haut, et celui de son isomère en bas, dans un standard de zéaxanthine.

Les deux spectres de masse correspondant au temps de rétention de 8,45 et 9,25 minutes, sont très proches du m/z théorique de la zéaxanthine (568,4275) indiquant que la molécule d'intérêt a été ionisée en $[M]^+$, comme le confirme les études antérieures (Pacini et al., 2015).

Il est essentiel de noter que les intensités observées en UV ne reflètent pas nécessairement celles obtenues en spectrométrie de masse. Une molécule peut absorber fortement en UV, avec ionisation faible en MS, et le contraire est vrai. Cette différence d'intensité entre les deux détecteurs explique pourquoi certains pics bien visibles à 450 nm ne présentent pas la même abondance dans le chromatogramme ionique total.

La figure 4.5 présente les chromatogrammes enregistrés pour les résultats d'analyse de l'extrait obtenu par CO₂ supercritique.

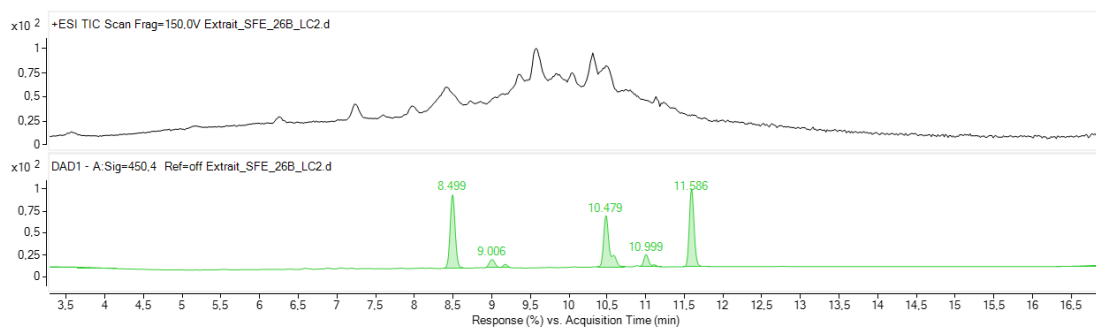


Figure 4.5 Chromatogrammes de l'extrait SFE, présentant le TIC (haut) et le chromatogramme UV à 450 nm (bas) mettant en évidence les caroténoïdes.

D'après le chromatogramme UV, plusieurs espèces ont été détectées à 450 nm. On y retrouve la zéaxanthine éluant à 8,5 min, tout comme dans l'étalon, avec un spectre de masse qui confirme son identité. Deux autres espèces (tr 10,479 min et 11,586 min) sont aussi très abondantes, avec des intensités semblables à la zéaxanthine. Afin d'obtenir une identification potentielle de ces espèces, le signal MS correspondant a été analysé. En effet, les masses exactes des espèces les plus importantes dans cet extrait se retrouvent dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 Identification des pics chromatographiques détectés par LC-MS en mode positif dans l'extrait SFE.

TR (min)	m/z (exp)	m/z (calc)	diff (ppm)	Formule ionique suggérée	Potentielle Identification	Niveau d'ident.	Intensité
7,20	593,2755	593,2758	-0,59	C ₃₅ H ₃₇ N ₄ O ₅	Pheophorbide A	2a	1,78E+06
8,00	621,3081	621,3058	3,69	C ₃₆ H ₄₅ O ₉	Apocaroténoïde oxydé	3	3,93E+06
8,29	813,5123	-	-	-	Composé non identifié	5	1,12E+06
8,34	701,6195	701,6191	0,59	C ₄₄ H ₈₁ N ₂ O ₄	Composé non identifié	4	2,50E+06
8,37	681,6503	681,6504	-0,13	C ₄₂ H ₈₅ N ₂ O ₄	Composé non identifié	4	1,02E+06
8,64	551,4246	551,4247	-0,26	C ₄₀ H ₅₅ O	Caroténoïde	3	6,20E+05
8,65	568,4266	568,4275	-1,56	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	Zéaxanthine	1	7,34E+05
8,75	585,4717	585,4725	-1,34	C ₃₄ H ₆₅ O ₇	Apocaroténoïde oxydé (dérivé oxygéné d'un caroténoïde)	3	1,50E+06
9,05	583,4345	583,4357	-2,06	C ₃₇ H ₅₉ O ₅	Apocaroténoïde oxydé	3	4,45E+05
9,17	568,4279	568,4275	0,74	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	Caroténoïde possiblement Lutéine	3	2,04E+05
9,38	537,4494	537,4455	7,31	C ₄₀ H ₅₇	Caroténoïde (possiblement isomère du β-carotène)	3	2,93E+06
9,58	613,4825	613,4827	-0,25	C ₃₉ H ₆₅ O ₅	Apocaroténoïde oxydé	3	5,11E+06
9,63	531,4080	531,4071	1,73	C ₃₆ H ₅₃ NO ₂	Composé non identifié	4	4,14E+06
9,67	780,6368	780,6375	-0,87	C ₄₉ H ₈₄ N ₂ O ₅	Composé non identifié	4	4,66E+06
9,90	579,4591	579,4606	-2,55	C ₃₃ H ₆₀ N ₃ O ₅	Composé non identifié	4	1,50E+06
10,38	479,4423	479,4459	-7,47	C ₃₁ H ₅₉ O ₃	Composé non identifié	4	6,69E+05
10,67	885,5526	885,5525	0,16	C ₅₅ H ₇₃ N ₄ O ₆	pheophytin B	2a	1,22E+06
10,97	869,5573	869,5575	-0,29	C ₅₅ H ₇₃ N ₄ O ₅	Divinyl pheophytin A	2a	1,18E+05
11,13	871,5763	871,5732	3,56	C ₅₅ H ₇₅ N ₄ O ₅	pheophytin A	2a	9,05E+06
11,73	536,4350	536,4377	-4,96	C ₄₀ H ₅₆	Caroténoïde (possiblement isomère du β-carotène)	3	1,95E+05

Conformément à la méthodologie d'identification décrite au chapitre 3 section 3.5.4, les composés détectés par LC-MS dans les extraits SFE ont été classés selon les niveaux de confiance définis par

Schymanski et al 2014. Cette classification a été utilisée pour interpréter les masses les plus intenses observées dans les extraits SFE, présentées dans le tableau 4.1.

Deux signaux différents ont été détectés pour potentiellement pour β -carotène. Le composé éluant à 9,38 min ionise par protonation et est détecté à un m/z de 537,4494. L'autre composé, éluant à 11,73 min est détecté en tant que M^+ , a un m/z de 536,4350. La présence des doubles liens dans la structure du β -carotène (Figure 4.6) donne lieu à l'existence de plusieurs isomères géométriques (*cis/trans*) (H.-E. Khoo et al., 2011). Des étalons seraient nécessaires pour identifier sans équivoque les isomères individuels.

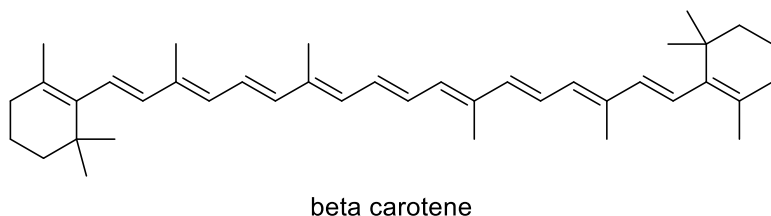


Figure 4.6 Structure de β -carotène.

La détection d'une diversité de Chlorophylles dans notre extrait n'est pas du tout une surprise car elles font partie des métabolites secondaires connus dans les plantes aquatiques (Estlander et al., 2025).

La figure 4.7 présente les chromatogrammes LC-UV-MS de l'extrait obtenu par l'extraction conventionnelle par l'hexane.

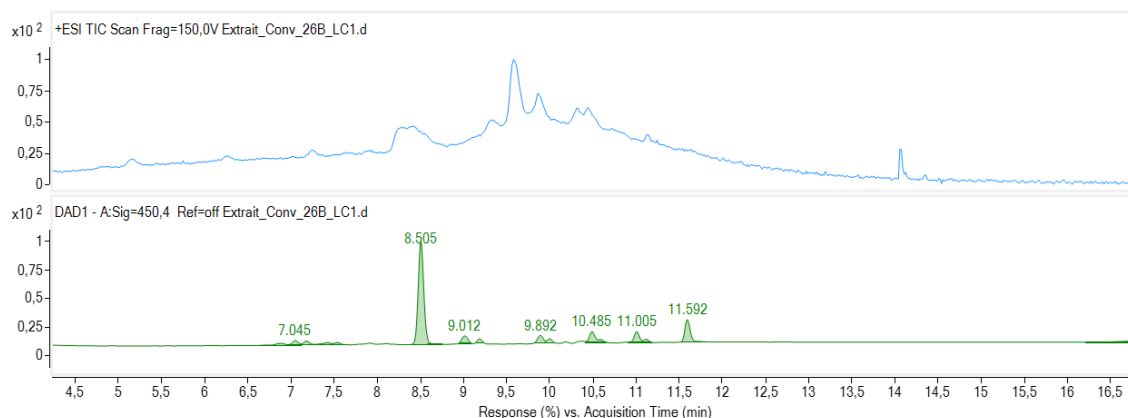


Figure 4.7 Chromatogramme ionique totale (TIC) et chromatogramme UV à 450 nm de l'extrait conventionnel.

Plusieurs espèces ont été détectées à 450 nm. Cependant, moins d'espèces ont des abondances d'une intensité semblable à celle de zéaxanthine. Comme pour l'extrait obtenu par CO₂ supercritique, les potentielles identifications des composés les plus intenses ont été regroupée dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2 Identification des pics chromatographiques détectés par LC-MS en mode positif dans l'extrait conventionnel.

TR (min)	m/z (exp)	m/z (calc)	diff (ppm)	Formule ionique suggérée	Potentielle Identification	Niveau d'ident.	Intensité
7,29	601,4229	601,4251	-3,73	C ₄₀ H ₅₇ O ₄	Caroténoïde	3	2,18E+05
8,25	813,5128	-	-	-	Composé non identifié	5	2,35E+06
8,62	551,4240	551,4247	-1,35	C ₄₀ H ₅₅ O	Caroténoïde	3	5,97E+05
8,65	568,4276	568,4275	0,21	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	Zéaxanthine	1	8,25E+05
9,14	568,4274	568,4275	-0,15	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	Caroténoïde possiblement lutéine	3	2,27E+05
9,58	613,4840	613,4827	2,2	C ₃₉ H ₆₅ O ₅	Apocaroténoïde oxydé	3	7,44E+06
10,61	885,5503	885,5525	-2,44	C ₅₅ H ₇₃ N ₄ O ₆	Pheophytin B	2a	4,64E+05
10,83	573,4862	573,4877	-2,68	C ₃₇ H ₆₅ O ₄	Apocaroténoïde oxydé	3	2,19E+05
11,19	871,5738	871,5732	0,69	C ₅₅ H ₇₅ N ₄ O ₅	Pheophytin A	2a	6,24E+06

Dans l'échantillon obtenu par l'extraction à l'hexane neuf composés majoritaires ont été détectés dont seulement trois avec des intensités dans le E+06. Malgré un rendement massique plus deux fois plus élevé pour l'extraction à l'hexane, celle-ci semble avoir donné moins de caroténoïdes que l'extraction par CO₂ supercritique. Ceci confirme la sélectivité accrue de la SFE et le fait qu'elle soit très bien adaptée à l'extraction des caroténoïdes.

4.6 Conclusions

Cette étude s'inscrit dans l'objectif de valorisation des composés bioactifs issus de biomasses aquatiques, en évaluant l'efficacité de la SFE pour l'extraction sélective des caroténoïdes. L'analyse des caroténoïdes dans les extraits de *Lemna minor* a permis d'identifier plusieurs composés d'intérêt, notamment la zéaxanthine un de ses isomères (possiblement la lutéine), le β -carotène et divers dérivés oxygénés. L'utilisation de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse a permis une caractérisation préliminaire des molécules présentes dans les extraits obtenus par extraction supercritique au CO₂ et par extraction conventionnelle à l'hexane. Les résultats montrent que l'extraction SFE réalisée à 250 bar pendant 3 heures avec un débit de CO₂ de 10 ml/min et l'ajout d'éthanol

comme co-solvant, offre une meilleure récupération des caroténoïdes en termes de diversité et d'abondance, avec des signaux plus intenses pour les composés cibles. L'ensemble de ces résultats met en évidence la capacité de la SFE à combiner sélectivité, efficacité et réduction de l'utilisation de solvants organiques pour l'extraction des caroténoïdes. Ceci en fait une approche durable et adaptée à l'exploitation industrielle des ressources aquatiques pour la production de pigments bioactifs destinés aux secteurs agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique. Il convient néanmoins de souligner certaines limites de l'approche adoptée. L'identification des composés repose principalement sur les masses exactes, ce qui reste insuffisant pour une confirmation structurale complète. L'absence de standards de référence pour la majorité des composés limite le niveau de confiance des identifications. De plus, la co-extraction de pigments tels que les chlorophylles peuvent interférer avec l'analyse des caroténoïdes. Dans ce contexte, des analyses complémentaires par LC-MS/MS ainsi que l'utilisation de standards commerciaux supplémentaires permettront de confirmer l'identité des composés et d'améliorer la robustesse de l'identification.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude menée dans ce projet vise à mieux comprendre le potentiel de *Lemna minor* en tant que source de composés bioactifs à fort potentiel de valorisation. Dès les premières étapes, le travail réalisé a consisté à construire une stratégie permettant non seulement d'extraire les molécules d'intérêt, mais aussi d'évaluer la performance des procédés d'extraction. Cette approche a permis de confirmer que cette biomasse peut devenir une ressource intéressante en composés bioactifs lorsque des méthodes écologiques d'extraction sont associées à des outils analytiques avancés et adaptés. L'objectif n'a donc jamais été uniquement technique, il s'agissait aussi de penser à une manière durable afin d'exploiter cette plante tout en minimisant l'impact environnemental.

Un des premiers points importants dans cette étude (chapitre 2) a été le développement d'une méthode LC-MS capable d'identifier et de séparer quatre flavonoïdes ciblés dans des extraits complexes. Ce travail a demandé plusieurs ajustements chromatographiques afin d'obtenir une séparation adéquate. L'un des principaux résultats obtenus est la confirmation qu'une méthode établie à l'échelle analytique est transférable vers un système préparatoire sans perdre la robustesse et la reproductibilité. Grâce à cela, il a été possible de purifier des quantités importantes des molécules ciblées, ce qui constitue un acquis essentiel pour cette recherche. Ce résultat montre également que la biomasse étudiée contient des composés suffisamment abondants ce qui rend pertinente une purification à plus grande échelle, et renforce son potentiel de valorisation.

La seconde partie du travail (chapitre 3) a porté sur les procédés d'extraction. L'optimisation de l'extraction par eau subcritique a montré que ce procédé possède un potentiel notable pour extraire efficacement les polyphénols tout en respectant les principes de la chimie verte. L'utilisation de plan d'expériences décrit dans le paragraphe 3.2.1 a permis de mieux comprendre ce qui influence réellement le rendement d'extraction. Le ratio solide/solvant s'est révélé être le facteur le plus influent, confirmant l'importance d'une bonne interaction entre la biomasse et l'eau subcritique. La température et la pression ont un impact moins marqué. La température influence l'extraction de manière non linéaire, elle peut améliorer l'extraction quand elle est dans son niveau négatif, mais des valeurs trop élevées risquent de dégrader certains composés sensibles. La pression intervient principalement pour maintenir l'eau à l'état liquide. Ce type d'analyse permet non seulement d'optimiser les paramètres, mais aussi d'éviter des conditions extrêmes qui pourraient affecter la qualité des extraits.

L'étude cinétique de l'extraction par eau subcritique a apporté une information complémentaire importante. Les analyses LC-MS ont montré que la majorité des flavonoïdes est extraite souvent dans les premières fractions. Cette observation suggère que le temps d'extraction utilisé pourrait être réduit sans affecter la performance du procédé. Ce résultat représente une avancée importante pour une perspective industrielle, où la réduction du temps et de la consommation énergétique est cruciale. Le fait de pouvoir concentrer l'essentiel des composés dans des temps courts rend l'extraction subcritique encore plus intéressante sur le plan économique et environnemental.

L'extraction au CO₂ supercritique a permis d'explorer une autre fraction de la biomasse, à savoir sa fraction lipophile en particulier les caroténoïdes (chapitre 4). L'intérêt de CO₂ supercritique est donc multiple : il permet d'extraire ces molécules sans solvants toxiques, sous des conditions adaptées, tout en préservant leur stabilité. Les résultats ont clairement montré que cette technique produit des extraits plus variés et plus abondants en caroténoïdes que l'extraction conventionnelle à l'hexane. L'ajout d'un co-solvant comme l'éthanol a également permis de récupérer des composés moins solubles dans CO₂, en améliorant la portée de l'extraction. Ces deux techniques d'extraction, SWE et SFE, se complètent bien. L'eau subcritique extrait principalement les composés polaires, tandis que le CO₂ supercritique est particulièrement efficace pour les composés lipophiles. Cette complémentarité offre des perspectives d'utilisation globale de la biomasse. Il devient alors possible d'imaginer une stratégie d'extraction qui repose sur deux étapes : extraire les pigments lipophiles dans une première étape, puis les polyphénols dans une seconde. Les résultats obtenus dans cette étude montrent qu'il serait pertinent, dans un contexte de valorisation réelle, de commencer par extraire les caroténoïdes par CO₂ supercritique, car ils sont mieux récupérés dans ces conditions et leur stabilité est mieux préservée. Le résidu obtenu après la SFE peut ensuite être utilisé pour une extraction par eau subcritique, permettant de récupérer les polyphénols encore présents dans la biomasse. Une telle stratégie maximiserait l'utilisation de la biomasse végétale, limiterait la production de déchets, et permettrait de produire deux extraits riches en molécules bioactives distinctes. Cela correspond parfaitement aux principes de la bioéconomie circulaire, qui repose sur une exploitation intelligente et responsable des ressources naturelles.

Au-delà des résultats techniques, ce travail met en lumière la richesse encore peu exploitée des biomasses aquatiques *Lemna minor*, souvent considérées comme des plantes sans valeur, se révèlent ici comme une source de composés bioactifs prometteurs. Grâce à l'association d'outils analytiques performants et de procédés d'extraction écologiques, il devient possible d'envisager une approche de valorisation complète

basée sur ces plantes. Les extraits obtenus, qu'ils soient riches en flavonoïdes ou en caroténoïdes, présentent un intérêt pour plusieurs secteurs industriels, notamment la cosmétique, nutrition, et la pharmaceutique. Les perspectives ouvertes par cette étude sont nombreuses. Une optimisation plus poussée des paramètres d'extraction permettrait probablement d'améliorer encore les rendements ou la sélectivité des procédés. L'identification plus approfondie des composés par technique complémentaires, comme la RMN ou la MS/MS, pourrait apporter des informations supplémentaires sur la diversité chimique de la biomasse. Enfin, une perspective importante réside dans le passage à grande échelle et l'évaluation des applications industrielles des extraits obtenus. Des études complémentaires portant sur la bioactivité des extraits (activité antioxydante, anti-inflammatoires ou antimicrobienne) permettraient de mieux valoriser leurs potentiels dans les domaines cosmétique, pharmaceutique et nutraceutique.

L'ensemble de ce travail montre qu'il est possible d'extraire, d'identifier et de valoriser efficacement les composés bioactifs issus d'une biomasse aquatique en s'appuyant sur des procédés verts et des méthodes analytiques robustes. L'utilisation de procédés dits « verts » permet non seulement de limiter l'impact environnemental des étapes d'extraction, mais également de préserver l'intégrité et l'activité des molécules d'intérêt, renforçant ainsi la pertinence de cette approche dans un contexte de développement durable. Cette démarche offre une vision globale de la valorisation des plantes aquatiques, où les avancées technologiques sont mises au service d'une exploitation responsable des ressources naturelles. Elle s'inscrit dans une logique d'économie circulaire, où la biomasse souvent sous-exploitée ou considérée comme un déchet, peut être transformée en source de composés à forte valeur ajoutée. Ainsi, la biomasse étudiée n'apparaît plus comme une simple plante aquatique, mais comme une ressource prometteuse aux multiples potentialités d'application. Toutefois, ces perspectives nécessitent encore des investigations complémentaires afin d'évaluer pleinement les usages, leur viabilité industrielle et leur impact à long terme.

ANNEXE A

CINÉTIQUE DE L'EXTRACTION SWE

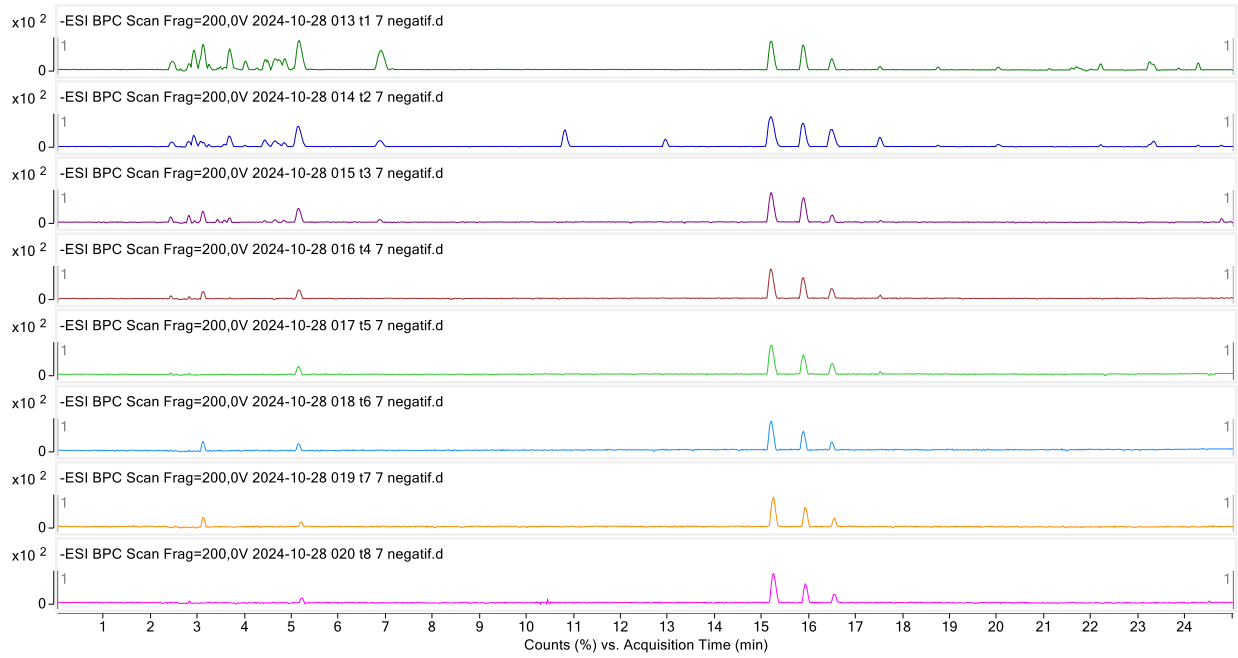


Figure A.1 Chromatogrammes de base (BPC) des huit fractions obtenues en mode négatif pour l'essai optimisé 7.

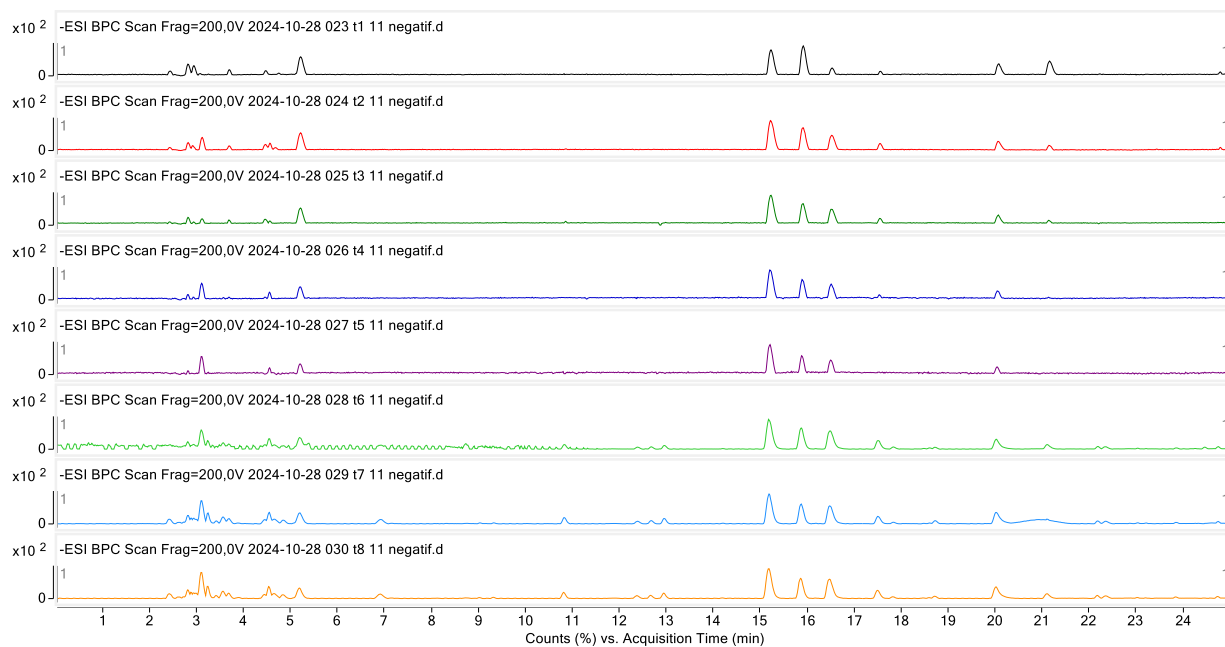


Figure A.2 Chromatogrammes de base (BPC) des huit fractions obtenues en mode négatif pour l'essai optimisé 11.

Tableau A.1 Identification des molécules les plus abondantes de l'essai 7 en mode négatif.

Tr (min)	m/z (exp)	m/z (calc)	diff (ppm)	Formule ionique suggérée	Potentiel identification	Niveau d'ident.	Intensité
2,82	259,0229	259,0248	-7,35	C ₁₃ H ₇ O ₆	Xanthone polyhydroxylée	3	7,18E+04
2,77	615,0706	615,0722	-2,53	C ₃₈ H ₁₅ O ₉	Composé non identifié	4	2,24E+04
2,90	439,0441	439,0459	-4,18	C ₂₅ H ₁₁ O ₈	Composé polyaromatique oxydé	3	6,03E+04
2,95	339,0298	339,0299	-0,29	C ₂₁ H ₇ O ₅	Composé polyaromatique oxydé	3	7,92E+04
8,26	549,0876	549,0886	-1,81	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₅	Composé phénolique	3	1,62E+04
10,64	355,0683	355,0671	3,45	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₀	Acide phénolique conjugué	3	1,29E+04
10,82	353,0877	353,0878	-0,3	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	Composé phénolique	3	4,43E+04
12,21	337,0919	337,0929	-2,93	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	Composé phénolique	3	1,78E+04
13,91	527,0486	527,0467	3,54	C ₂₄ H ₁₅ O ₁₄	Composé non identifié	4	2,60E+04
15,21	447,0921	447,0933	-2,64	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	Orientine	1	7,63E+05
15,76	519,1869	519,1872	-0,55	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁	Terpénoïdes	3	2,97E+04
15,90	431,0986	431,0984	0,53	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	Apigénine-7-O-glucoside	1	6,52E+05
16,50	447,0930	447,0933	-0,64	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	Lutéoline-7-O-glucoside	1	2,65E+05
17,54	431,0986	431,0984	0,53	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	Vitexine	1	1,45E+05
18,76	713,4721	713,4693	3,95	C ₃₅ H ₆₉ O ₁₄	Composé non identifié	4	1,11E+05
21,12	269,046	269,0455	1,68	C ₁₅ H ₉ O ₅	Composé phénolique	3	1,10E+05
21,98	325,2023	325,202	0,77	C ₁₈ H ₂₉ O ₅	Lipides	3	5,04E+04
24,78	291,1968	291,1966	0,79	C ₁₈ H ₂₇ O ₃	Lipides	3	1,86E+05

Tableau A.2 Identification des molécules les plus abondantes de l'essai 11 en mode négatif

Tr (min)	m/z (exp)	m/z (calc)	diff (ppm)	Formule ionique suggérée	Potentiel identification	Niveau d'ident.	Intensité
2,77	615,1116	615,1144	-4,57	C ₃₂ H ₂₃ O ₁₃	Composé non identifié	4	2,64E+04
3,24	365,0658	365,0667	-2,39	C ₂₀ H ₁₃ O ₇	Composé phénolique	3	9,93E+04
4,56	633,0857	633,0886	-4,56	C ₃₁ H ₂₁ O ₁₅	Composé non identifié	4	4,27E+04
6,76	587,1248	587,1254	-0,97	C ₂₄ H ₂₇ O ₁₇	Composé non identifié	4	2,07E+04
7,31	571,1304	571,1305	-0,1	C ₂₄ H ₂₇ O ₁₆	Composé non identifié	4	2,25E+04
8,33	549,0883	549,0886	-0,53	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₅	Composé phénolique	3	3,85E+04
8,45	572,1153	572,1172	-3,24	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₄	Composé phénolique	3	2,41E+04
9,07	329,088	329,0878	0,59	C ₁₄ H ₁₇ O ₉	Acide phénolique glycosylé	3	3,56E+04
10,86	353,0886	353,0878	2,24	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	Composé phénolique	3	1,94E+05
12,99	707,1816	707,1829	-1,82	C ₃₂ H ₃₅ O ₁₈	Composé phénolique	3	1,93E+04
14,24	337,0927	337,0929	-0,57	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	Composé phénolique	3	3,25E+04
14,58	505,098	505,0988	-1,51	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₃	Composé phénolique	3	3,44E+04
15,23	447,0937	447,0933	0,93	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	Orientine	1	1,08E+06
15,77	519,1863	519,1872	-1,7	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁	Terpénoïdes	3	3,00E+04
15,92	431,0981	431,0984	-0,63	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	Apigénine-7-O-glucoside	1	7,95E+05
16,52	447,0933	447,0933	0	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	Lutéoline-7-O-glucoside	1	6,01E+05
17,54	431,0983	431,0984	-0,16	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	Vitexine	1	2,92E+05
20,07	285,0402	285,0405	-0,91	C ₁₅ H ₉ O ₆	Composé phénolique	3	4,10E+05
21,15	269,0453	269,0455	-0,91	C ₁₅ H ₉ O ₅	Composé phénolique	3	2,31E+05
22,22	489,27	489,2705	-1,06	C ₂₄ H ₄₁ O ₁₀	Composé non identifié	4	1,16E+05
23,07	491,2857	491,2862	-0,96	C ₂₄ H ₄₃ O ₁₀	Composé non identifié	4	4,89E+04
23,42	209,0453	209,0455	-1,18	C ₁₀ H ₉ O ₅	Composé phénolique	3	7,29E+04
24,29	309,2068	309,2071	-1,07	C ₁₈ H ₂₉ O ₄	Lipide	3	7,55E+04
24,58	291,1968	291,2038	0,79	C ₁₈ H ₂₇ O ₃	Lipide	3	1,54E+05

ANNEXE B

DONNÉES COMPLÉMENTAIRES

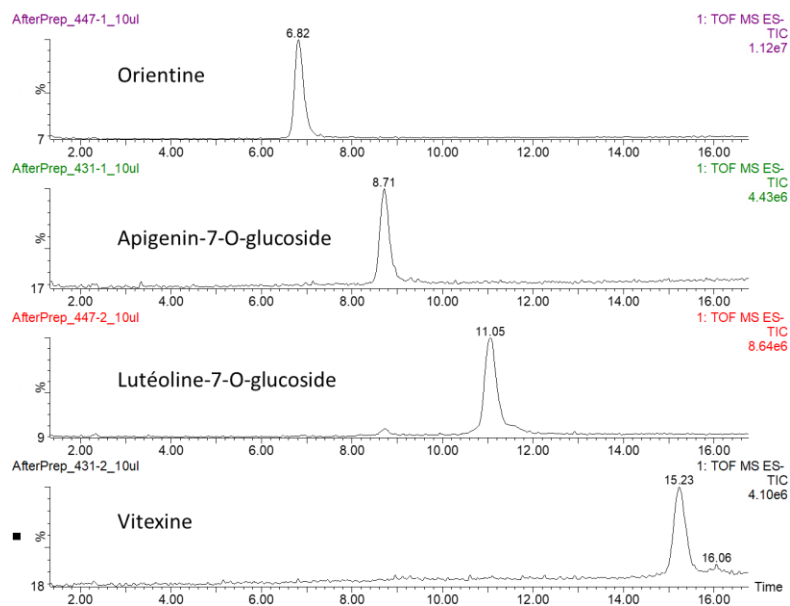


Figure B.1 Chromatogrammes TIC des fractions purifiées

Tableau B.1 Évolution du rendement d'extraction au cours du temps pour les échantillons de APL

Temps (heur)	Masse extrait (g)	Rendement (%)
APL 1h	1,11	5,52
APL 2h	2,60	12,94
APL 3h	0,57	2,86
APL 4h	0,24	1,2
APL 5h	0,14	0,71
APL 6h	0,12	0,61
APL 7h	0,43	2,14
Total	5,22	25,99

Équation utilisée pour calculée la tenure en anthocyanine

$$\% \frac{p}{p} = \frac{A}{\epsilon L} \times MV \times DF \times \frac{V}{m} \times 100$$

%p/p= pourcentage massique des anthocyanes

A = absorbance

ϵ = absorptivité molaire de Cyd-3-glu (26900 l mol⁻¹ cm⁻¹)

MW = Masse molaire de l'anthocyane (449,2 g mol⁻¹)

DF = Facteur de dilution

V = volume final (ml)

m = poids de l'échantillon (mg)

L = longueur de la cellule (cm)

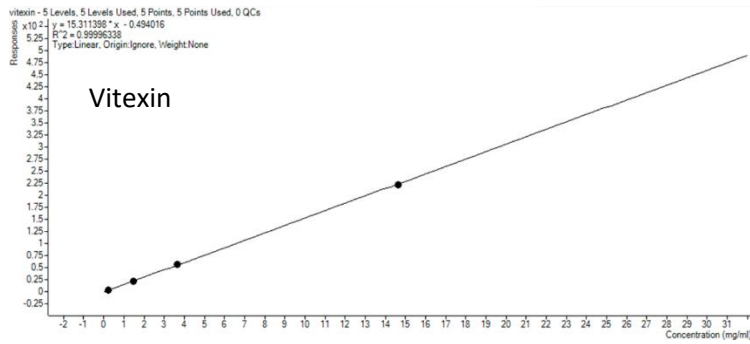
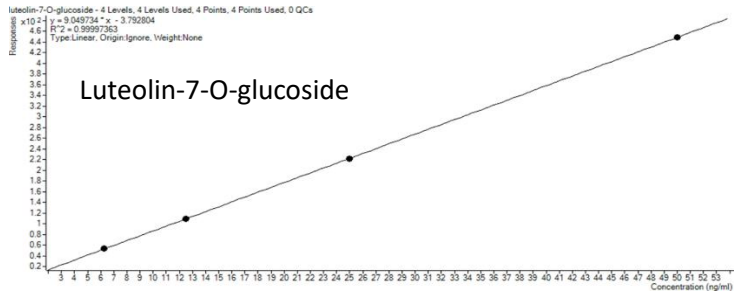
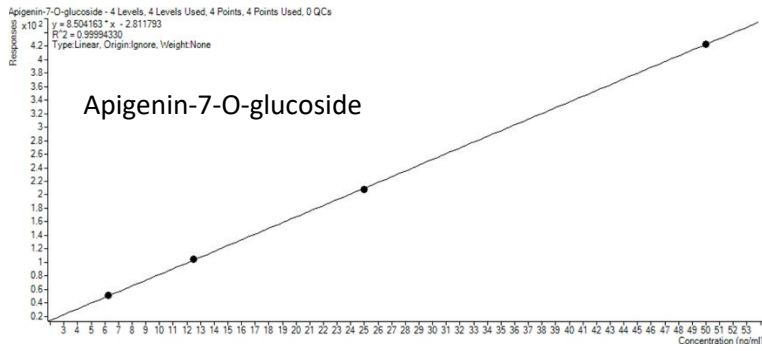
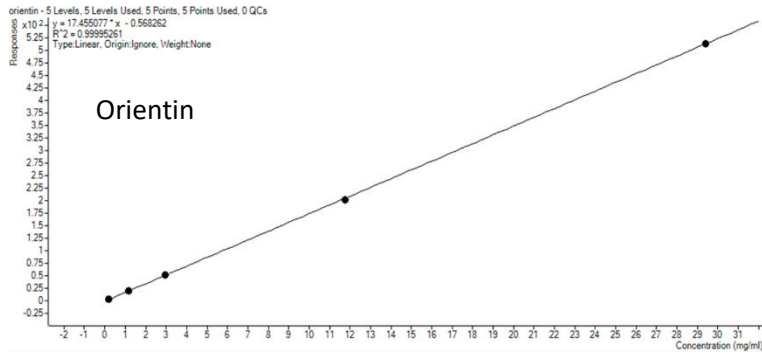


Figure B.2 Courbes de calibrations des quatre flavonoïdes ciblés.

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Khayri, J. M., Rashmi, R., Toppo, V., Chole, P. B., Banadka, A., Sudheer, W. N., Nagella, P., Shehata, W. F., Al-Mssallem, M. Q., Alessa, F. M., Almaghasla, M. I., & Rezk, A. A.-S. (2023). Plant Secondary Metabolites : The Weapons for Biotic Stress Management. *Metabolites*, 13(6), 716. <https://doi.org/10.3390/metabo13060716>
- Al-Khayri, J. M., Sahana, G. R., Nagella, P., Joseph, B. V., Alessa, F. M., & Al-Mssallem, M. Q. (2022). Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules : A Review. *Molecules*, 27(9), 2901. <https://doi.org/10.3390/molecules27092901>
- Allen, D. R., & McWhinney, B. C. (2019). Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry : A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications. *The Clinical Biochemist Reviews*, 40(3), 135-146. <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00023>
- An, J.-P., Liu, Y.-J., Zhang, X.-W., Bi, S.-Q., Wang, X.-F., You, C.-X., & Hao, Y.-J. (2020). Dynamic regulation of anthocyanin biosynthesis at different light intensities by the BT2-TCP46-MYB1 module in apple. *Journal of Experimental Botany*, 71(10), 3094-3109. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa056>
- Anderson-Cook, C. M., Cao, Y., & Lu, L. (2016). Maximize, minimize or target—Optimization for a fitted response from a designed experiment. *Quality Progress*, 2016, Article LA-UR--15-29104. <https://www.osti.gov/pages/biblio/1256104>
- Appenroth, K.-J., Sree, K. S., Böhm, V., Hammann, S., Vetter, W., Leiterer, M., & Jahreis, G. (2017). Nutritional value of duckweeds (Lemnaceae) as human food. *Food Chemistry*, 217, 266-273. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.116>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials : A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Babaei, F., Moafizad, A., Darvishvand, Z., Mirzababaei, M., Hosseinzadeh, H., & Nassiri-Asl, M. (2020). Review of the effects of vitexin in oxidative stress-related diseases. *Food Science & Nutrition*, 8(6), 2569-2580. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1567>
- Baek, G., Saeed, M., & Choi, H.-K. (2021). Duckweeds : Their utilization, metabolites and cultivation. *Applied Biological Chemistry*, 64(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s13765-021-00644-z>
- Baldi, A., Verdi, L., Piacenti, L., & Lenzi, A. (2025). From Waste to Resource : Use of Lemna minor L. as Unconventional Fertilizer for Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Horticulturae*, 11(1), 20. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11010020>
- Banerjee, S., & Mazumdar, S. (2012). Electrospray Ionization Mass Spectrometry : A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 282574. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>

- Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., Devkota, H. P., Orhan, I. E., Patra, J. K., Das, G., Anandharamakrishnan, C., Gomez-Gomez, L., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., & Atanasov, A. G. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals : Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *100*, 82-102. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.018>
- Bolat, E., Saritaş, S., Duman, H., Eker, F., Akdaşçı, E., Karav, S., & Witkowska, A. M. (2024). Polyphenols : Secondary Metabolites with a Biological Impression. *Nutrients*, *16*(15), 2550. <https://doi.org/10.3390/nu16152550>
- Boonarsa, P., Bunyatratthata, A., Chumroenphat, T., Thammapat, P., Chaikwang, T., Siripan, T., Li, H., & Siriamornpun, S. (2024). Nutritional Quality, Functional Properties, and Biological Characterization of Watermeal (*Wolffia globosa*). *Horticulturae*, *10*(11), 1171. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10111171>
- Bordoloi, A., & Goosen, N. J. (2020). A greener alternative using subcritical water extraction to valorize the brown macroalgae *Ecklonia maxima* for bioactive compounds. *Journal of Applied Phycology*, *32*(4), 2307-2319. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02043-1>
- Botes, J., Ma, X., Chang, J., Van de Peer, Y., & Berger, D. K. (2025). Flavonoids and anthocyanins in seagrasses : Implications for climate change adaptation and resilience. *Frontiers in Plant Science*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1520474>
- Bouwmeester, H., Schuurink, R. C., Bleeker, P. M., & Schiestl, F. (2019). The role of volatiles in plant communication. *The Plant Journal*, *100*(5), 892-907. <https://doi.org/10.1111/tpj.14496>
- Boyes, B. E., & Dong, M. W. (2018). *Modern Trends and Best Practices in Mobile-Phase Selection in Reversed-Phase Chromatography | LCGC International*. <https://www.chromatographyonline.com/view/modern-trends-and-best-practices-mobile-phase-selection-reversed-phase-chromatography-0>
- Buhrman, K., Aravena-Calvo, J., Ross Zaulich, C., Hinz, K., & Laursen, T. (2022). Anthocyanic Vacuolar Inclusions : From Biosynthesis to Storage and Possible Applications. *Frontiers in Chemistry*, *10*, 913324. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.913324>
- Butterfield, D. A., & Halliwell, B. (2019). Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, *20*(3), 148-160. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0132-6>
- Chakraborty, B. S. (2023). Design of experiments : A design to improve pharmaceutical research. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, *14*(1), 1. https://doi.org/10.4103/japtr.japtr_690_22
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green Extraction of Natural Products : Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(7), 8615-8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Chemat, F., Vian, M. A., Fabiano-Tixier, A.-S., Nutrizio, M., Jambrak, A. R., Munekata, P. E. S., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Binello, A., & Cravotto, G. (2020). A review of sustainable and intensified

- techniques for extraction of food and natural products. *Green Chemistry*, 22(8), 2325-2353. <https://doi.org/10.1039/C9GC03878G>
- Chen, S., Wang, X., Cheng, Y., Gao, H., & Chen, X. (2023). A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. *Molecules*, 28(13), 4982. <https://doi.org/10.3390/molecules28134982>
- Chen, Z., Wu, W., Wen, Y., Zhang, L., Wu, Y., Farid, M. S., El-Seedi, H. R., Capanoglu, E., & Zhao, C. (2023). Recent advances of natural pigments from algae. *Food Production, Processing and Nutrition*, 5(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s43014-023-00155-y>
- Cheng, Y., Xue, F., Yu, S., Du, S., & Yang, Y. (2021). Subcritical Water Extraction of Natural Products. *Molecules*, 26(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/molecules26134004>
- Chiriac, E. R., Chițescu, C. L., Geană, E.-I., Gird, C. E., Socoteanu, R. P., & Boscencu, R. (2021). Advanced Analytical Approaches for the Analysis of Polyphenols in Plants Matrices—A Review. *Separations*, 8(5), 65. <https://doi.org/10.3390/separations8050065>
- Choo, C. Y., Sulong, N. Y., Man, F., & Wong, T. W. (2012). Vitexine et isovitexine des feuilles de *Ficus deltoidea* avec inhibition *in vivo* de l'α-glucosidase. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(3), 776-781. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.062>
- Collins, L. M., Dziak, J. J., & Li, R. (2009). Design of Experiments with Multiple Independent Variables : A Resource Management Perspective on Complete and Reduced Factorial Designs. *Psychological methods*, 14(3), 202-224. <https://doi.org/10.1037/a0015826>
- Coskun, O. (2016). Separation techniques : Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), 156-160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
- Costarelli, A., Cannavò, S., Cerri, M., Pellegrino, R. M., Reale, L., Paolocci, F., & Pasqualini, S. (2021). Light and Temperature Shape the Phenylpropanoid Profile of *Azolla filiculoides* Fronds. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.727667>
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics : Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001. <https://doi.org/10.1039/b802662a>
- Crupi, P., Faienza, M. F., Naeem, M. Y., Corbo, F., Clodoveo, M. L., & Muraglia, M. (2023). Overview of the Potential Beneficial Effects of Carotenoids on Consumer Health and Well-Being. *Antioxidants*, 12(5), 1069. <https://doi.org/10.3390/antiox12051069>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics : Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- De Stefano, A., Caporali, S., Di Daniele, N., Rovella, V., Cardillo, C., Schinzari, F., Minieri, M., Pieri, M., Candi, E., Bernardini, S., Tesauro, M., & Terrinoni, A. (2021). Anti-Inflammatory and Proliferative Properties of Luteolin-7-O-Glucoside. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ijms22031321>

- de Andrade Lima, M., Kestekoglou, I., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2019). Supercritical Fluid Extraction of Carotenoids from Vegetable Waste Matrices. *Molecules*, 24(3), 466. <https://doi.org/10.3390/molecules24030466>
- de Carvalho, C. C. C. R., & Caramujo, M. J. (2017). Carotenoids in Aquatic Ecosystems and Aquaculture : A Colorful Business with Implications for Human Health. *Frontiers in Marine Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00093>
- Demmig-Adams, B., Hodges, A. K., Polutchko, S. K., & Adams, W. W. (2025). Zeaxanthin and Other Carotenoids : Roles in Abiotic Stress Defense with Implications for Biotic Defense. *Plants*, 14(17), 2703. <https://doi.org/10.3390/plants14172703>
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*, 2(2), 303-336. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>
- Dong, M. W. (2006). *Modern HPLC for Practicing Scientists* (1^{re} éd.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/0471973106>
- Durakovic, B. (2017). Design of experiments application, concepts, examples : State of the art. *Periodicals of Engineering and Natural Sciences (PEN)*, 5(3). <https://doi.org/10.21533/pen.v5i3.145>
- Eker, M. E., Aaby, K., Budic-Leto, I., Rimac Brnčić, S., El, S. N., Karakaya, S., Simsek, S., Manach, C., Wiczowski, W., & de Pascual-Teresa, S. (2020). A Review of Factors Affecting Anthocyanin Bioavailability : Possible Implications for the Inter-Individual Variability. *Foods*, 9(1), 2. <https://doi.org/10.3390/foods9010002>
- Elshafie, H. S., Camele, I., & Mohamed, A. A. (2023). A Comprehensive Review on the Biological, Agricultural and Pharmaceutical Properties of Secondary Metabolites Based-Plant Origin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3266. <https://doi.org/10.3390/ijms24043266>
- Estlander, S., Rajala, S., Pippingsköld, E., Nurminen, L., & Horppila, J. (2025). Response rate of submerged macrophyte chlorophyll content under changing light conditions. *Limnology*, 26(2), 293-300. <https://doi.org/10.1007/s10201-024-00775-4>
- Fabbrini, M., D'Amico, F., Barone, M., Conti, G., Mengoli, M., Brigidi, P., & Turrone, S. (2022). Polyphenol and Tannin Nutraceuticals and Their Metabolites : How the Human Gut Microbiota Influences Their Properties. *Biomolecules*, 12(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/biom12070875>
- Ferreira, C., Moreira, M. M., Delerue-Matos, C., & Sarraguça, M. (2023). Subcritical Water Extraction to Valorize Grape Biomass—A Step Closer to Circular Economy. *Molecules*, 28(22), 7538. <https://doi.org/10.3390/molecules28227538>
- Ferreyra, M. L. F., Serra, P., & Casati, P. (2021). Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure. *Physiologia Plantarum*, 173(3), 736-749. <https://doi.org/10.1111/ppl.13543>
- Gross, J. H. (2017). *Mass Spectrometry*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7>

- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1981). The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 256(9), 4494-4497. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69462-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69462-7)
- Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources : Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry*, 98(1), 136-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058>
- Hirsch, E. C., & Hunot, S. (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease : A target for neuroprotection? *The Lancet. Neurology*, 8(4), 382-397. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70062-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70062-6)
- Hochman, G., & Palatnik, R. R. (2022). The Economics of Aquatic Plants : The Case of Algae and Duckweed. *Annual Review of Resource Economics*, 14(Volume 14, 2022), 555-577. <https://doi.org/10.1146/annurev-resource-111920-011624>
- Hu, C., & Kitts, D. D. (2004). Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 265(1), 107-113. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000044364.73144.fe>
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
- Isaac, G., Munjoma, N., Gethings, L. A., Mullin, L., & Plumb, R. S. (2021). *A Robust and Reproducible Reversed- Phase Lipid Profiling Method for Large Sample Sets*.
- Jan, R., Asaf, S., Numan, M., Lubna, & Kim, K.-M. (2021). Plant Secondary Metabolite Biosynthesis and Transcriptional Regulation in Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. *Agronomy*, 11(5), 968. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050968>
- Jankovic, A., Chaudhary, G., & Goia, F. (2021). Designing the design of experiments (DOE) – An investigation on the influence of different factorial designs on the characterization of complex systems. *Energy and Buildings*, 250, 111298. <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2021.111298>
- Jelani, F., Walker, G., & Akunna, J. (2023). Effects of thermo-chemical and enzymatic pre-treatment of tropical seaweeds and freshwater macrophytes on biogas and bioethanol production. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20(12), 12999-13008. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-04843-7>
- Karpievitch, Y. V., Polpitiya, A. D., Anderson, G. A., Smith, R. D., & Dabney, A. R. (2010). Liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics : Biological and technological aspects. *The Annals of Applied Statistics*, 4(4). <https://doi.org/10.1214/10-AOAS341>
- Khan, M. K., Paniwnyk, L., & Hassan, S. (2019). Polyphenols as Natural Antioxidants : Sources, Extraction and Applications in Food, Cosmetics and Drugs. In Y. Li & F. Chemat (Éds.), *Plant Based "Green Chemistry 2.0" : Moving from Evolutionary to Revolutionary* (p. 197-235). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3810-6_8

- Khaw, K.-Y., Parat, M.-O., Shaw, P. N., & Falconer, J. R. (2017). Solvent Supercritical Fluid Technologies to Extract Bioactive Compounds from Natural Sources : A Review. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 22(7), 1186. <https://doi.org/10.3390/molecules22071186>
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins : Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1361779. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- Khoo, H.-E., Prasad, K. N., Kong, K.-W., Jiang, Y., & Ismail, A. (2011). Carotenoids and Their Isomers : Color Pigments in Fruits and Vegetables. *Molecules*, 16(2), 1710-1738. <https://doi.org/10.3390/molecules16021710>
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*, 12(2), 457. <https://doi.org/10.3390/nu12020457>
- Kotoula, D., Iliopoulou, A., Irakleous-Palaiologou, E., Gatidou, G., Aloupi, M., Antonopoulou, P., Fountoulakis, M. S., & Stasinakis, A. S. (2020). Traitement des eaux usées municipales par combinaison en série de microalgues *Chlorella sorokiniana* et de macrophyte *Lemna minor* : Résultats préliminaires. *Journal of Cleaner Production*, 271, 122704. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122704>
- Kumar, B. R. (2017). Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(6), 349-364. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.06.005>
- Leão, G. A., de Oliveira, J. A., Felipe, R. T. A., Farnese, F. S., & Gusman, G. S. (2014). Anthocyanins, thiols, and antioxidant scavenging enzymes are involved in *Lemna gibba* tolerance to arsenic. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 143-151. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.784815>
- Lee, A., Naquash, A., Lee, M., Chaniago, Y. D., & Lim, H. (2022). Exploitation of distillation for energy-efficient and cost-effective environmentally benign process of waste solvents recovery from semiconductor industry. *Science of The Total Environment*, 841, 156743. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156743>
- Lee, J.-E., Jayakody, J. T. M., Kim, J.-I., Jeong, J.-W., Choi, K.-M., Kim, T.-S., Seo, C., Azimi, I., Hyun, J., & Ryu, B. (2024). The Influence of Solvent Choice on the Extraction of Bioactive Compounds from Asteraceae : A Comparative Review. *Foods*, 13(19), 3151. <https://doi.org/10.3390/foods13193151>
- Leng, R. A., Stambolie, J. H., & Bell, R. (1995). *Duckweed – a potential high-protein feed resource for domestic animals and fish*. 7(1). <https://lrrd.cipav.org.co/lrrd7/1/3.htm>
- Leyva-Jiménez, F.-J., Fernández-Ochoa, Á., Cádiz-Gurrea, M. de la L., Lozano-Sánchez, J., Oliver-Simancas, R., Alañón, M. E., Castangia, I., Segura-Carretero, A., & Arráez-Román, D. (2022). Application of Response Surface Methodologies to Optimize High-Added Value Products Developments : Cosmetic Formulations as an Example. *Antioxidants*, 11(8), 1552. <https://doi.org/10.3390/antiox11081552>

- Liu, J., Liu, W., & Zhao, S. (2025). Biology, Ecology and Management of Aquatic Macrophytes and Algae (Volume I). *Biology*, 14(3), 246. <https://doi.org/10.3390/biology14030246>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1), 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R. E., Marcelis, L. F. M., Visser, R. G. F., & Bovy, A. (2018). Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables : A Review. *Frontiers in Chemistry*, 6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00052>
- Majewska, E., & Drużyńska, B. (2025). Validation of Microplate Methods for Total Phenolic Content and Antioxidant Activity on Honeys, and Comparison with Conventional Spectrophotometric Methods. *Applied Sciences*, 15(20), 11234. <https://doi.org/10.3390/app152011234>
- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 74(1), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
- Maranho, L. T., & Gomes, M. P. (2024). Morphophysiological Adaptations of Aquatic Macrophytes in Wetland-Based Sewage Treatment Systems : Strategies for Resilience and Efficiency under Environmental Stress. *Plants*, 13(20), 2870. <https://doi.org/10.3390/plants13202870>
- Mase, C., Sueur, M., Lavanant, H., Rüger, C. P., Giusti, P., & Afonso, C. (2025). Ion Source Complementarity for Characterization of Complex Organic Mixtures Using Fourier Transform Mass Spectrometry : A Review. *Mass Spectrometry Reviews*, 44(5), 808-829. <https://doi.org/10.1002/mas.21910>
- Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L., & Silva, P. (2020). Anthocyanins : A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 25(17), 3809. <https://doi.org/10.3390/molecules25173809>
- Meléndez-Martínez, A. J., Mandić, A. I., Bantis, F., Böhm, V., Borge, G. I. A., Brnčić, M., Bysted, A., Cano, M. P., Dias, M. G., Elgersma, A., Fikselová, M., García-Alonso, J., Giuffrida, D., Gonçalves, V. S. S., Hornero-Méndez, D., Kljak, K., Lavelli, V., Manganaris, G. A., Mapelli-Brahm, P., ... O'Brien, N. (2022). A comprehensive review on carotenoids in foods and feeds : Status quo, applications, patents, and research needs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(8), 1999-2049. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1867959>
- Molner, J. V., Pérez-González, R., Sòria-Perpinyà, X., & Soria, J. (2024). Climatic Influence on the Carotenoids Concentration in a Mediterranean Coastal Lagoon Through Remote Sensing. *Remote Sensing*, 16(21), 4067. <https://doi.org/10.3390/rs16214067>
- Naviglio, D., Trifuoggi, M., Varchetta, F., Nebbioso, V., Perrone, A., Avolio, L., De Martino, E., Montesano, D., & Gallo, M. (2023). Efficiency of Recovery of the Bioactive Principles of Plants by Comparison between Solid-Liquid Extraction in Mixture and Single-Vegetable Matrices via Maceration and RSLDE. *Plants*, 12(16), 2900. <https://doi.org/10.3390/plants12162900>
- Oláh, V., Combi, Z., Szöllösi, E., Kanalas, P., & Mészáros, I. (2009). ANTHOCYANINS : POSSIBLE ANTIOXIDANTS AGAINST Cr (VI) INDUCED OXIDATIVE STRESS IN *SPIRODELA POLYRRHIZA*. *Cereal Research Communications*, 37, 533-536.

- Oyama, Y., Fuchs, P. A., Katayama, N., & Noda, K. (1994). Myricetin and quercetin, the flavonoid constituents of Ginkgo biloba extract, greatly reduce oxidative metabolism in both resting and Ca²⁺-loaded brain neurons. *Brain Research*, *635*(1-2), 125-129. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91431-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91431-1)
- Pacini, T., Fu, W., Gudmundsson, S., Chiaravalle, A. E., Brynjolfson, S., Palsson, B. O., Astarita, G., & Paglia, G. (2015). Multidimensional Analytical Approach Based on UHPLC-UV-Ion Mobility-MS for the Screening of Natural Pigments. *Analytical Chemistry*, *87*(5), 2593-2599. <https://doi.org/10.1021/ac504707n>
- Pagliuso, D., Palacios Jara, C. E., Grandis, A., Lam, E., Pena Ferreira, M. J., & Buckeridge, M. S. (2020). Flavonoids from duckweeds : Potential applications in the human diet. *RSC Advances*, *10*(73), 44981-44988. <https://doi.org/10.1039/d0ra06741e>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids : An overview. *Journal of Nutritional Science*, *5*, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pasos-Panqueva, J., Baker, A., & Camargo-Valero, M. A. (2024). Unravelling the impact of light, temperature and nutrient dynamics on duckweed growth : A meta-analysis study. *Journal of Environmental Management*, *366*, 121721. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.121721>
- Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, *6*(11), 1-5. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>
- Qiao, X., Ye, M., Liang, Y.-H., Yang, W.-Z., & Guo, D.-A. (2011). Retention behaviors of natural products in reversed-phase liquid chromatography using mobile phase comprising methanol, acetonitrile and water. *Journal of Separation Science*, *34*(2), 169-175. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000695>
- Ramakrishna, A., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, *6*(11), 1720-1731. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Ramel, F., Birtic, S., Cuiné, S., Triantaphylidès, C., Ravanat, J.-L., & Havaux, M. (2012). Chemical Quenching of Singlet Oxygen by Carotenoids in Plants1[C][W]. *Plant Physiology*, *158*(3), 1267-1278. <https://doi.org/10.1104/pp.111.182394>
- Reshi, Z. A., Ahmad, W., Lukatkin, A. S., & Javed, S. B. (2023). From Nature to Lab : A Review of Secondary Metabolite Biosynthetic Pathways, Environmental Influences, and In Vitro Approaches. *Metabolites*, *13*(8), 895. <https://doi.org/10.3390/metabo13080895>
- Rouessac, F., & Rouessac, A. (2004). *Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales modernes* (6 ed). Dunod.
- Ruban, A. V. (2016). Nonphotochemical Chlorophyll Fluorescence Quenching : Mechanism and Effectiveness in Protecting Plants from Photodamage1. *Plant Physiology*, *170*(4), 1903-1916. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01935>

- Rudrapal, M., Rakshit, G., Singh, R. P., Garse, S., Khan, J., & Chakraborty, S. (2024). Dietary Polyphenols : Review on Chemistry/Sources, Bioavailability/Metabolism, Antioxidant Effects, and Their Role in Disease Management. *Antioxidants*, 13(4), 429. <https://doi.org/10.3390/antiox13040429>
- Schutz, E. R. D., Broch Mignoni, D. S., Michelon, W., & Oliveira Nunes, E. de. (2025). Optimized bioethanol production from *Lemna minuta* biomass harvested from polluted water via acid and enzymatic hydrolysis. *Biofuels*, 16(8), 824-832. <https://doi.org/10.1080/17597269.2025.2457817>
- Seferli, M., Lefkaki, M., Manousakis, V., Ofrydopoulou, A., Shiels, K., Saha, S. K., Krey, G., Kamidis, N., Stamatis, N., Anastasiadou, C., & Tsoupras, A. (2025). Amphiphilic Bioactives of Freshwater Aquatic Plants *Nelumbo nucifera* (Indian Lotus) and *Lemna* sp. with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Antithrombotic Activities : In Vitro Study. *Pharmaceuticals*, 18(6), 835. <https://doi.org/10.3390/ph18060835>
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules*, 24(13), 2452. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
- Sharma, J., Clark, W. D., Shrivastav, A. K., Goswami, R. K., Tocher, D. R., & Chakrabarti, R. (2019). Potentiel de production de la lentille d'eau *Spirodela polyrhiza* (L. Schleiden) et évaluation de sa composition biochimique. *Aquaculture*, 513, 734419. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734419>
- Shen, N., Wang, Q., Zhu, J., Qin, Y., Liao, S., Li, Y., Zhu, Q., Jin, Y., Du, L., & Huang, R. (2016). Production d'acide succinique à partir d'hydrolysats de lentille d'eau (*Landoltia punctata*) par fermentation discontinue d'*Actinobacillus succinogenes* GXAS137. *Bioresource Technology*, 211, 307-312. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.036>
- Smiljkovic, M., Stanisavljevic, D., Stojkovic, D., Petrovic, I., Marjanovic Vicentic, J., Popovic, J., Golic Grdadolnik, S., Markovic, D., Sankovic-Babice, S., Glamoclija, J., Stevanovic, M., & Sokovic, M. (2017). Apigenin-7-O-glucoside versus apigenin : Insight into the modes of anticandidal and cytotoxic actions. *EXCLI Journal*, 16, 795-807. <https://doi.org/10.17179/excli2017-300>
- Song, Y., Hu, Z., Liu, S., Luo, S., He, R., Yang, X., Li, S., Yang, X., An, Y., & Lu, Y. (2025). Utilization of Microalgae and Duckweed as Sustainable Protein Sources for Food and Feed : Nutritional Potential and Functional Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 73(8), 4466-4482. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c11610>
- Sonti, S. S. M. S. (2023). *A review on High Performance Liquid Chromatography*. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.10232637>
- Stiller, A., Garrison, K., Gurdyumov, K., Kenner, J., Yasmin, F., Yates, P., & Song, B.-H. (2021). From Fighting Critters to Saving Lives : Polyphenols in Plant Defense and Human Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8995. <https://doi.org/10.3390/ijms22168995>
- Su, H., Zhao, Y., Jiang, J., Lu, Q., Li, Q., Luo, Y., Zhao, H., & Wang, M. (2014). Use of Duckweed (*Landoltia punctata*) as a Fermentation Substrate for the Production of Higher Alcohols as Biofuels. *Energy & Fuels*, 28(5), 3206-3216. <https://doi.org/10.1021/ef500335h>

- Sun, T., Rao, S., Zhou, X., & Li, L. (2022). Plant carotenoids : Recent advances and future perspectives. *Molecular Horticulture*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s43897-022-00023-2>
- Szpisják-Gulyás, N., Al-Tayawi, A. N., Horváth, Z. H., László, Z., Kertész, S., & Hodúr, C. (2023). *Methods for experimental design, central composite design and the Box–Behnken design, to optimise operational parameters : A review*. <https://doi.org/10.1556/066.2023.00235>
- Takács, K., Végh, R., Mednyánszky, Z., Haddad, J., Allaf, K., Du, M., Chen, K., Kan, J., Cai, T., Molnár, P., Bársony, P., Maczó, A., Zalán, Z., & Dalmadi, I. (2025). New Insights into Duckweed as an Alternative Source of Food and Feed : Key Components and Potential Technological Solutions to Increase Their Digestibility and Bioaccessibility. *Applied Sciences*, 15(2), 884. <https://doi.org/10.3390/app15020884>
- Tang, D. Y. Y., Ooi, C., & Show, P. L. (2025). Blue bioeconomy and biotechnology : Towards a sustainably growing microalgae industry. *Blue Biotechnology*, 2(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s44315-025-00036-8>
- Thaha, A. N., Ghamari, M., Jothiprakash, G., Velusamy, S., Karthikeyan, S., Ramesh, D., & Sundaram, S. (2025). High Impact Biomass Valorization for Second Generation Biorefineries in India : Recent Developments and Future Strategies for Sustainable Circular Economy. *Biomass*, 5(1), 16. <https://doi.org/10.3390/biomass5010016>
- Thangaraj, K., Natesan, K., Settu, K., Palani, M., Govindarasu, M., Subborayan, V., & Vaiyapuri, M. (2018). Orientin mitigates 1, 2-dimethylhydrazine induced lipid peroxidation, antioxidant and biotransforming bacterial enzyme alterations in experimental rats. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 14(6), 1379. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_1363_16
- Tian, T., Zeng, J., Zhao, G., Zhao, W., Gao, S., & Liu, L. (2018). Neuroprotective effects of orientin on oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced cell injury in primary culture of rat cortical neurons. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 243(1), 78-86. <https://doi.org/10.1177/1535370217737983>
- Tipnee, S., Jutiviboonsuk, A., & Wongtrakul, P. (2017). The Bioactivity Study of Active Compounds in *Wolffia globosa* Extract for an Alternative Source of Bioactive Substances. *Cosmetics*, 4(4), 53. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4040053>
- Tirado, D. F., & Calvo, L. (2019). La théorie de Hansen pour choisir le meilleur cosolvant pour l'extraction au CO₂ supercritique du β-carotène de *Dunaliella salina*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 145, 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.12.013>
- Ujong, A., Naibaho, J., Ghalamara, S., K. Tiwari, B., Hanon, S., & Tiwari, U. (2025). Duckweed : Exploring its farm-to-fork potential for food production and biorefineries. *Sustainable Food Technology*, 3(1), 54-80. <https://doi.org/10.1039/D4FB00288A>
- Ullah, R., Khan, M., Shah, S. A., Saeed, K., & Kim, M. O. (2019). Natural Antioxidant Anthocyanins—A Hidden Therapeutic Candidate in Metabolic Disorders with Major Focus in Neurodegeneration. *Nutrients*, 11(6), 1195. <https://doi.org/10.3390/nu11061195>

- Usman, M., Nakagawa, M., & Cheng, S. (2023). Emerging Trends in Green Extraction Techniques for Bioactive Natural Products. *Processes*, *11*(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/pr11123444>
- Uwineza, P. A., & Waśkiewicz, A. (2020). Recent Advances in Supercritical Fluid Extraction of Natural Bioactive Compounds from Natural Plant Materials. *Molecules*, *25*(17), 3847. <https://doi.org/10.3390/molecules25173847>
- Vaudreuil, M.-A., Vo Duy, S., Munoz, G., Furtos, A., & Sauvé, S. (2020). A framework for the analysis of polar anticancer drugs in wastewater : On-line extraction coupled to HILIC or reverse phase LC-MS/MS. *Talanta*, *220*, 121407. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121407>
- Viñas-Ospino, A., López-Malo, D., Esteve, M. J., Frígola, A., & Blesa, J. (2023). Green Solvents : Emerging Alternatives for Carotenoid Extraction from Fruit and Vegetable By-Products. *Foods*, *12*(4), 863. <https://doi.org/10.3390/foods12040863>
- Waters Corporation. (2016). *SYNAPT G2-Si Mass Spectrometer Overview and Maintenance Guide*.
- Xie, L., Deng, Z., Zhang, J., Dong, H., Wang, W., Xing, B., & Liu, X. (2022). Comparison of Flavonoid O-Glycoside, C-Glycoside and Their Aglycones on Antioxidant Capacity and Metabolism during In Vitro Digestion and In Vivo. *Foods*, *11*(6), 882. <https://doi.org/10.3390/foods11060882>
- Xu, J., Shen, Y., Zheng, Y., Smith, G., Sun, X. S., Wang, D., Zhao, Y., Zhang, W., & Li, Y. (2023). Duckweed (Lemnaceae) for potentially nutritious human food : A review. *Food Reviews International*, *39*(7), 3620-3634. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.2012800>
- Yadav, N. K., Patel, A. B., Debbarma, S., Priyadarshini, M. B., & Priyadarshi, H. (2024). Characterization of Bioactive Metabolites and Antioxidant Activities in Solid and Liquid Fractions of Fresh Duckweed (*Wolffia globosa*) Subjected to Different Cell Wall Rupture Methods. *ACS Omega*, *9*(18), 19940-19955. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c09674>
- Yao, Y., Zhang, M., Tian, Y., Zhao, M., Zhang, B., Zhao, M., Zeng, K., & Yin, B. (2017). La lentille d'eau (*Spirodela polyrhiza*) comme engrais vert pour augmenter le rendement et réduire les pertes d'azote dans la production de riz. *Field Crops Research*, *214*, 273-282. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.09.021>
- Yıldırım, M., Erşatır, M., Poyraz, S., Amangeldinova, M., Kudrina, N. O., & Terletskaia, N. V. (2024). Green Extraction of Plant Materials Using Supercritical CO₂ : Insights into Methods, Analysis, and Bioactivity. *Plants*, *13*(16), 2295. <https://doi.org/10.3390/plants13162295>
- Zagoskina, N. V., Zubova, M. Y., Nechaeva, T. L., Kazantseva, V. V., Goncharuk, E. A., Katanskaya, V. M., Baranova, E. N., & Aksenova, M. A. (2023). Polyphenols in Plants : Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review). *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(18), 13874. <https://doi.org/10.3390/ijms241813874>
- Zhang, J., Wen, C., Zhang, H., Duan, Y., & Ma, H. (2020). Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water : A review. *Trends in Food Science & Technology*, *95*, 183-195. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.018>

- Zhang, L., Ma, G., Kato, M., Yamawaki, K., Takagi, T., Kiriwa, Y., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Yoshioka, T., & Nesumi, H. (2012). Regulation of carotenoid accumulation and the expression of carotenoid metabolic genes in citrus juice sacs in vitro. *Journal of Experimental Botany*, 63(2), 871-886. <https://doi.org/10.1093/jxb/err318>
- Zhang, L., Rocchetti, G., Zengin, G., Del Buono, D., Trevisan, M., & Lucini, L. (2023). The Combination of Untargeted Metabolomics with Response Surface Methodology to Optimize the Functional Potential of Common Duckweed (*Lemna minor* L.). *Antioxidants*, 12(2), 313. <https://doi.org/10.3390/antiox12020313>
- Zhang, Y., Jia, R., Hui, T., Hu, Y., Wang, W., Wang, Y., Wang, Y., Zhu, Y., Yang, L., & Xiang, B. (2024). Transcriptomic and physiological analysis of the response of *Spirodela polyrrhiza* to sodium nitroprusside. *BMC Plant Biology*, 24(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-04766-6>
- Zhao, S., Blum, J. A., Ma, F., Wang, Y., Borejsza-Wysocka, E., Ma, F., Cheng, L., & Li, P. (2022). Anthocyanin Accumulation Provides Protection against High Light Stress While Reducing Photosynthesis in Apple Leaves. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12616. <https://doi.org/10.3390/ijms232012616>
- Zhou, Y., Stepanenko, A., Kishchenko, O., Xu, J., & Borisjuk, N. (2023). Duckweeds for Phytoremediation of Polluted Water. *Plants*, 12(3), 589. <https://doi.org/10.3390/plants12030589>